

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2019-509024  
(P2019-509024A)

(43) 公表日 平成31年4月4日(2019.4.4)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 5/09 (2010.01)</b>	C 1 2 N 5/09	4 B 0 6 3
<b>G 0 1 N 33/53 (2006.01)</b>	G 0 1 N 33/53	4 B 0 6 5
<b>C 1 2 Q 1/02 (2006.01)</b>	C 1 2 Q 1/02	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 31 頁)

(21) 出願番号 特願2018-538846 (P2018-538846)  
 (86) (22) 出願日 平成29年3月9日 (2017.3.9)  
 (85) 翻訳文提出日 平成30年7月20日 (2018.7.20)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2017/021683  
 (87) 国際公開番号 WO2017/156341  
 (87) 国際公開日 平成29年9月14日 (2017.9.14)  
 (31) 優先権主張番号 PCT/CN2016/075947  
 (32) 優先日 平成28年3月9日 (2016.3.9)  
 (33) 優先権主張国 中国 (CN)

(71) 出願人 518258685  
 ベイジン パーカンズ オンコロジー カ  
 ンパニー リミテッド  
 中華人民共和国 1000000 ベイジン  
 , チャンピン ディストリクト, ベイ  
 チン ロード, ゼットジーシー ライフ  
 サイエンス パーク, ペキン ユニバ  
 ーシティ メディカル インダストリー  
 パーク, ビルディング 11 5ティ  
 エイチ フロア  
 (74) 代理人 100078282  
 弁理士 山本 秀策  
 (74) 代理人 100113413  
 弁理士 森下 夏樹

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 腫瘍細胞懸濁培養及び関連方法

(57) 【要約】

患者からのヒト腫瘍細胞クラスターの適宜かつ効率的な増殖のための懸濁系細胞培養系及び培地、ならびに腫瘍細胞及び患者の1つ以上の治療薬に対する潜在的な応答性を評価する関連方法が提供される。本開示の実施形態は、ヒト患者からのヒト腫瘍細胞クラスターの集団を含む培地懸濁液（または複数の培地懸濁液）に関し、この培地懸濁液は、約14日以内に腫瘍細胞クラスターの少なくとも約10%の増殖をもたらす。ある特定の実施形態では、培地懸濁液は、約14、13、12、11、10、9、8、7、6、または5日以内にヒト腫瘍細胞クラスターの少なくとも約10、20、30、40、50、60、70、80、90、または100%の増殖をもたらす。

【選択図】 図4

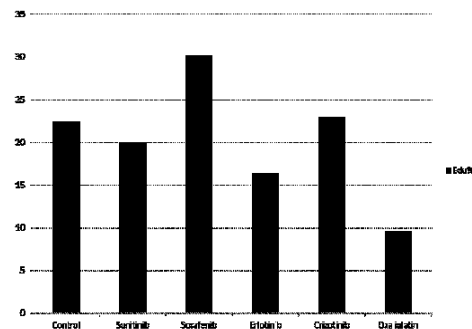


Figure 4

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

ヒト患者からのヒト腫瘍細胞クラスターの集団を含む培地懸濁液であって、約 14 日以内に前記腫瘍細胞クラスターの少なくとも約 10% の増殖をもたらす、培地懸濁液。

## 【請求項 2】

約 14、13、12、11、10、9、8、7、6、または 5 日以内に前記ヒト腫瘍細胞クラスターの少なくとも約 10、20、30、40、50、60、70、80、90、または 100% の増殖をもたらす、請求項 1 に記載の培地懸濁液。

## 【請求項 3】

約 7 日以内に前記ヒト腫瘍細胞クラスターの少なくとも約 20 ~ 30% の増殖をもたらす、請求項 1 または 2 に記載の培地懸濁液。

10

## 【請求項 4】

約 7 日以内に前記ヒト腫瘍細胞クラスターの少なくとも約 60% の増殖をもたらす、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の培地懸濁液。

## 【請求項 5】

合成培地を含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の培地懸濁液。

## 【請求項 6】

無血清である、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の培地懸濁液。

## 【請求項 7】

DMEM/F-12、Wnt3A、塩基性線維芽細胞成長因子 (bFGF)、インスリン、トランスフェリン、ウシ血清アルブミン (BSA)、コレステロール、B 細胞活性化因子 (BAFF)、及び 2-メルカプトエタノールから選択される 1 つ以上の構成成分を含む、請求項 5 または 6 に記載の培地懸濁液。

20

## 【請求項 8】

DMEM/F-12、Wnt3A、bFGF、インスリン、トランスフェリン、ウシ血清アルブミン (BSA)、コレステロール、B 細胞活性化因子 (BAFF)、及び 2-メルカプトエタノールから選択される構成成分のうち 2、3、4、5、6、7、8、または 9 つを含む、請求項 7 に記載の培地懸濁液。

## 【請求項 9】

DMEM/F-12、Wnt3A、bFGF、インスリン、トランスフェリン、ウシ血清アルブミン (BSA)、コレステロール、B 細胞活性化因子 (BAFF)、及び 2-メルカプトエタノールを含む、請求項 8 に記載の培地懸濁液。

30

## 【請求項 10】

ニコチンアミド、ノギン、R-スポンジン-1、Y27632、線維芽細胞成長因子 10 (FGF10)、及び VO-OHPic から選択される 1 つ以上の構成成分を含む、請求項 5 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の培地懸濁液。

## 【請求項 11】

ニコチンアミド、ノギン、R-スポンジン-1、Y27632、FGF10、及び VO-OHPic から選択される構成成分のうち 2、3、4、5、または 6 つを含む、請求項 10 に記載の培地懸濁液。

40

## 【請求項 12】

ニコチンアミド、ノギン、R-スポンジン-1、Y27632、FGF10、及び VO-OHPic を含む、請求項 11 に記載の培地懸濁液。

## 【請求項 13】

上皮成長因子 (EGF)、肝細胞成長因子 (HGF)、インスリン様成長因子 (IGF)、血管内皮成長因子 (VEGF)、血小板由来成長因子 (PDGF)、N2 サプリメント、B27、プロスタグランジン E2 (PGE-2)、及び N-アセチル-L-システインから選択される 1 つ以上の構成成分を含む、請求項 7 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の培地懸濁液。

## 【請求項 14】

50

EGF、HGF、IGF、VEGF、PDGF、N2、B27、PGE2、N-アセチル-L-システインから選択される構成成分のうち、2、3、4、5、6、7、8、または9つを含む、請求項13に記載の培地懸濁液。

【請求項15】

EGF、HGF、IGF、VEGF、PDGF、N2、B27、PGE2、及びN-アセチル-L-システインを含む、請求項14に記載の培地懸濁液。

【請求項16】

ニコチンアミド、ノギン、R-スポンジン-1、Y27632、EGF、HGF、IGF、VEGF、PDGF、N2、B27、PGE2、N-アセチル-L-システイン、FGF10、及びVO-OHpicを含む、請求項10～15のいずれか1項に記載の培地懸濁液。

10

【請求項17】

細胞外基質構成成分、任意選択でマトリゲル、コラーゲン、ラミニン、またはフィブロネクチンを含まない、請求項1～16のいずれか1項に記載の培地懸濁液。

【請求項18】

前記ヒト腫瘍細胞クラスターが、ヒト患者からの肺癌細胞、結腸癌細胞、胃癌細胞、または乳癌細胞である、請求項1～17のいずれか1項に記載の培地懸濁液。

【請求項19】

前記ヒト腫瘍細胞クラスターが、ヒト腫瘍細胞及び/またはヒト患者からの組織で異種移植された免疫不全動物から単離される、請求項1～18のいずれか1項に記載の培地懸濁液。

20

【請求項20】

前記ヒト腫瘍細胞クラスターが、任意選択で、外科試料、生検、胸水、及び腹水から選択される、ヒト患者から除去された腫瘍試料から直接単離される、請求項1～18のいずれか1項に記載の培養懸濁液。

【請求項21】

ヒト腫瘍細胞の増殖方法であって、試料からヒト腫瘍細胞の集団を得ることと、請求項1～20のいずれか1項に記載の培地懸濁液中でヒト腫瘍細胞クラスターの集団を培養することと、を含む、方法。

【請求項22】

約14日以内の間、前記培養懸濁液中で前記ヒト腫瘍細胞クラスターを培養することを含む、請求項21に記載の方法。

30

【請求項23】

約14、13、12、11、10、9、8、7、6、または5日以内の間、前記培養懸濁液中で前記ヒト腫瘍細胞クラスターを培養することを含む、請求項22に記載の方法。

【請求項24】

約7日以内の間、前記培養懸濁液中で前記ヒト腫瘍細胞クラスターを培養することを含む、請求項23に記載の方法。

【請求項25】

ヒト患者の治療薬に対する応答性の試験方法であって、前記ヒト患者から腫瘍細胞クラスターの集団を得るまたは受け取ることと、請求項1～24のいずれか1項に記載の培地懸濁液中で前記腫瘍細胞クラスターの集団を培養することと、

40

前記治療薬を前記培地懸濁液に与薬することと、

前記腫瘍細胞の集団における腫瘍細胞増殖及び/または腫瘍細胞アポトーシスを測定することと、を含み、

腫瘍細胞増殖の減少及び/または腫瘍細胞アポトーシスの誘導が、ヒト患者の治療薬に対する応答性を示し、腫瘍細胞増殖の減少の欠如及び/または腫瘍細胞アポトーシスの誘導の欠如が、ヒト患者の治療薬に対する耐性を示す方法も含まれる。

【請求項26】

50

前記治療薬を、前記培地懸濁液中で前記腫瘍細胞クラスターの集団を培養した日と同日に与薬することを含む、請求項 25 に記載の方法。

【請求項 27】

前記治療薬を、前記培地懸濁液中で前記腫瘍細胞クラスターの集団を培養した少なくとも 1 日後に与薬することを含む、請求項 25 に記載の方法。

【請求項 28】

前記治療薬を、前記培地懸濁液中で前記腫瘍細胞クラスターの集団を培養した約 1、2、3、4、5、6、または 7 日後、またはそれ以内に与薬することを含む、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 29】

前記治療薬の与薬約 14 日以内に、前記腫瘍細胞の集団における腫瘍細胞増殖及び/または腫瘍細胞アポトーシスを測定することを含む、請求項 1 ~ 28 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 30】

前記治療薬の与薬約 14、13、12、11、10、9、8、7、6、または 5 日以内に、前記腫瘍細胞の集団における腫瘍細胞増殖及び/または腫瘍細胞アポトーシスを測定することを含む、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 31】

前記治療薬の与薬約 7、6、または 5 日以内に、前記腫瘍細胞の集団における腫瘍細胞増殖及び/または腫瘍細胞アポトーシスを測定することを含む、請求項 30 に記載の方法。

【請求項 32】

腫瘍細胞増殖の測定ステップが、細胞増殖マーカーを測定することを含む、請求項 1 ~ 31 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 33】

前記細胞増殖マーカーが、<sup>3</sup>H - チミジン、プロモデオキシウリジン (BrdU)、5 - エチニル - 2' - デオキシウリジン (Edu)、Ki - 67、及び増殖細胞核抗原 (PCNA) のうちの 1 つ以上から選択される、請求項 32 に記載の方法。

【請求項 34】

前記腫瘍細胞アポトーシスの測定ステップが、細胞アポトーシスマーカーを測定することを含む、請求項 1 ~ 33 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 35】

前記細胞アポトーシスマーカーが、カスパーゼの蛍光色素標識阻害剤 (FLICA)、カスパーゼ活性化、ポリADPリボースポリメラーゼ (PARP) 切断、DRAQ5、DRAQ7、及び末端デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ (TdT) dUTP ニック末端標識 (TUNEL) アッセイのうちの 1 つ以上から選択される、請求項 34 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、35 U.S.C. § 119 (e)のもと、参照によりその全体が組み込まれる、2016年3月9日出願のPCT/CN2016/075947に対する優先権を主張する。

【背景技術】

【0002】

背景

本開示の実施形態は、患者からのヒト腫瘍細胞クラスターの適宜かつ効率的な増殖のための懸濁系細胞培養系及び培地、ならびに腫瘍細胞及び患者の 1 つ以上の治療薬に対する潜在的な応答性を評価する関連方法に関する。

10

20

30

40

50

## 【0003】

診断薬及び治療薬を改善する不断の努力にもかかわらず、癌は依然として世界的に主な死亡原因である。癌の多様性または不均一性は、新しい療法の開発の障害となり、可能性の高い応答体を特定することを困難にする。さらに、多くの癌療法は、さらなる点突然変異及び治療用試薬の標的をバイパスする代替的な経路を含む、初期及び獲得耐性の課題を抱えている。

## 【0004】

今後の療法の成功は、化学療法薬及び組み合わせの有効性を正確に評価するために容易に操作することができる関連モデルシステムの開発と共に、腫瘍進行及び転移プロセスの根底にある事象の総合的な分析に依存する可能性が高い。一例として、基質包埋3次元(3D)培養を使用する癌細胞の一次培養は、癌生物学を調査し、個々の患者の化学療法感受性を予測するためにますます使用されている。しかしながら、癌細胞のかかる基質包埋一次培養の条件は現在最適化されていない。さらに、かかる一次培養は、煩雑である場合があり、他の潜在的な問題の中でも、低い癌細胞生存の可能性、宿主細胞による汚染、及び再現することが困難である結果を含む。

10

## 【0005】

よって、一次癌細胞が細胞株と同様に実行可能かつ効率的に、及び適宜様式で3Dにおいて培養され得る方法及び組成物を開発することが必要である。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0006】

【図1】腫瘍細胞クラスターが患者から外科的に除去される結腸/直腸腫瘍からの分離が成功し、合成成長培地中の懸濁液中で培養されたことを示す。

【図2】Edu組み込みにより測定されるとき、腫瘍細胞が短期懸濁培養期間中に増殖されたことを示す(試料1は図1Aからのものであり、試料2は図1Bからのものであり、試料3は図1Cからのものであり、試料4は図1Dのものからである)。

【図3】短期懸濁培養(約7日以内)が腫瘍細胞クラスターの最も高い細胞増殖マーカーを示すことを示す。図3Aは4つの異なる患者試料の増殖マーカーを示し、図3Bは1週間にわたる1つの例示的な患者試料の増殖マーカーを示す。

【図4】試験条件下で(図3Bを参照されたい)、腫瘍細胞クラスターの成長が試験された薬物(スニチブ、ソラフェニブ、エルロチニブ、クリゾチニブ、オキサリプラチン)によって完全に阻害されないことを示し、これはこれらの薬物に対する患者由来の異種移植片(PDX)腫瘍応答と一致する。

20

30

## 【発明の概要】

## 【課題を解決するための手段】

## 【0007】

本開示の実施形態は、ヒト患者からのヒト腫瘍細胞クラスターの集団を含む培地懸濁液(または複数の培地懸濁液)に関し、この培地懸濁液は、約14日以内に腫瘍細胞クラスターの少なくとも約10%の増殖をもたらす。

## 【0008】

ある特定の実施形態では、培地懸濁液は、約14、13、12、11、10、9、8、7、6、または5日以内にヒト腫瘍細胞クラスターの少なくとも約10、20、30、40、50、60、70、80、90、または100%の増殖をもたらす。いくつかの実施形態では、培地懸濁液は、約7日以内にヒト腫瘍細胞クラスターの少なくとも約20~30%の増殖をもたらす。ある特定の実施形態では、培地懸濁液は、約7日以内にヒト腫瘍細胞クラスターの少なくとも約60%の増殖をもたらす。

40

## 【0009】

ある特定の実施形態では、培地懸濁液は、合成培地を含む。いくつかの実施形態では、培地懸濁液は、無血清または実質的に無血清である。

## 【0010】

ある特定の実施形態では、培地懸濁液は、DMEM/F-12、Wnt3A、塩基性線

50

維芽細胞成長因子 ( b F G F )、インスリン、トランスフェリン、ウシ血清アルブミン ( B S A )、コレステロール、B細胞活性化因子 ( B A F F )、及び2 -メルカプトエタノールから選択される1つ以上の構成成分を含むか、またはさらに含む。いくつかの実施形態では、培地懸濁液は、D M E M / F - 1 2、W n t 3 A、b F G F、インスリン、トランスフェリン、ウシ血清アルブミン ( B S A )、コレステロール、B細胞活性化因子 ( B A F F )、及び2 -メルカプトエタノールから選択される構成成分のうち2、3、4、5、6、7、8、または9つを含む。特定の実施形態では、培地懸濁液は、D M E M / F - 1 2、W n t 3 A、b F G F、インスリン、トランスフェリン、ウシ血清アルブミン ( B S A )、コレステロール、B細胞活性化因子 ( B A F F )、及び2 -メルカプトエタノールを含む。

10

## 【 0 0 1 1 】

ある特定の実施形態では、培地懸濁液は、ニコチンアミド、ノギン、R - スポンジン - 1、Y 2 7 6 3 2、線維芽細胞成長因子 1 0 ( F G F 1 0 )、及び V O - O H p i c から選択される1つ以上の構成成分を含むか、またはさらに含む。いくつかの実施形態では、培地懸濁液は、ニコチンアミド、ノギン、R - スポンジン - 1、Y 2 7 6 3 2、F G F 1 0、及び V O - O H p i c から選択される構成成分のうち2、3、4、5、または6つを含む。特定の実施形態では、培地懸濁液は、ニコチンアミド、ノギン、R - スポンジン - 1、Y 2 7 6 3 2、F G F 1 0、及び V O - O H p i c を含む。

## 【 0 0 1 2 】

ある特定の実施形態では、培地懸濁液は、上皮成長因子 ( E G F )、肝細胞成長因子 ( H G F )、インスリン様成長因子 ( I G F )、血管内皮成長因子 ( V E G F )、血小板由来成長因子 ( P D G F )、N 2 サプリメント、B 2 7、プロスタグランジン E 2 ( P G E - 2 )、及び N - アセチル - L - システインから選択される1つ以上の構成成分を含むか、またはさらに含む。ある特定の実施形態では、培地懸濁液は、E G F、H G F、I G F、V E G F、P D G F、N 2、B 2 7、P G E 2、N - アセチル - L - システインから選択される構成成分のうち2、3、4、5、6、7、8、または9つを含む。特定の実施形態では、培地懸濁液は、E G F、H G F、I G F、V E G F、P D G F、N 2、B 2 7、P G E 2、及び N - アセチル - L - システインを含む。

20

## 【 0 0 1 3 】

ある特定の実施形態では、培地懸濁液は、ニコチンアミド、ノギン、R - スポンジン - 1、Y 2 7 6 3 2、E G F、H G F、I G F、V E G F、P D G F、N 2、B 2 7、P G E 2、N - アセチル - L - システイン、F G F 1 0、及び V O - O H p i c を含むか、またはさらに含む。

30

## 【 0 0 1 4 】

いくつかの実施形態では、培地懸濁液は、細胞外基質構成成分、例えば、マトリゲル、コラーゲン、ラミニン、またはフィブロネクチンを含まない。

## 【 0 0 1 5 】

ある特定の実施形態では、培地懸濁液は、ヒト腫瘍細胞クラスターが、ヒト患者からの肺癌細胞、結腸癌細胞、胃癌細胞、または乳癌細胞であるを含む。いくつかの実施形態では、培地懸濁液は、ヒト腫瘍細胞クラスターが、ヒト腫瘍細胞及び/またはヒト患者からの組織で異種移植された免疫不全動物から単離されるを含む。ある特定の実施形態では、培地懸濁液は、ヒト腫瘍細胞クラスターが、ヒト患者から除去された腫瘍試料から直接単離され、任意選択で、外科試料、生検、胸水、及び腹水から選択されるを含む。

40

## 【 0 0 1 6 】

また、試料からヒト腫瘍細胞の集団を得ることと、本明細書に記載される培地懸濁液中でヒト腫瘍細胞クラスターの集団を培養することを含む、ヒト腫瘍細胞の増殖方法も含まれる。いくつかの方法は、約14日以内の間、培地懸濁液中でヒト腫瘍細胞クラスターを培養することを含む。いくつかの方法は、約14、13、12、11、10、9、8、7、6、または5日以内の間、培地懸濁液中でヒト腫瘍細胞クラスターを培養することを含む。特定の方法は、約7日以内の間、培地懸濁液中でヒト腫瘍細胞クラスターを培養す

50

ることを含む。

【0017】

ヒト患者の治療剤薬に対する応答性の試験方法であって、  
ヒト患者から腫瘍細胞クラスターの集団を得るまたは受け取ることと、  
先行請求項のいずれか1項に記載の培地懸濁液中で腫瘍細胞クラスターの集団を培養することと、  
治療薬を培地懸濁液に与薬することと、  
腫瘍細胞の集団における腫瘍細胞増殖及び/または腫瘍細胞アポトーシスを測定することと、を含み、

腫瘍細胞増殖の減少及び/または腫瘍細胞アポトーシスの誘導が、ヒト患者の治療薬に対する応答性を示し、腫瘍細胞増殖の減少の欠如及び/または腫瘍細胞アポトーシスの誘導の欠如が、ヒト患者の治療薬に対する耐性を示す方法も含まれる。

10

【0018】

いくつかの方法は、治療薬を、培地懸濁液中で腫瘍細胞クラスターの集団を培養した日と同日に与薬することを含む。

【0019】

ある特定の方法は、治療薬を、培地懸濁液中で腫瘍細胞クラスターの集団を培養した少なくとも1日後に与薬することを含む。特定の方法は、治療薬を、培地懸濁液中で腫瘍細胞クラスターの集団を培養した約1、2、3、4、5、6、または7日後、またはそれ以内に与薬することを含む。

20

【0020】

いくつかの方法は、治療薬の与薬約14日以内に、腫瘍細胞の集団における腫瘍細胞増殖及び/または腫瘍細胞アポトーシスを測定することを含む。いくつかの方法は、治療薬の与薬約14、13、12、11、10、9、8、7、6、または5日以内に、腫瘍細胞の集団における腫瘍細胞増殖及び/または腫瘍細胞アポトーシスを測定することを含む。特定の方法は、治療薬の与薬約7、6、または5日以内に、腫瘍細胞の集団における腫瘍細胞増殖及び/または腫瘍細胞アポトーシスを測定することを含む。

【0021】

いくつかの実施形態では、腫瘍細胞増殖の測定ステップは、細胞増殖マーカーを測定することを含む。いくつかの実施形態では、細胞増殖マーカーは、<sup>3</sup>H-チミジン、プロモデオキシウリジン(BrdU)、5-エチニル-2'-デオキシウリジン(EdU)、Ki-67、及び増殖細胞核抗原(PCNA)のうちの一つ以上から選択される。

30

【0022】

ある特定の実施形態では、腫瘍細胞アポトーシスの測定ステップは、細胞アポトーシスマーカーを測定することを含む。いくつかの実施形態では、細胞アポトーシスマーカーは、カスパーゼの蛍光色素標識阻害剤(FLICA)、カスパーゼ活性化、ポリADPリボースポリメラーゼ(PARP)切断、DRAQ5、DRAQ7、及び末端デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ(TdT)dUTPニック末端標識(TUNEL)アッセイのうちの一つ以上から選択される。

40

【発明を実施するための形態】

【0023】

本開示の実施形態は、患者に直接由来するか、または患者由来の異種移植片(PDX)に由来するかにかかわらず、一次ヒト腫瘍細胞クラスターの信頼できかつ適宜増殖を達成する合成培地及び関連懸濁細胞培養の発見に関する。懸濁液細胞培養は、とりわけ、患者腫瘍の、1つ以上の治療薬に対する潜在的応答性を評価するために、及び比較的短時間、例えば、培養時から1または2週間以内に患者に最適な治療選択肢を特定する利点を提供するために使用され得る。

【0024】

定義

別様に定義されない限り、本明細書で使用される全ての技術及び科学用語は、本発明が

50

属する当業者によって通常理解されるものと同じ意味を有する。本明細書に記載されるものと同様または同等の任意の方法及び材料が本発明の実施または試験において使用されるが、ある特定の好ましい方法及び材料が本明細書に記載される。本明細書に引用される特許及び特許出願を含むが、これらに限定されない全ての刊行物及び参考文献は、各個別の刊行物または参考文献が具体的かつ個別に参照により組み込まれることを示すかのように、それらの全体が参照により組み込まれる。本発明の目的に関して、次の用語が以下に定義される。

【0025】

「a」及び「an」という冠詞は、本明細書において、冠詞の文法上の目的語の1つ、または2つ以上（即ち、少なくとも1つ）を指すために使用される。一例として、「要素（an element）」は、1つの要素または2つ以上の要素を意味する。

10

【0026】

「約」とは、参照分量、レベル、値、数、頻度、百分率、寸法、サイズ、量、重量、または長さに対して30、25、20、15、10、9、8、7、6、5、4、3、2、または1%ほど変動する分量、レベル、値、数、頻度、百分率、寸法、サイズ、量、重量、または長さを意味する。

【0027】

本明細書全体を通して、文脈上他を意味しない限り、「含む（comprise）」、「含む（comprises）」、及び「含むこと（comprising）」という語は、記載されるステップもしくは要素またはステップもしくは要素の群の包含を暗示するが、任意の他のステップもしくは要素またはステップもしくは要素の群を除外しないことを理解する。「からなる」とは、「からなる」という語句に続くもの全てを含み、それに限定されることを意味する。よって、「からなる」という語句は、列記される要素が必要であるか、または必須であり、他の要素が存在し得ないことを示す。「から本質的になる」とは、語句の後に列記される任意の要素を含み、列記される要素の開示において指定された活性または作用に干渉しない、または寄与しない他の要素に限定されることを意味する。よって、「本質的になる」という語句は、列挙された要素が必要であるか、または必須であることを示すが、他の要素は、任意選択であり、それらが列記された要素の活性または作用に実質的に影響を与えるかどうかに応じて、存在しても、しなくてもよいことを示す。

20

30

【0028】

「単離された」とは、その本来の状態においてそれに通常付随する構成成分を実質的にまたは本質的に含まない材料を意味する。

【0029】

「調節」という用語は、典型的には、対照と比較したとき、統計学的に有意な、または生理学的に有意な量における「増加」または「増強」、ならびに「減少」または「低減」を含む。「増加」または「増強」量は、典型的には、「統計的に有意な」量であり、組成物もしくは対照組成物、試料、または試験対象なしで生成された量の約もしくは少なくとも約1.2、1.4、1.6、1.8、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、30、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、1000倍、または約もしくは少なくとも約5%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、200%、300%、400%、500%、600%、700%、800%、900%、1000%（全ての整数及びその間の範囲を含む）である増加を含み得る。「減少」または「低減」量は、典型的には、「統計的に有意な」量であり、組成物もしくは対照組成物、試料、または試験対象なしで生成された量の約もしくは少なくとも約1.2、1.4、1.6、1.8、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、30、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、1000倍、または約もしくは少なくとも約5%、10%、11%、12%、1

40

50

3 %、14 %、15 %、16 %、17 %、18 %、19 %、20 %、25 %、30 %、35 %、40 %、45 %、50 %、55 %、60 %、65 %、70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、100 %、200 %、300 %、400 %、500 %、600 %、700 %、800 %、900 %、1000 % (全ての整数及びその間の範囲を含む) である減少を含み得る。

【0030】

ある特定の実施形態では、培地または懸濁培養中の腫瘍細胞クラスターの「純度」が、具体的に定義され得る。例えば、ある特定の培地または懸濁培養は、他の細胞型、例えば、非癌性宿主細胞または動物細胞 (例えば、異種移植片由来の腫瘍細胞クラスターに関して) に対して、約または少なくとも約50 %、55 %、60 %、65 %、70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、100 % 純粹 (全ての整数及びその間の範囲を含む) である腫瘍細胞クラスターを含み得る。

10

【0031】

「統計学的に有意な」とは、その結果が偶然に起こった可能性が低いことを意味する。統計的有意性は、当該技術分野で既知の任意の方法によって決定され得る。一般に使用された有意性の尺度としては、帰無仮説が真である場合に観察された事象が生じるであろう頻度または確率である p 値が挙げられる。得られた p 値が有意性レベルよりも小さい場合、帰無仮説は否定される。単純な場合では、有意性レベルは、0.05 以下の p 値で定義される。

【0032】

「実質的に」または「本質的に」は、ほぼ完全に、または完全に、例えば、95 % 以上のある所与の分量を意味する。

20

【0033】

上述のように、ある特定の実施形態は、ヒト患者からの腫瘍細胞クラスターの集団を含む培地懸濁液に関し、この培地懸濁液は、約14日以内に腫瘍細胞クラスターの少なくとも約10%の増殖をもたらす。よって、これら及び関連実施形態では、腫瘍細胞クラスターは、懸濁培養において、例えば、接着培養ではなく、懸濁液中の凝集塊として成長する。

【0034】

いくつかの実施形態では、培地懸濁液は、約14、13、12、11、10、9、8、7、6、または5日以内に腫瘍細胞クラスターの約もしくは少なくとも約10、20、30、40、50、60、70、80、90、または100% (全ての組み合わせ、整数、及びその間の範囲を含む) の増殖をもたらす。

30

【0035】

例えば、特定の培地懸濁液は、任意選択で、約14、13、12、11、10、9、8、7、6、もしくは5日以内に、または約5~14、6~14、7~14、8~14、9~14、10~14、11~14、12~14、もしくは13~14日以内に、または約5~13、6~13、7~13、8~13、9~13、10~13、11~13、もしくは12~13日以内に、または約5~12、6~12、7~12、8~12、9~12、10~12、もしくは11~12日以内に、または約5~11、6~11、7~11、8~11、9~11、もしくは10~11日以内に、または約5~10、6~10、7~10、8~10、もしくは9~10日以内に、または約5~9、6~9、7~9、もしくは8~9日以内に、または約5~8、6~8、もしくは7~8日以内に、または約5~7もしくは6~7日以内に、または約5~6日以内に、腫瘍細胞クラスターの約もしくは少なくとも約10~15、10~20、10~25、10~30、10~35、10~40、10~45、10~50、10~55、10~60、10~65、10~70、10~75、10~80、10~85、10~90、10~95、または10~100%の増殖、あるいは腫瘍細胞クラスターの約もしくは少なくとも約15~20、15~25、15~30、15~35、15~40、15~45、15~50、15~55、15~60、15~65、15~70、15~75、15~80、15~85、15~90、15~95

40

50

、または15～100%の増殖、あるいは腫瘍細胞クラスターの約もしくは少なくとも約20～25、20～30、20～35、20～40、20～45、20～50、20～55、20～60、20～65、20～70、20～75、20～80、20～85、20～90、20～95、または20～100%の増殖、あるいは腫瘍細胞クラスターの約もしくは少なくとも約25～30、25～35、25～40、25～45、25～50、25～55、25～60、25～65、25～70、25～75、25～80、25～85、25～90、25～95、または25～100%の増殖、あるいは腫瘍細胞クラスターの約もしくは少なくとも約30～35、30～40、30～45、30～50、30～55、30～60、30～65、30～70、30～75、30～80、30～85、30～90、30～95、または30～100%の増殖、あるいは腫瘍細胞クラスターの約もしくは少なくとも約35～40、35～45、35～50、35～55、35～60、35～65、35～70、35～75、35～80、35～85、35～90、35～95、または35～100%の増殖、あるいは腫瘍細胞クラスターの約もしくは少なくとも約40～45、40～50、40～55、40～60、40～65、40～70、40～75、40～80、40～85、40～90、40～95、または40～100%の増殖、あるいは腫瘍細胞クラスターの約もしくは少なくとも約45～50、45～55、45～60、45～65、45～70、45～75、45～80、45～85、45～90、45～95、または45～100%の増殖、あるいは腫瘍細胞クラスターの約もしくは少なくとも約50～55、50～60、50～65、50～70、50～75、50～80、50～85、50～90、50～95、または50～100%の増殖、あるいは腫瘍細胞クラスターの約もしくは少なくとも約55～60、55～65、55～70、55～75、55～80、55～85、55～90、55～95、または55～100%の増殖、あるいは腫瘍細胞クラスターの約もしくは少なくとも約60～65、60～70、60～75、60～80、60～85、60～90、60～95、または60～100%の増殖、あるいは腫瘍細胞クラスターの約もしくは少なくとも約65～70、65～75、65～80、65～85、65～90、65～95、または65～100%の増殖、あるいは腫瘍細胞クラスターの約もしくは少なくとも約70～80、70～85、70～90、70～95、または70～100%の増殖、あるいは腫瘍細胞クラスターの約もしくは少なくとも約75～80、75～85、75～90、75～95、または75～100%の増殖、あるいは腫瘍細胞クラスターの約もしくは少なくとも約80～85、80～90、80～95、または80～100%の増殖、あるいは腫瘍細胞クラスターの約もしくは少なくとも約85～90、85～95、または85～100%の増殖、あるいは腫瘍細胞クラスターの約もしくは少なくとも約90～95または90～100%の増殖、あるいは腫瘍細胞クラスターの約もしくは少なくとも約95～100%の増殖（これらの全ての組み合わせを含む）をもたらす。特定の実施形態は、約7日以内に、腫瘍細胞クラスターの少なくとも約20～30%の増殖、または約7日以内に、腫瘍細胞クラスターの少なくとも約60%の増殖をもたらす。

#### 【0036】

いくつかの実施形態では、腫瘍細胞クラスターの培地懸濁液は「合成培地」を含む。ある特定の実施形態では、「合成培地」は、化学構成成分の全てが既知である、ヒトもしくは動物細胞のインビトロまたはエクスピボ細胞培養に好適な成長培地である。いくつかの実施形態では、合成培地は、「無血清」または「実質的に無血清」である、つまり、培地は、血清、例えば、ウシ胎児血清（FBS）またはウシ胎仔血清（FCS）の添加を欠くか、または実質的に欠くものである。

#### 【0037】

いくつかの実施形態では、合成培地は、DMEM、F12、RPMI 1640、またはそれらの組み合わせ、例えば、追加の構成成分、例えば、成長因子、抗酸化剤、及び/またはエネルギー源で補充されるDMEM/F12などの基礎培地を含む。よって、特定の実施形態では、合成培地としては、ダルベッコ改変イーグル培地（DMEM）、ハムの栄養混合物（F12）、RPMI 1640、またはDMEM/F12が挙げられる。いくつ

かの実施形態では、培地は、例えば、約10:1、9:1、8:1、7:1、6:1、5:1、4:1、3:1、2:1、1:1、1:2、1:3、1:4、1:5、1:6、1:7、1:8、1:9、1:10の割合でDMEM/F12を含む。

【0038】

ある特定の実施形態では、合成培地は、Wnt3A、塩基性線維芽細胞成長因子(bFGF)、インスリン、トランスフェリン、ウシ血清アルブミン(BSA)、コレステロール、B細胞活性化因子(BAFF)、及び2-メルカプトエタノール(前述の全ての組み合わせを含む)から選択される1つ以上の構成成分、例えば、1、2、3、4、5、6、7、または8つの構成成分を含む。特定の実施形態は、Wnt3A、bFGF、インスリン、トランスフェリン、ウシ血清アルブミン(BSA)、コレステロール、B細胞活性化因子(BAFF)、及び2-メルカプトエタノールから選択される1つ以上の構成成分、例えば、1、2、3、4、5、6、7、または8つの構成成分と組み合わせてDMEM/F-12を含む。具体的な実施形態は、DMEM/F-12、Wnt3A、bFGF、インスリン、トランスフェリン、ウシ血清アルブミン(BSA)、コレステロール、B細胞活性化因子(BAFF)、及び2-メルカプトエタノールを含む。

10

【0039】

ある特定の実施形態では、Wnt3Aの濃度は、約0.1~10,000もしくは1~1000ng/ml、または約0.1~1000、1~1000、10~1000、20~1000、30~1000、40~1000、50~1000、60~1000、70~1000、80~1000、90~1000、100~1000、200~1000、300~1000、400~1000、500~1000、600~1000、700~1000、800~1000、900~1000ng/ml、または約0.1~500、1~500、10~500、20~500、30~500、40~500、50~500、60~500、70~500、80~500、90~500、100~500、200~500、300~500、400~500ng/ml、または約0.1~400、1~400、10~400、20~400、30~400、50~400、40~400、60~400、70~400、80~400、90~400、100~400、200~400、300~400ng/ml、または約0.1~300、1~300、10~300、20~300、30~300、40~300、50~300、60~300、70~300、80~300、90~300、100~300、200~300ng/ml、または約0.1~200、1~200、10~200、20~200、30~200、40~200、50~200、60~200、70~200、80~200、90~200、100~200ng/ml、または約0.1~150、1~150、10~150、20~150、30~150、40~150、50~150、60~150、70~150、80~150、90~150、100~150ng/ml、または約0.1~120、1~120、10~120、20~120、30~120、40~120、50~120、60~120、70~120、80~120、90~120、100~120ng/ml、または約0.1~100、1~100、10~100、20~100、30~100、40~100、50~100、60~100、70~100、80~100、90~100ng/mlの範囲である。特定の実施形態では、Wnt3Aは、ヒトまたはマウスWnt3Aタンパク質、例えば、組み換えヒトまたはマウスWnt3Aタンパク質である。

20

30

40

【0040】

ある特定の実施形態では、bFGFの濃度は、約0.1~100もしくは1~10ng/ml、または約0.1~100、0.2~100、0.3~100、0.4~100、0.5~100、0.6~100、0.7~100、0.8~100、0.9~100、1~100、2~100、3~100、4~100、5~100、10~100、50~100ng/ml、または約0.1~50、0.2~50、0.3~50、0.4~50、0.5~50、0.6~50、0.7~50、0.8~50、0.9~50、1~50、2~50、3~50、4~50、5~50、10~50ng/ml、または約0.1~10、0.2~10、0.3~10、0.4~10、0.5~10、0.6~10、0.7~10、0.8~10、0.9~10、1~10、2~10、3~10、4~10、5~10、6~10、7~10、8~10、9~10、10~10ng/mlの範囲である。特定の実施形態では、bFGFは、ヒトまたはマウスbFGFタンパク質、例えば、組み換えヒトまたはマウスbFGFタンパク質である。

50

7 ~ 10、0.8 ~ 10、0.9 ~ 10、1 ~ 10、2 ~ 10、3 ~ 10、4 ~ 10、5 ~ 10 ng / ml、または約0.1 ~ 5、0.2 ~ 5、0.3 ~ 5、0.4 ~ 5、0.5 ~ 5、0.6 ~ 5、0.7 ~ 5、0.8 ~ 5、0.9 ~ 5、1 ~ 5、2 ~ 5、3 ~ 5、4 ~ 5 ng / mlの範囲である。特定の実施形態では、bFGFは、ヒトまたはマウスbFGFタンパク質、例えば、組み換えヒトまたはマウスbFGFタンパク質である。

【0041】

ある特定の実施形態では、インスリンの濃度は、約0.1 ~ 10,000もしくは1 ~ 1000、もしくは100 ~ 500  $\mu\text{g} / \text{ml}$ 、または約0.1 ~ 1000、1 ~ 1000、10 ~ 1000、20 ~ 1000、30 ~ 1000、40 ~ 1000、50 ~ 1000、60 ~ 1000、70 ~ 1000、80 ~ 1000、90 ~ 1000、100 ~ 1000、200 ~ 1000、300 ~ 1000、400 ~ 1000、500 ~ 1000、600 ~ 1000、700 ~ 1000、800 ~ 1000、900 ~ 1000  $\mu\text{g} / \text{ml}$ 、または約0.1 ~ 500、1 ~ 500、10 ~ 500、20 ~ 500、30 ~ 500、40 ~ 500、50 ~ 500、60 ~ 500、70 ~ 500、80 ~ 500、90 ~ 500、100 ~ 500、200 ~ 500、300 ~ 500、400 ~ 500  $\mu\text{g} / \text{ml}$ 、または約0.1 ~ 400、1 ~ 400、10 ~ 400、20 ~ 400、30 ~ 400、50 ~ 400、40 ~ 400、60 ~ 400、70 ~ 400、80 ~ 400、90 ~ 400、100 ~ 400、200 ~ 400、300 ~ 400  $\mu\text{g} / \text{ml}$ 、または約0.1 ~ 300、1 ~ 300、10 ~ 300、20 ~ 300、30 ~ 300、40 ~ 300、50 ~ 300、60 ~ 300、70 ~ 300、80 ~ 300、90 ~ 300、100 ~ 300、200 ~ 300  $\mu\text{g} / \text{ml}$ 、または約0.1 ~ 200、1 ~ 200、10 ~ 200、20 ~ 200、30 ~ 200、40 ~ 200、50 ~ 200、60 ~ 200、70 ~ 200、80 ~ 200、90 ~ 200、100 ~ 200  $\mu\text{g} / \text{ml}$ の範囲である。特定の実施形態では、インスリンは、ヒトまたはマウスインスリンタンパク質、例えば、組み換えヒトまたはマウスインスリンタンパク質である。いくつかの実施形態では、インスリンは、膵臓抽出物からの溶液または粉末、例えば、ウシ膵臓由来粉末または溶液である。

【0042】

ある特定の実施形態では、トランスフェリンの濃度は、約0.1 ~ 10,000もしくは1 ~ 1000、もしくは1 ~ 100  $\mu\text{g} / \text{ml}$ 、または約0.1 ~ 1000、1 ~ 1000、10 ~ 1000、20 ~ 1000、30 ~ 1000、40 ~ 1000、50 ~ 1000、60 ~ 1000、70 ~ 1000、80 ~ 1000、90 ~ 1000、100 ~ 1000、200 ~ 1000、300 ~ 1000、400 ~ 1000、500 ~ 1000、600 ~ 1000、700 ~ 1000、800 ~ 1000、900 ~ 1000  $\mu\text{g} / \text{ml}$ 、または約0.1 ~ 500、1 ~ 500、10 ~ 500、20 ~ 500、30 ~ 500、40 ~ 500、50 ~ 500、60 ~ 500、70 ~ 500、80 ~ 500、90 ~ 500、100 ~ 500、200 ~ 500、300 ~ 500、400 ~ 500  $\mu\text{g} / \text{ml}$ 、または約0.1 ~ 400、1 ~ 400、10 ~ 400、20 ~ 400、30 ~ 400、50 ~ 400、40 ~ 400、60 ~ 400、70 ~ 400、80 ~ 400、90 ~ 400、100 ~ 400、200 ~ 400、300 ~ 400  $\mu\text{g} / \text{ml}$ 、または約0.1 ~ 300、1 ~ 300、10 ~ 300、20 ~ 300、30 ~ 300、40 ~ 300、50 ~ 300、60 ~ 300、70 ~ 300、80 ~ 300、90 ~ 300、100 ~ 300、200 ~ 300  $\mu\text{g} / \text{ml}$ 、または約0.1 ~ 200、1 ~ 200、10 ~ 200、20 ~ 200、30 ~ 200、40 ~ 200、50 ~ 200、60 ~ 200、70 ~ 200、80 ~ 200、90 ~ 200、100 ~ 200  $\mu\text{g} / \text{ml}$ 、または約0.1 ~ 150、1 ~ 150、10 ~ 150、20 ~ 150、30 ~ 150、40 ~ 150、50 ~ 150、60 ~ 150、70 ~ 150、80 ~ 150、90 ~ 150、100 ~ 150  $\mu\text{g} / \text{ml}$ 、または約0.1 ~ 120、1 ~ 120、10 ~ 120、20 ~ 120、30 ~ 120、40 ~ 120、50 ~ 120、60 ~ 120、70 ~ 120、80 ~ 120、90 ~ 120、100 ~ 120  $\mu\text{g} / \text{ml}$ 、または約0.1 ~ 100、1 ~ 100、10 ~ 100、20 ~ 100、30 ~ 100、40 ~ 100、50 ~ 100、60 ~ 100、70 ~ 100、

80 ~ 100、90 ~ 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の範囲である。

【0043】

ある特定の実施形態では、BSAの濃度は、約5、10、15、20、25、30、35、40、45、50%であるか、または約1 ~ 50%、または約5 ~ 50、10 ~ 50、15 ~ 50、20 ~ 50、25 ~ 50、30 ~ 50、35 ~ 50、40 ~ 50、45 ~ 50%、または約5 ~ 45、10 ~ 45、15 ~ 45、20 ~ 45、25 ~ 45、30 ~ 45、35 ~ 45、40 ~ 45%、または約5 ~ 40、10 ~ 40、15 ~ 40、20 ~ 40、25 ~ 40、30 ~ 40、35 ~ 40%、または約5 ~ 35、10 ~ 35、15 ~ 35、20 ~ 35、25 ~ 35、30 ~ 35%、または約5 ~ 30、10 ~ 30、15 ~ 30、20 ~ 30、25 ~ 30%、または約5 ~ 25、10 ~ 25、15 ~ 25、20 ~ 25%、または約5 ~ 20、10 ~ 20、15 ~ 20%、または約5 ~ 15、10 ~ 15%、または約5 ~ 10%の範囲である。

10

【0044】

ある特定の実施形態では、コレステロールの濃度は、任意選択で、50倍、または100倍、または250倍のストックに対して、約0.1、0.5、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、8.5、9、9.5、または10倍であるか、もしくは約その範囲であるか、または0.1 ~ 10倍もしくは0.1 ~ 10倍、または約0.1 ~ 10、0.2 ~ 10、0.3 ~ 10、0.4 ~ 10、0.5 ~ 10、0.6 ~ 10、0.7 ~ 10、0.8 ~ 10、0.9 ~ 10、1 ~ 10、2 ~ 10、5 ~ 10倍、または約0.1 ~ 5、0.2 ~ 5、0.3 ~ 5、0.4 ~ 5、0.5 ~ 5、0.6 ~ 5、0.7 ~ 5、0.8 ~ 5、0.9 ~ 5、1 ~ 5、2 ~ 5倍、または約0.1 ~ 4、0.2 ~ 4、0.3 ~ 4、0.4 ~ 4、0.5 ~ 4、0.6 ~ 4、0.7 ~ 4、0.8 ~ 4、0.9 ~ 4、1 ~ 4、2 ~ 4倍、または約0.1 ~ 3、0.2 ~ 3、0.3 ~ 3、0.4 ~ 3、0.5 ~ 3、0.6 ~ 3、0.7 ~ 3、0.8 ~ 3、0.9 ~ 3、1 ~ 3、2 ~ 3倍、または約0.1 ~ 2、0.2 ~ 2、0.3 ~ 2、0.4 ~ 2、0.5 ~ 2、0.6 ~ 2、0.7 ~ 2、0.8 ~ 2、0.9 ~ 2、1 ~ 2倍の範囲である。コレステロール(250X)は、例えば、ThermoFisher Scientificから市販されている。

20

【0045】

ある特定の実施形態では、BAFFの濃度は、約0.1 ~ 10,000もしくは1 ~ 1000 ng/ml、または約0.1 ~ 1000、1 ~ 1000、10 ~ 1000、20 ~ 1000、30 ~ 1000、40 ~ 1000、50 ~ 1000、60 ~ 1000、70 ~ 1000、80 ~ 1000、90 ~ 1000、100 ~ 1000、200 ~ 1000、300 ~ 1000、400 ~ 1000、500 ~ 1000、600 ~ 1000、700 ~ 1000、800 ~ 1000、900 ~ 1000 ng/ml、または約0.1 ~ 500、1 ~ 500、10 ~ 500、20 ~ 500、30 ~ 500、40 ~ 500、50 ~ 500、60 ~ 500、70 ~ 500、80 ~ 500、90 ~ 500、100 ~ 500、200 ~ 500、300 ~ 500、400 ~ 500 ng/ml、または約0.1 ~ 400、1 ~ 400、10 ~ 400、20 ~ 400、30 ~ 400、50 ~ 400、40 ~ 400、60 ~ 400、70 ~ 400、80 ~ 400、90 ~ 400、100 ~ 400、200 ~ 400、300 ~ 400 ng/ml、または約0.1 ~ 300、1 ~ 300、10 ~ 300、20 ~ 300、30 ~ 300、40 ~ 300、50 ~ 300、60 ~ 300、70 ~ 300、80 ~ 300、90 ~ 300、100 ~ 300、200 ~ 300 ng/ml、または約0.1 ~ 200、1 ~ 200、10 ~ 200、20 ~ 200、30 ~ 200、40 ~ 200、50 ~ 200、60 ~ 200、70 ~ 200、80 ~ 200、90 ~ 200、100 ~ 200 ng/ml、または約0.1 ~ 150、1 ~ 150、10 ~ 150、20 ~ 150、30 ~ 150、40 ~ 150、50 ~ 150、60 ~ 150、70 ~ 150、80 ~ 150、90 ~ 150、100 ~ 150 ng/ml、または約0.1 ~ 120、1 ~ 120、10 ~ 120、20 ~ 120、30 ~ 120、40 ~ 120、50 ~ 120、60 ~ 120、70 ~ 120、80 ~ 120、90 ~ 120、100 ~ 120 ng/ml、ま

30

40

50

たは約0.1~100、1~100、10~100、20~100、30~100、40~100、50~100、60~100、70~100、80~100、90~100 ng/mlの範囲である。特定の実施形態では、BAFFは、ヒトまたはマウスBAFFタンパク質、例えば、組み換えヒトまたはマウスBAFFタンパク質である。

【0046】

ある特定の実施形態では、2-メルカプトエタノールの濃度は、約0.01~100もしくは0.1~1 mM、または0.01~10、0.02~10、0.03~10、0.04~10、0.05~10、0.06~10、0.07~10、0.08~10、0.09~10、0.1~10、0.5~10、1~10、もしくは5~10 mM、または約0.01~5、0.02~5、0.03~5、0.04~5、0.05~5、0.06~5、0.07~5、0.08~5、0.09~5、0.1~5、0.5~5、1~5 mM、または約0.01~2、0.02~2、0.03~2、0.04~2、0.05~2、0.06~2、0.07~2、0.08~2、0.09~2、0.1~2、0.5~2、1~2 mM、または約0.01~1、0.02~1、0.03~1、0.04~1、0.05~1、0.06~1、0.07~1、0.08~1、0.09~1、0.1~1、0.5~1 mM、または約0.01~0.5、0.02~0.5、0.03~0.5、0.04~0.5、0.05~0.5、0.06~0.5、0.07~0.5、0.08~0.5、0.09~0.5、もしくは0.1~0.5 mM、または約0.01~0.4、0.02~0.4、0.03~0.4、0.04~0.4、0.05~0.4、0.06~0.4、0.07~0.4、0.08~0.4、0.09~0.4、もしくは0.1~0.4 mM、または約0.01~0.3、0.02~0.3、0.03~0.3、0.04~0.3、0.05~0.3、0.06~0.3、0.07~0.3、0.08~0.3、0.09~0.3、もしくは0.1~0.3 mM、または約0.01~0.2、0.02~0.2、0.03~0.2、0.04~0.2、0.05~0.2、0.06~0.2、0.07~0.2、0.08~0.2、0.09~0.2、もしくは0.1~0.2 mMの範囲である。

【0047】

ある特定の実施形態では、及び上記の構成成分に加えて、懸濁培地は、ニコチンアミド、ノギン、R-スポンジン-1、Y27632、線維芽細胞成長因子10 (FGF10)、及びVO-OHPic (前述の全ての組み合わせを含む) から選択される1つ以上の構成成分、例えば、1、2、3、4、5、または6つの構成成分を含む。いくつかの実施形態では、懸濁培地は、ニコチンアミド、ノギン、R-スポンジン-1、Y27632、FGF10、及びVO-OHPicを含む。

【0048】

ある特定の実施形態では、ニコチンアミドの濃度は、約0.1~1000、0.5~1000、1~1000、5~1000、10~1000、50~1000、100~1000、500~1000 mM、または約0.1~500、0.5~500、1~500、5~500、10~500、50~500、100~500 mM、または約0.1~100、0.5~100、1~100、5~100、10~100、50~100 mM、または約0.1~50、0.5~50、1~50、5~50、10~50 mM、または約0.1~40、0.5~40、1~40、5~40、10~40 mM、または約0.1~30、0.5~30、1~30、5~30、10~30 mM、または約0.1~20、0.5~20、1~20、5~20、10~20 mM、または約0.1~10、0.5~10、1~10、5~10 mM、または約0.1~5、0.5~5、1~5 mM、または約0.1~1もしくは0.5~1 mMの範囲である。

【0049】

ある特定の実施形態では、ノギンの濃度は、約0.1~10,000もしくは1~10000 ng/ml、または約0.1~1000、1~1000、10~1000、20~1000、30~1000、40~1000、50~1000、60~1000、70~1000、80~1000、90~1000、100~1000、200~1000、300

10

20

30

40

50

0 ~ 1000、400 ~ 1000、500 ~ 1000、600 ~ 1000、700 ~ 1000、800 ~ 1000、900 ~ 1000 ng/ml、または約0.1 ~ 500、1 ~ 500、10 ~ 500、20 ~ 500、30 ~ 500、40 ~ 500、50 ~ 500、60 ~ 500、70 ~ 500、80 ~ 500、90 ~ 500、100 ~ 500、200 ~ 500、300 ~ 500、400 ~ 500 ng/ml、または約0.1 ~ 400、1 ~ 400、10 ~ 400、20 ~ 400、30 ~ 400、50 ~ 400、40 ~ 400、60 ~ 400、70 ~ 400、80 ~ 400、90 ~ 400、100 ~ 400、200 ~ 400、300 ~ 400 ng/ml、または約0.1 ~ 300、1 ~ 300、10 ~ 300、20 ~ 300、30 ~ 300、40 ~ 300、50 ~ 300、60 ~ 300、70 ~ 300、80 ~ 300、90 ~ 300、100 ~ 300、200 ~ 300 ng/ml、または約0.1 ~ 200、1 ~ 200、10 ~ 200、20 ~ 200、30 ~ 200、40 ~ 200、50 ~ 200、60 ~ 200、70 ~ 200、80 ~ 200、90 ~ 200、100 ~ 200 ng/ml、または約0.1 ~ 150、1 ~ 150、10 ~ 150、20 ~ 150、30 ~ 150、40 ~ 150、50 ~ 150、60 ~ 150、70 ~ 150、80 ~ 150、90 ~ 150、100 ~ 150 ng/ml、または約0.1 ~ 120、1 ~ 120、10 ~ 120、20 ~ 120、30 ~ 120、40 ~ 120、50 ~ 120、60 ~ 120、70 ~ 120、80 ~ 120、90 ~ 120、100 ~ 120 ng/ml、または約0.1 ~ 100、1 ~ 100、10 ~ 100、20 ~ 100、30 ~ 100、40 ~ 100、50 ~ 100、60 ~ 100、70 ~ 100、80 ~ 100、90 ~ 100 ng/mlの範囲である。特定の実施形態では、ノギンは、ヒトまたはマウスノギンタンパク質、例えば、組み換えヒトまたはマウスノギンタンパク質である。

10  
20

【0050】

ある特定の実施形態では、R-スポンジン-1の濃度は、約0.1 ~ 10,000もしくは1 ~ 1000、もしくは100 ~ 1000 ng/ml、または約0.1 ~ 10,000、1 ~ 10,000、10 ~ 10,000、20 ~ 10,000、30 ~ 10,000、40 ~ 10,000、50 ~ 10,000、60 ~ 10,000、70 ~ 10,000、80 ~ 10,000、90 ~ 10,000、100 ~ 10,000、200 ~ 10,000、300 ~ 10,000、400 ~ 10,000、500 ~ 10,000、1000 ~ 10,000、5000 ~ 10,000 ng/ml、または約0.1 ~ 5000、1 ~ 5000、10 ~ 5000、20 ~ 5000、30 ~ 10,000、40 ~ 5000、50 ~ 5000、60 ~ 5000、70 ~ 5000、80 ~ 5000、90 ~ 5000、100 ~ 5000、200 ~ 5000、300 ~ 5000、400 ~ 5000、500 ~ 5000、1000 ~ 5000 ng/ml、または約0.1 ~ 1000、1 ~ 1000、10 ~ 1000、20 ~ 1000、30 ~ 1000、40 ~ 1000、50 ~ 1000、60 ~ 1000、70 ~ 1000、80 ~ 1000、90 ~ 1000、100 ~ 1000、200 ~ 1000、300 ~ 1000、400 ~ 1000、500 ~ 1000、600 ~ 1000、700 ~ 1000、800 ~ 1000、900 ~ 1000 ng/ml、または約0.1 ~ 800、1 ~ 800、10 ~ 800、20 ~ 800、30 ~ 800、40 ~ 800、50 ~ 800、60 ~ 800、70 ~ 800、80 ~ 800、90 ~ 800、100 ~ 800、200 ~ 800、300 ~ 800、400 ~ 800、500 ~ 800、600 ~ 800、700 ~ 800 ng/ml、または約0.1 ~ 700、1 ~ 700、10 ~ 700、20 ~ 700、30 ~ 700、40 ~ 700、50 ~ 700、60 ~ 700、70 ~ 700、80 ~ 700、90 ~ 700、100 ~ 700、200 ~ 700、300 ~ 700、400 ~ 700、500 ~ 700、600 ~ 700 ng/ml、または約0.1 ~ 600、1 ~ 600、10 ~ 600、20 ~ 600、30 ~ 600、40 ~ 600、50 ~ 600、60 ~ 600、70 ~ 600、80 ~ 600、90 ~ 600、100 ~ 600、200 ~ 600、300 ~ 600、400 ~ 600、500 ~ 600 ng/ml、または約0.1 ~ 500、1 ~ 500、10 ~ 500、20 ~ 500、30 ~ 500、40 ~ 500、50 ~ 500、60 ~ 500、70 ~ 500、80 ~ 500、90 ~ 500、100 ~ 500、200 ~ 500、300 ~ 500、400 ~ 500 ng/mlの範囲で

30  
40  
50

ある。特定の実施形態では、R - スポンジン - 1 は、ヒトまたはマウス R - スポンジン - 1 タンパク質、例えば、組み換えヒトまたはマウス R - スポンジン - 1 タンパク質である。

【0051】

ある特定の実施形態では、Y27632の濃度は、約0.1~1000、0.5~1000、1~1000、5~1000、10~1000、50~1000、100~1000、500~1000  $\mu\text{M}$ 、または約0.1~500、0.5~500、1~500、5~500、10~500、50~500、100~500  $\mu\text{M}$ 、または約0.1~100、0.5~100、1~100、5~100、10~100、50~100  $\mu\text{M}$ 、または約0.1~50、0.5~50、1~50、5~50、10~50  $\mu\text{M}$ 、または約0.1~40、0.5~40、1~40、5~40、10~40  $\mu\text{M}$ 、または約0.1~30、0.5~30、1~30、5~30、10~30  $\mu\text{M}$ 、または約0.1~20、0.5~20、1~20、5~20、10~20  $\mu\text{M}$ 、または約0.1~10、0.5~10、1~10、5~10  $\mu\text{M}$ 、または約0.1~5、0.5~5、1~5  $\mu\text{M}$ 、または約0.1~1もしくは0.5~1  $\mu\text{M}$ の範囲である。

10

【0052】

ある特定の実施形態では、FGF10の濃度は、約0.1~10,000もしくは1~1000 ng/ml、または約0.1~1000、1~1000、10~1000、20~1000、30~1000、40~1000、50~1000、60~1000、70~1000、80~1000、90~1000、100~1000、200~1000、300~1000、400~1000、500~1000、600~1000、700~1000、800~1000、900~1000 ng/ml、または約0.1~500、1~500、10~500、20~500、30~500、40~500、50~500、60~500、70~500、80~500、90~500、100~500、200~500、300~500、400~500 ng/ml、または約0.1~400、1~400、10~400、20~400、30~400、50~400、40~400、60~400、70~400、80~400、90~400、100~400、200~400、300~400 ng/ml、または約0.1~300、1~300、10~300、20~300、30~300、40~300、50~300、60~300、70~300、80~300、90~300、100~300、200~300 ng/ml、または約0.1~200、1~200、10~200、20~200、30~200、40~200、50~200、60~200、70~200、80~200、90~200、100~200 ng/ml、または約0.1~150、1~150、10~150、20~150、30~150、40~150、50~150、60~150、70~150、80~150、90~150、100~150 ng/ml、または約0.1~120、1~120、10~120、20~120、30~120、40~120、50~120、60~120、70~120、80~120、90~120、100~120 ng/ml、または約0.1~100、1~100、10~100、20~100、30~100、40~100、50~100、60~100、70~100、80~100、90~100 ng/mlの範囲である。特定の実施形態では、FGF10は、ヒトまたはマウスFGF10タンパク質、例えば、組み換えヒトまたはマウスFGF10タンパク質である。

20

30

40

【0053】

ある特定の実施形態では、VO-OHPicの濃度は、約0.01~100もしくは0.1~1  $\mu\text{M}$ 、または0.01~10、0.02~10、0.03~10、0.04~10、0.05~10、0.06~10、0.07~10、0.08~10、0.09~10、0.1~10、0.5~10、1~10、もしくは5~10  $\mu\text{M}$ 、または約0.01~5、0.02~5、0.03~5、0.04~5、0.05~5、0.06~5、0.07~5、0.08~5、0.09~5、0.1~5、0.5~5、1~5  $\mu\text{M}$ 、または約0.01~2、0.02~2、0.03~2、0.04~2、0.05~2、0.06~2、0.07~2、0.08~2、0.09~2、0.1~2、0.5~2、1~2  $\mu$

50

M、または約0.01~1、0.02~1、0.03~1、0.04~1、0.05~1、0.06~1、0.07~1、0.08~1、0.09~1、0.1~1、0.5~1  $\mu$ M、または約0.01~0.5、0.02~0.5、0.03~0.5、0.04~0.5、0.05~0.5、0.06~0.5、0.07~0.5、0.08~0.5、0.09~0.5、もしくは0.1~0.5  $\mu$ M、または約0.01~0.4、0.02~0.4、0.03~0.4、0.04~0.4、0.05~0.4、0.06~0.4、0.07~0.4、0.08~0.4、0.09~0.4、もしくは0.1~0.4  $\mu$ M、または約0.01~0.3、0.02~0.3、0.03~0.3、0.04~0.3、0.05~0.3、0.06~0.3、0.07~0.3、0.08~0.3、0.09~0.3、もしくは0.1~0.3  $\mu$ M、または約0.01~0.2、0.02~0.2、0.03~0.2、0.04~0.2、0.05~0.2、0.06~0.2、0.07~0.2、0.08~0.2、0.09~0.2、もしくは0.1~0.2  $\mu$ Mの範囲である。市販のVO-OHPicの特定の例としては、VO-OHPic三水和物を含む。

10

#### 【0054】

ある特定の実施形態では、及び上記の構成成分に加えて、懸濁液培地は、上皮成長因子(EGF)、肝細胞成長因子(HGF)、インスリン様成長因子(IGF)、血管内皮成長因子(VEGF)、血小板由来成長因子(PDGF)、N2サプリメント、B27、プロスタグランジンE2(PGE-2)、及びN-アセチル-L-システイン(前述の全ての組み合わせを含む)から選択される1つ以上の構成成分、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、または9つの構成成分を含む。特定の実施形態では、及び上記の構成成分に加えて、懸濁液培地は、EGF、HGF、IGF、VEGF、PDGF、N2、B27、PGE2、及びN-アセチル-L-システインを含む。

20

#### 【0055】

ある特定の実施形態では、EGFの濃度は、約0.1~1000もしくは1~1000 ng/ml、または約0.1~1000、0.5~1000、1~1000、5~1000、10~1000、50~1000、100~1000、500~1000 ng/ml、または約0.1~500、0.5~500、1~500、5~500、10~500、50~500、100~500 ng/ml、または約0.1~100、0.5~100、1~100、5~100、10~100、50~100 ng/ml、または約0.1~50、0.5~50、1~50、5~50、10~50 ng/ml、または約0.1~40、0.5~40、1~40、5~40、10~40 ng/ml、または約0.1~30、0.5~30、1~30、5~30、10~30 ng/ml、または約0.1~20、0.5~20、1~20、5~20、10~20 ng/ml、または約0.1~10、0.5~10、1~10、5~10 ng/ml、または約0.1~5、0.5~5、1~5 ng/ml、または約0.1~1もしくは0.5~1 ng/mlの範囲である。特定の実施形態では、EGFは、ヒトまたはマウスEGFタンパク質、例えば、組み換えヒトまたはマウスEGFタンパク質である。

30

#### 【0056】

ある特定の実施形態では、HGFの濃度は、約0.1~1000もしくは1~1000 ng/ml、または約0.1~1000、0.5~1000、1~1000、5~1000、10~1000、50~1000、100~1000、500~1000 ng/ml、または約0.1~500、0.5~500、1~500、5~500、10~500、50~500、100~500 ng/ml、または約0.1~100、0.5~100、1~100、5~100、10~100、50~100 ng/ml、または約0.1~50、0.5~50、1~50、5~50、10~50 ng/ml、または約0.1~40、0.5~40、1~40、5~40、10~40 ng/ml、または約0.1~30、0.5~30、1~30、5~30、10~30 ng/ml、または約0.1~20、0.5~20、1~20、5~20、10~20 ng/ml、または約0.1~10、0.5~10、1~10、5~10 ng/ml、または約0.1~5、0.5~5、1~5 ng/ml

40

50

/ml、または約0.1~1もしくは0.5~1 ng/mlの範囲である。特定の実施形態では、HGFは、ヒトまたはマウスHGFタンパク質、例えば、組み換えヒトまたはマウスHGFタンパク質である。

【0057】

ある特定の実施形態では、IGFの濃度は、約0.1~1000もしくは1~100 ng/ml、または約0.1~1000、0.5~1000、1~1000、5~1000、10~1000、50~1000、100~1000、500~1000 ng/ml、または約0.1~500、0.5~500、1~500、5~500、10~500、50~500、100~500 ng/ml、または約0.1~100、0.5~100、1~100、5~100、10~100、50~100 ng/ml、または約0.1~50、0.5~50、1~50、5~50、10~50 ng/ml、または約0.1~40、0.5~40、1~40、5~40、10~40 ng/ml、または約0.1~30、0.5~30、1~30、5~30、10~30 ng/ml、または約0.1~20、0.5~20、1~20、5~20、10~20 ng/ml、または約0.1~10、0.5~10、1~10、5~10 ng/ml、または約0.1~5、0.5~5、1~5 ng/ml、または約0.1~1もしくは0.5~1 ng/mlの範囲である。特定の実施形態では、IGFは、ヒトまたはマウスIGFタンパク質、例えば、組み換えヒトまたはマウスIGFタンパク質である。

10

【0058】

ある特定の実施形態では、VEGFの濃度は、約0.1~1000もしくは1~100 ng/ml、または約0.1~1000、0.5~1000、1~1000、5~1000、10~1000、50~1000、100~1000、500~1000 ng/ml、または約0.1~500、0.5~500、1~500、5~500、10~500、50~500、100~500 ng/ml、または約0.1~100、0.5~100、1~100、5~100、10~100、50~100 ng/ml、または約0.1~50、0.5~50、1~50、5~50、10~50 ng/ml、または約0.1~40、0.5~40、1~40、5~40、10~40 ng/ml、または約0.1~30、0.5~30、1~30、5~30、10~30 ng/ml、または約0.1~20、0.5~20、1~20、5~20、10~20 ng/ml、または約0.1~10、0.5~10、1~10、5~10 ng/ml、または約0.1~5、0.5~5、1~5 ng/ml、または約0.1~1もしくは0.5~1 ng/mlの範囲である。特定の実施形態では、VEGFは、ヒトまたはマウスVEGFタンパク質、例えば、組み換えヒトまたはマウスVEGFタンパク質である。

20

30

【0059】

ある特定の実施形態では、PDGFの濃度は、約0.1~1000もしくは1~100 ng/ml、または約0.1~1000、0.5~1000、1~1000、5~1000、10~1000、50~1000、100~1000、500~1000 ng/ml、または約0.1~500、0.5~500、1~500、5~500、10~500、50~500、100~500 ng/ml、または約0.1~100、0.5~100、1~100、5~100、10~100、50~100 ng/ml、または約0.1~50、0.5~50、1~50、5~50、10~50 ng/ml、または約0.1~40、0.5~40、1~40、5~40、10~40 ng/ml、または約0.1~30、0.5~30、1~30、5~30、10~30 ng/ml、または約0.1~20、0.5~20、1~20、5~20、10~20 ng/ml、または約0.1~10、0.5~10、1~10、5~10 ng/ml、または約0.1~5、0.5~5、1~5 ng/ml、または約0.1~1もしくは0.5~1 ng/mlの範囲である。特定の実施形態では、PDGFは、ヒトまたはマウスPDGFタンパク質、例えば、組み換えヒトまたはマウスPDGFタンパク質である。

40

【0060】

ある特定の実施形態では、N2の濃度は、任意選択で、50倍または100倍のストッ

50

クに対して、約0.1、0.5、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、8.5、9、9.5、または10倍であるか、または0.1~10倍もしくは0.1~10倍、または約0.1~10、0.2~10、0.3~10、0.4~10、0.5~10、0.6~10、0.7~10、0.8~10、0.9~10、1~10、2~10、5~10倍、または約0.1~5、0.2~5、0.3~5、0.4~5、0.5~5、0.6~5、0.7~5、0.8~5、0.9~5、1~5、2~5倍、または約0.1~4、0.2~4、0.3~4、0.4~4、0.5~4、0.6~4、0.7~4、0.8~4、0.9~4、1~4、2~4倍、または約0.1~3、0.2~3、0.3~3、0.4~3、0.5~3、0.6~3、0.7~3、0.8~3、0.9~3、1~3、2~3倍、または約0.1~2、0.2~2、0.3~2、0.4~2、0.5~2、0.6~2、0.7~2、0.8~2、0.9~2、1~2倍の範囲である。N2サプリメント(100X)は、例えば、ThermoFisher Scientific及びStemcell Technologiesから市販されている。

10

#### 【0061】

ある特定の実施形態では、B27の濃度は、任意選択で、50倍または100倍のストックに対して、約0.1、0.5、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、8.5、9、9.5、または10倍であるか、または0.1~10倍もしくは0.1~10倍、または約0.1~10、0.2~10、0.3~10、0.4~10、0.5~10、0.6~10、0.7~10、0.8~10、0.9~10、1~10、2~10、5~10倍、または約0.1~5、0.2~5、0.3~5、0.4~5、0.5~5、0.6~5、0.7~5、0.8~5、0.9~5、1~5、2~5倍、または約0.1~4、0.2~4、0.3~4、0.4~4、0.5~4、0.6~4、0.7~4、0.8~4、0.9~4、1~4、2~4倍、または約0.1~3、0.2~3、0.3~3、0.4~3、0.5~3、0.6~3、0.7~3、0.8~3、0.9~3、1~3、2~3倍、または約0.1~2、0.2~2、0.3~2、0.4~2、0.5~2、0.6~2、0.7~2、0.8~2、0.9~2、1~2倍の範囲である。B27(登録商標)サプリメント(50倍)は、例えば、ThermoFisher Scientificから市販されている。

20

#### 【0062】

ある特定の実施形態では、PGE-2の濃度は、約0.1~1000、0.5~1000、1~1000、5~1000、10~1000、50~1000、100~1000、500~1000 nM、または約0.1~500、0.5~500、1~500、5~500、10~500、50~500、100~500 nM、または約0.1~100、0.5~100、1~100、5~100、10~100、50~100 nM、または約0.1~50、0.5~50、1~50、5~50、10~50 nM、または約0.1~40、0.5~40、1~40、5~40、10~40 nM、または約0.1~30、0.5~30、1~30、5~30、10~30 nM、または約0.1~20、0.5~20、1~20、5~20、10~20 nM、または約0.1~10、0.5~10、1~10、5~10 nM、または約0.1~5、0.5~5、1~5 nM、または約0.1~1もしくは0.5~1 nMであるか、またはこれらの範囲である。

30

40

#### 【0063】

ある特定の実施形態では、N-アセチル-L-システインの濃度は、約0.1~100もしくは0.1~10もしくは0.5~10 mM、または約0.1~100、0.2~100、0.3~100、0.4~100、0.5~100、0.6~100、0.7~100、0.8~100、0.9~100、1~100、2~100、3~100、4~100、5~100、10~100、50~100 mM、または約0.1~50、0.2~50、0.3~50、0.4~50、0.5~50、0.6~50、0.7~50、0.8~50、0.9~50、1~50、2~50、3~50、4~50、5~50、10~50 mM、または約0.1~10、0.2~10、0.3~10、0.4~10、0.5

50

～10、0.6～10、0.7～10、0.8～10、0.9～10、1～10、2～10、3～10、4～10、5～10 mM、または約0.1～5、0.2～5、0.3～5、0.4～5、0.5～5、0.6～5、0.7～5、0.8～5、0.9～5、1～5、2～5、3～5、4～5 mM、または約0.1～2、0.2～2、0.3～2、0.4～2、0.5～2、0.6～2、0.7～2、0.8～2、0.9～2、1～2 mMの範囲である。

【0064】

特定の実施形態では、懸濁液培地は、ニコチンアミド、ノギン、R-スポンジン-1、Y27632、EGF、HGF、IGF、VEGF、PDGF、N2、B27、PGE2、N-アセチル-L-システイン、FGF10、及びVO-OHpicを含む。

10

【0065】

ある特定の実施形態では、培地懸濁液は、細胞外基質(ECM)構成成分が省かれるか、またはさもなければそれを含まない。単に例示として、培地懸濁液は、コラーゲン、マトリゲル、ラミニン、及び/またはフィブロネクチンを含まない。

【0066】

いくつかの実施形態では、腫瘍細胞クラスターは、ヒト患者、例えば、ヒト患者に直接由来する一次腫瘍細胞から得られる。ある特定の実施形態では、腫瘍細胞クラスターは、腫瘍細胞で異種移植された免疫不全動物から単離される、つまり、腫瘍細胞は、患者由来の異種移植片(PDX)である。直接患者から、またはPDXを介して間接的に単離された腫瘍細胞クラスターの特定の例には、肺癌細胞、結腸癌細胞、胃癌細胞、及び乳癌細胞が含まれる。いくつかの実施形態では、腫瘍細胞クラスターは、ヒト患者から除去された腫瘍試料から直接単離され、その例としては、外科試料、生検、胸水、及び腹水液が挙げられる。腫瘍細胞は、患者から直接、または例えば、患者の医療及び癌治療において役割を果たす医師もしくは他の医療提供者から得ることができる。

20

【0067】

また、試料(例えば、本明細書に記載される)からヒト腫瘍細胞クラスターの集団を得ることと、本明細書に記載される培地懸濁液中でヒト腫瘍細胞クラスターの集団を培養することを含む、ヒト腫瘍細胞の増殖方法も含まれる。いくつかの実施形態では、ヒト腫瘍細胞クラスターは、約14日以内、または約14、13、12、11、10、9、8、7、6、または5日以内の間、または約5～14、6～14、7～14、8～14、9～14、10～14、11～14、12～14、もしくは13～14日以内の間、または約5～13、6～13、7～13、8～13、9～13、10～13、11～13、もしくは12～13日以内の間、または約5～12、6～12、7～12、8～12、9～12、10～12、もしくは11～12日以内の間、または約5～11、6～11、7～11、8～11、9～11、もしくは10～11日以内の間、または約5～10、6～10、7～10、8～10、もしくは9～10日以内の間、または約5～9、6～9、7～9、もしくは8～9日以内の間、または約5～8、6～8、もしくは7～8日以内の間、または約5～7もしくは6～7日以内の間、培養懸濁液中で培養される。

30

【0068】

いくつかの実施形態では、本方法は、培地懸濁液は、約14、13、12、11、10、9、8、7、6、または5日以内に腫瘍細胞クラスターの約もしくは少なくとも約10、20、30、40、50、60、70、80、90、または100%(全ての組み合わせ、整数、及びその間の範囲を含む)の増殖をもたらす。例えば、ある特定の方法は、任意選択で、約14、13、12、11、10、9、8、7、6、または5日以内に、または5～14、6～14、7～14、8～14、9～14、10～14、11～14、12～14、もしくは13～14日以内に、または約5～13、6～13、7～13、8～13、9～13、10～13、11～13、もしくは12～13日以内に、または約5～12、6～12、7～12、8～12、9～12、10～12、もしくは11～12日以内に、または約5～11、6～11、7～11、8～11、9～11、もしくは10～11日以内に、または約5～10、6～10、7～10、8～10、もしくは9～10日以内

40

50

に、または約 5 ~ 9、6 ~ 9、7 ~ 9、もしくは 8 ~ 9 日以内に、または約 5 ~ 8、6 ~ 8、もしくは 7 ~ 8 日以内に、または約 5 ~ 7 もしくは 6 ~ 7 日以内に、または約 5 ~ 6 日以内に、腫瘍細胞クラスターの約または少なくとも約 10 ~ 15、10 ~ 20、10 ~ 25、10 ~ 30、10 ~ 35、10 ~ 40、10 ~ 45、10 ~ 50、10 ~ 55、10 ~ 60、10 ~ 65、10 ~ 70、10 ~ 75、10 ~ 80、10 ~ 85、10 ~ 90、10 ~ 95、もしくは 10 ~ 100 % の増殖、または腫瘍細胞クラスターの約または少なくとも約 15 ~ 20、15 ~ 25、15 ~ 30、15 ~ 35、15 ~ 40、15 ~ 45、15 ~ 50、15 ~ 55、15 ~ 60、15 ~ 65、15 ~ 70、15 ~ 75、15 ~ 80、15 ~ 85、15 ~ 90、15 ~ 95、もしくは 15 ~ 100 % の増殖、または腫瘍細胞クラスターの約または少なくとも約 20 ~ 25、20 ~ 30、20 ~ 35、20 ~ 40、20 ~ 45、20 ~ 50、20 ~ 55、20 ~ 60、20 ~ 65、20 ~ 70、20 ~ 75、20 ~ 80、20 ~ 85、20 ~ 90、20 ~ 95、もしくは 20 ~ 100 % の増殖、または腫瘍細胞クラスターの約または少なくとも約 25 ~ 30、25 ~ 35、25 ~ 40、25 ~ 45、25 ~ 50、25 ~ 55、25 ~ 60、25 ~ 65、25 ~ 70、25 ~ 75、25 ~ 80、25 ~ 85、25 ~ 90、25 ~ 95、もしくは 25 ~ 100 % の増殖、または腫瘍細胞クラスターの約または少なくとも約 30 ~ 35、30 ~ 40、30 ~ 45、30 ~ 50、30 ~ 55、30 ~ 60、30 ~ 65、30 ~ 70、30 ~ 75、30 ~ 80、30 ~ 85、30 ~ 90、30 ~ 95、もしくは 30 ~ 100 % の増殖、または腫瘍細胞クラスターの約または少なくとも約 35 ~ 40、35 ~ 45、35 ~ 50、35 ~ 55、35 ~ 60、35 ~ 65、35 ~ 70、35 ~ 75、35 ~ 80、35 ~ 85、35 ~ 90、35 ~ 95、もしくは 35 ~ 100 % の増殖、または腫瘍細胞クラスターの約または少なくとも約 40 ~ 45、40 ~ 50、40 ~ 55、40 ~ 60、40 ~ 65、40 ~ 70、40 ~ 75、40 ~ 80、40 ~ 85、40 ~ 90、40 ~ 95、もしくは 40 ~ 100 % の増殖、または腫瘍細胞クラスターの約または少なくとも約 45 ~ 50、45 ~ 55、45 ~ 60、45 ~ 65、45 ~ 70、45 ~ 75、45 ~ 80、45 ~ 85、45 ~ 90、45 ~ 95、もしくは 45 ~ 100 % の増殖、または腫瘍細胞クラスターの約または少なくとも約 50 ~ 55、50 ~ 60、50 ~ 65、50 ~ 70、50 ~ 75、50 ~ 80、50 ~ 85、50 ~ 90、50 ~ 95、もしくは 50 ~ 100 % の増殖、または腫瘍細胞クラスターの約または少なくとも約 55 ~ 60、55 ~ 65、55 ~ 70、55 ~ 75、55 ~ 80、55 ~ 85、55 ~ 90、55 ~ 95、もしくは 55 ~ 100 % の増殖、または腫瘍細胞クラスターの約または少なくとも約 60 ~ 65、60 ~ 70、60 ~ 75、60 ~ 80、60 ~ 85、60 ~ 90、60 ~ 95、もしくは 60 ~ 100 % の増殖、または腫瘍細胞クラスターの約または少なくとも約 65 ~ 70、65 ~ 75、65 ~ 80、65 ~ 85、65 ~ 90、65 ~ 95、もしくは 65 ~ 100 % の増殖、または腫瘍細胞クラスターの約または少なくとも約 70 ~ 80、70 ~ 85、70 ~ 90、70 ~ 95、もしくは 70 ~ 100 % の増殖、または腫瘍細胞クラスターの約または少なくとも約 75 ~ 80、75 ~ 85、75 ~ 90、75 ~ 95、もしくは 75 ~ 100 % の増殖、または腫瘍細胞クラスターの約または少なくとも約 80 ~ 85、80 ~ 90、80 ~ 95、もしくは 80 ~ 100 % の増殖、または腫瘍細胞クラスターの約または少なくとも約 85 ~ 90、85 ~ 95、もしくは 85 ~ 100 % の増殖、または腫瘍細胞クラスターの約または少なくとも約 90 ~ 95 もしくは 90 ~ 100 % の増殖、または腫瘍細胞クラスターの約または少なくとも約 95 ~ 100 % の増殖をもたらす。特定の方法は、約 7 日以内に腫瘍細胞クラスターの少なくとも約 20 ~ 30 % の増殖、または約 7 日以内に腫瘍細胞クラスターの少なくとも約 60 % の増殖をもたらす。

【0069】

上述のように、本明細書に記載される懸濁液培地及び方法は、とりわけ、患者腫瘍の、1 つ以上の治療薬に対する潜在的応答性を評価するために、及び比較的短時間、例えば、1 または 2 週間以内に患者に最適な治療選択肢を特定する利点を提供するために使用され得る。よって、特定の実施形態は、ヒト患者から腫瘍細胞クラスターの集団を得ることと、先行請求項のいずれか 1 項に記載の培地懸濁液中で腫瘍細胞クラスターの集団を培養す

ることと、治療薬または薬物を培地懸濁液に与薬することと、腫瘍細胞の集団における腫瘍細胞増殖及び/または腫瘍細胞アポトーシスを測定することとを含む、ヒト患者の治療薬（例えば、薬物または候補薬物）に対する応答性の試験方法を含む。

【0070】

いくつかの実施形態では、腫瘍細胞増殖の減少（例えば、統計的に有意な減少）は、ヒト患者（即ち、ヒト患者の腫瘍）の治療薬に対する応答性を示し、いくつかの実施形態では、腫瘍細胞増殖の減少の欠如（例えば、統計的に有意な減少の欠如）は、ヒト患者（即ち、ヒト患者の腫瘍）の治療薬に対する耐性及び非応答性の可能性を示す。いくつかの実施形態では、腫瘍細胞アポトーシスの誘導（例えば、統計的に有意な増加）は、ヒト患者（即ち、ヒト患者の腫瘍）の治療薬に対する応答性を示す。特定の実施形態では、腫瘍細胞増殖の増加の欠如（例えば、統計的に有意な増加の欠如）は、ヒト患者（即ち、ヒト患者の腫瘍）の治療薬に対する耐性及び非応答性の可能性を示す。ある特定の実施形態では、腫瘍細胞増殖の減少及び腫瘍細胞アポトーシスの誘導は、ヒト患者の治療薬に対する応答性を示し、腫瘍細胞増殖の減少の欠如は、ヒト患者の治療薬に対する耐性及び非応答性の可能性を示す。

10

【0071】

いくつかの実施形態では、応答性の試験方法は、培地懸濁液中で腫瘍細胞クラスターの集団を培養した日と同日に（例えば、同時にまたは実質的に同時に）治療薬を与薬することを含む。ある特定の実施形態は、培地懸濁液中で腫瘍細胞クラスターの集団を培養した約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、または24時間以内に治療薬を与薬することを含む。培地懸濁液中で腫瘍細胞クラスターの集団を培養した約1、2、3、4、5、6、または7日後に、またはそれ以内に治療薬を与薬することを含む方法も含まれ、培地懸濁液中で腫瘍細胞クラスターの集団を培養した約1～7、1～6、1～5、1～4、1～3、1～2、もしくは2～7、2～6、2～5、2～4、2～3、または3～7、3～6、3～5、3～4、または4～7、4～6、4～5、または5～7、5～6、または6～7日後に、またはそれ以内に治療薬を与薬する方法も含む。

20

【0072】

ある特定の実施形態は、治療薬の与薬約14日以内に、例えば、治療薬の与薬約14、13、12、11、10、9、8、7、6、または5日以内に、腫瘍細胞の集団における腫瘍細胞増殖及び/または腫瘍細胞アポトーシスを測定するステップを含む。特定の実施形態は、治療薬の与薬約5～14、6～14、7～14、8～14、9～14、10～14、11～14、12～14、もしくは13～14日以内に、または約5～13、6～13、7～13、8～13、9～13、10～13、11～13、もしくは12～13日以内に、または約5～12、6～12、7～12、8～12、9～12、10～12、もしくは11～12日以内に、または約5～11、6～11、7～11、8～11、9～11、もしくは10～11日以内に、または約5～10、6～10、7～10、8～10、もしくは9～10日以内に、または約5～9、6～9、7～9、もしくは8～9日以内に、または約5～8、6～8、もしくは7～8日以内に、または約5～7もしくは6～7日以内に、または約5～6日以内に腫瘍細胞の集団における腫瘍細胞増殖及び/または腫瘍細胞アポトーシスを測定するステップを含む。

30

40

【0073】

ある特定の実施形態では、試験のための治療薬または薬物は小分子である。例示的な小分子としては、細胞傷害性薬、化学療法薬、及び抗血管新生薬、例えば、様々な癌の治療に有用であると考えられているものが挙げられる。小分子の特定のクラスとしては、アルキル化剤、代謝拮抗剤、アントラサイクリン、抗腫瘍抗生物質、白金、I型トポイソメラーゼ阻害剤、II型トポイソメラーゼ阻害剤、ピンカルカロイド、及びタキサンが挙げられるが、これらに限定されない。

【0074】

小分子の特定の例としては、クロラムブルシル、シクロホスファミド、シレンジチド、

50

ロムスチン (CCNU)、メルファラン、プロカルバジン、チオテバ、カルムスチン (BCNU)、エンザスタウリン、ブスルファン、ダウノルビシン、ドキシソルビシン、ゲフィチニブ、エルロチニブ、エルロチニブ イダルビシン、テモゾロミド、エビルビシン、ミトキサントロン、プレオマイシン、シスプラチン、カルボプラチン、オキサリプラチン、カンプトテシン、イリノテカン、トポテカン、アムサクリン、エトポシド、リン酸エトポシド、テニポシド、テムシロリムス、エベロリムス、ピンクリスチン、ピンブラスチン、ビノレルビン、ビンデシン、CT52923、及びバクリタキセル、ならびに上記のいずれかの薬学的に許容される塩、酸、または誘導体が挙げられる。小分子のさらなる例としては、イマチニブ、クリゾチニブ、ダサチニブ、ソラフェニブ、パゾパニブ、スニチニブ、パタラニブ、ゲフチニブ、エルロチニブ、AEE-788、ジコロアセテート、タモキシフェン、ファスジル、SB-681323、及びセマキサニブ (SU5416) (Chico et al., Nat Rev Drug Discov. 8: 829-909, 2009を参照されたい) が挙げられる。

#### 【0075】

小分子のさらなる例としては、チオテバ、シクロホスファミド (CYTOXAN (商標)) などのアルキル化剤；ブスルファン、インプロスルファン、及びピボスルファンなどのスルホン酸アルキル；ベンゾドパ、カルボコン、メツレドパ、及びウレドパなどのアジリジン、エチレンイミン及びメチルアメラミン (アルトレタミン、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホラミド、トリエチレンチオホスホラミド及びトリメチローロメラミン (trimethylolomelamine) を含む)；クロラムブシル、クロルナファジン、コロホスファミド (cholophosphamide)、エストラムスチン、イホスファミド、メクロレタミン、メクロレタミンオキシド塩酸塩、メルファラン、ノベンピキン、フェネステリン、プレドニムスチン、トロホスファミド、ウラシルマスタードなどのナイトロジェンマスタード；カルムスチン、クロロゾトシン、ホテムスチン、ロムスチン、ニムスチン、ラニムスチンなどのニトロソ尿素；アクラシノマイシン、アクチノマイシン、アウトラマイシン (authramycin)、アザセリン、プレオマイシン、カクチノマイシン、カリケアマイシン、カラビシン、カルミノマイシン、カルジノフィリン、クロモマイシン、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、デトルビシン、6-ジアゾ-5-オキソ-L-ノルロイシン、ドキシソルビシン、エビルビシン、エソルビシン、イダルビシン、マルセロマイシン、マイトマイシン、ミコフェノール酸、ノガラマイシン、オリボマイシン、ペプロマイシン、ポトフィロマイシン、ピューロマイシン、ケラマイシン (quelamycin)、ロドルビシン、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、ツベルシジン、ウベニメクス、ジノスタチン、ゾルビシンなどの抗生物質；メトトレキサート及び5-フルオロウラシル (5-FU) などの代謝拮抗剤；デノプテリン、メトトレキサート、プテロプテリン、トリメトトレキサートなどの葉酸類似体；フルダラビン、6-メルカプトプリン、チアミプリン、チオグアニンなどのプリン類似体；アンシタビン、アザシチジン、6-アザウリジン、カルモフル、シタラビン、ジデオキシウリジン、ドキシフルリジン、エノシタビン、フロクスウリジン、5-FUなどのピリミジン類似体；カルステロン、プロピオン酸ドロモスタノロン、エピチオスタノール、メピチオスタン、テストラクトンなどのアンドロゲン；アミノグルテチミド、ミトタン、トリロスタンなどの抗副腎薬；フロリン酸 (frolinic acid) などの葉酸補充薬；アセグラトン；アルドホスファミドグリコシド；アミノレプリン酸；アムサクリン；ベストラブシル；ピサントレン；エダトラキサート；デフォファミン；デメコルチン；ジアジコン；エルフォルミチン；酢酸エリブチニウム；エトグルシド；硝酸ガリウム；ヒドロキシ尿素；レンチナン；ロニダミン；ミトグアゾン；ミトキサントロン；モビダモール；ニトラクリン；ペントスタチン；フェナメット；ピラルビシン；ポドフィリン酸；2-エチルヒドラジド；プロカルバジン；PSK；ラゾキサニ；シゾフィラン；スピロゲルマニウム；テヌアゾン酸；トリアジコン；2, 2', 2''-トリクロロトリエチルアミン；ウレタン；ビンデシン；ダカルバジン；マンノムスチン；ミトプロニトール；ミトラクトール；ピボプロマン；ガシトシン (gacytosine)；アラビノシド (「Ara-C」)；シ

10

20

30

40

50

クロホスファミド；チオテパ；タキソイド、例えば、パクリタキセル（TAXOL（登録商標）、Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.）及びドセタキセル（TAXOTERE（登録商標）、Rhne-Poulenc Rorer, Antony, France）；クロラムブシル；ゲムシタピン；6-チオグアニン；メルカプトプリン；メトトレキサート；シスプラチン及びカルボプラチンなどの白金類似体；白金；エトポシド（VP-16）；イホスファミド；マイトマイシンC；ミトキサントロン；ピンクリスチン；ビノレルピン；ナベルピン；ノバントロン；テニポシド；ダウノマイシン；アミノプテリン；ゼローダ；イバンドロナート；CPT-11；トポイソメラーゼ阻害剤RFS 2000；ジフルオロメチルオミチン（difluoromethylomithine）（DMFO）；Targretin（商標）（ベキサロテン）、Panretin（商標）（アリトレチノイン）などのレチノイン酸誘導体；ONTAK（商標）（デニロイキンジフチトクス）；エスペラミシン；カペシタピン；ならびに上記のいずれかの薬学的に許容される塩、酸、または誘導体が挙げられる。

10

#### 【0076】

例えば、タモキシフェン、ラロキシフェン、アロマターゼ阻害4（5）-イミダゾール、4-ヒドロキシタモキシフェン、トリオキシフェン、ケオキシフェン、LY 117018、オンプリストン、及びトレミフェン（Fareston）を含む抗エストロゲン；ならびにフルタミド、ニルタミド、ピカルタミド、ロイプロリド、及びゴセレリンなどの抗アンドロゲン；上記のいずれかの薬学的に許容される塩、酸、または誘導体などの腫瘍に対するホルモン作用を調節または阻害するように作用する抗ホルモン剤も含まれる。

20

#### 【0077】

いくつかの実施形態では、治療薬は、抗体またはその抗原結合断片である。ある特定の実施形態では、抗体もしくはその抗原結合断片または他のポリペプチドは、癌関連抗原または癌抗原、例えば、試験される腫瘍細胞クラスターによって発現される癌抗原に特異的に結合する。例示的な癌抗原としては、細胞表面受容体などの細胞表面タンパク質が挙げられる。かかる細胞表面タンパク質または受容体に結合するリガンドも癌関連抗原として含まれる。特定の実施形態では、抗体または抗原結合断片は、細胞内癌抗原に特異的に結合する。いくつかの実施形態では、癌抗原と関連する癌は、乳癌、転移性脳癌、前立腺癌、胃腸癌、肺癌、卵巣癌、精巣癌、頭頸部癌、胃癌、膀胱癌、膵臓癌、肝臓癌、腎臓癌、扁平上皮細胞癌、CNSもしくは脳癌、黒色腫、非黒色腫癌、甲状腺癌、子宮内膜癌、上皮性腫瘍、骨癌、または造血癌のうちの一つ以上である。

30

#### 【0078】

特定の実施形態では、抗体もしくは抗原結合断片または他のポリペプチドは、ヒトHer2/neu、Her1/EGF受容体（EGFR）、Her3、A33抗原、B7H3、CD5、CD19、CD20、CD22、CD23（IgE受容体）、C242抗原、5T4、IL-6、IL-13、血管内皮成長因子VEGF（例えば、VEGF-A）VEGFR-1、VEGFR-2、CD30、CD33、CD37、CD40、CD44、CD51、CD52、CD56、CD74、CD80、CD152、CD200、CD221、CCR4、HLA-DR、CTLA-4、NPC-1C、テネイシン、ビメンチン、インスリン様成長因子1受容体（IGF-1R）、 $\alpha$ -フェトタンパク質、インスリン様成長因子1（IGF-1）、炭酸脱水酵素9（CA-IX）、癌胎児性抗原（CEA）、インテグリン $\alpha_v\beta_3$ 、インテグリン $\alpha_5\beta_1$ 、葉酸受容体1、膜貫通糖タンパク質NMB、線維芽細胞活性化タンパク質アルファ（FAP）、糖タンパク質75、TAG-72、MUC1、MUC16（またはCA-125）、ホスファチジルセリン、前立腺特異的膜抗原（PMSA）、NR-LU-13抗原、TRAIL-R1、腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーメンバー10b（TNFRSF10BまたはTRAIL-R2）、SLAMファミリーメンバー7（SLAMF7）、EGP40汎性癌抗原、B細胞活性化因子（BAFF）、血小板由来成長因子受容体、糖タンパク質EpCAM（17-1A）、プログラム死-1、タンパク質ジスルフィドイソメラーゼ（PDI）、再生肝3のホスフ

40

50

ァターゼ ( P R L - 3 )、前立腺酸性ホスファターゼ、L e w i s - Y 抗原、G D 2 ( 神経外胚葉起源の腫瘍に発現されるジシアロガングリオシド)、グリピカン - 3 ( G P C 3 )、及び/もしくはメソテリンなどの少なくとも1つの癌関連抗原または癌抗原に特異的に結合する。

【 0 0 7 9 】

ある特定の実施形態では、抗体は、3 F 8、8 H 9、アバゴモマブ、アデカツムマブ、アフツズマブ、アテムツズマブ、アラシズマブ ( ペゴール )、アマツキシマブ、アポリズマブ、バビツキシマブ、ベクツモマブ、ベリムマブ、ベバシズマブ、ビバツズマブ ( メルタンシン )、ブレンツキシマブベドチン、カンツズマブ ( メルタンシン )、カンツズマブ ( ラブタンシン )、カプロモマブ ( ペンデチド )、カツマキソマブ、セツキシマブ、シタツズマブ ( ボガトクス )、シクスツムマブ、クリバツズマブ ( テトラキセタン )、コナツムマブ、ダセツズマブ、ダロツズマブ、デツモマブ、ドロジツマブ、エクロメキシマブ、エドレコロマブ、エロツズマブ、エナバツズマブ、エンシツキシマブ、エブラツズマブ、エルツマキソマブ、エトラシズマブ、ファルレツズマブ、F B T A 0 5、フィギツムマブ、フランボツマブ、ガリキシマブ、ゲムツズマブ、ガニツマブ、ゲムツズマブ ( オゾガマイシン )、ギレンツキシマブ、グレムバツムマブ ( ベドチン )、イブリツモマブチウキセタン、イクルクマブ、イゴボマブ、インダツキシマブラブタンシン、インテツムマブ、イノツズマブオゾガマイシン、イピリムマブ ( M D X - 1 0 1 )、イラツムマブ、ラベツズマブ、レクサツムマブ、リンツズマブ、ロルボツズマブ ( メルタンシン )、ルカツムマブ、ルミリキシマブ、マバツムマブ、マツズマブ、ミラツズマブ、ミツモマブ、モガムリズマブ、モキセツモマブ ( シュードトクス )、ナコロマブ ( タフェナトックス )、ナブツモマブ ( エスタフェナトックス )、ナルナツマブ、ネシツムマブ、ニモツズマブ、ニボルマブ、N e u r a d i a b ( 登録商標 ) ( 放射性ヨウ素を伴うか、または伴わない )、N R - L U - 1 0、オフアツムマブ、オララツマブ、オナルツズマブ、オボルツズマブ ( モナトックス )、オレゴボマブ、パニツムマブ、パトリツマブ、ペムツモマブ、ペルツズマブ、ブリツムマブ、ラコツモマブ、ラドレツマブ、ラムシルマブ、リロツムマブ、リツキシマブ、ロバツムマブ、サマリズマブ、シプロツズマブ、シルツキシマブ、タバルマブ、タプリツモマブ ( パプトックス )、テナツモマブ、テプロツムマブ、T G N 1 4 1 2、チシリムマブ、トレメリムマブ、ティガツズマブ、T N X - 6 5 0、トシツモマブ、T R B S 0 7、トラスツズマブ、ツコツズマブ ( セルモロイキン )、ウブリツキシマブ、ウレルマブ、ベルツズマブ、ボロシキシマブ、ボツムマブ、及びザルツムマブなどの抗体を含む抗癌治療用抗体などの治療用抗体である。これらの抗体の断片、変異型、及び誘導体も含まれる。

10

20

30

【 0 0 8 0 】

ある特定の実施形態は、2つ以上の治療薬の組み合わせに対する応答性を試験することを含む。よって、ある特定の方法は、前述の例示的な治療薬のいずれか2つ以上の組み合わせを含む、培地懸濁液に2つ以上の治療薬を与薬することを含む。

【 0 0 8 1 】

当該技術分野で既知の任意の様々な方法は、腫瘍細胞増殖及び/または腫瘍細胞アポトーシスを測定するために使用され得る。例えば、腫瘍細胞増殖を測定するある特定の方法は、1つ以上の細胞増殖マーカーを測定することを含む。例示的な細胞増殖マーカーは、<sup>3</sup>H - チミジン、プロモデオキシウリジン ( B r d U )、5 - エチニル - 2' - デオキシウリジン ( E d u )、K i - 6 7、及び増殖細胞核抗原 ( P C N A ) を含む。よって、ある特定の実施形態では、腫瘍細胞増殖の測定ステップは、任意選択で、<sup>3</sup>H - チミジン、B r d U、E d u、K i - 6 7、及びP C N A ( これらの組み合わせを含む ) のうちの1つ以上から選択される、細胞増殖マーカーを測定することを含む。

40

【 0 0 8 2 】

同様に、当該技術分野で既知の任意の様々な方法は、腫瘍細胞アポトーシスを測定するために使用され得る。「アポトーシス」は一般に、細胞の特徴的な変化 ( 例えば、形態 ) 及び細胞死をもたらす生化学的事象を含む、多細胞生物で生じるプログラムされた細胞死の

50

プロセスを指す。例示的な変化としては、小胞形成、細胞萎縮、核断片化、クロマチン凝集、染色体DNA断片化、及び全体的なmRNA崩壊が挙げられる。腫瘍細胞アポトーシスを測定するある特定の方法は、細胞アポトーシスマーカーを測定することを含む。例示的な細胞アポトーシスマーカーとしては、カスパーゼの蛍光色素標識阻害剤 (FLICA)、カスパーゼ活性化、ポリADPリボースポリメラーゼ (PARP) 切断、DRAQ5、DRAQ7、及び末端デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ (TdT) dUTPニック末端標識 (TUNEL) アッセイが挙げられる。よって、ある特定の実施形態では、腫瘍細胞アポトーシスの測定ステップは、任意選択で、FLICA、PARP、DRAQ5、DRAQ7、及びTUNELアッセイ (これらの組み合わせを含む) のうちの1つ以上から選択される、細胞アポトーシスマーカーを測定することを含む。

10

#### 【0083】

ある特定の態様では、これらの応答性試験または方法は、診断研究所で行われ、その後、結果を患者に提供するか、または患者の医療及び癌治療において役割を担う医師または他の医療提供者に提供される。よって、特定の実施形態は、腫瘍細胞クラスター応答性試験の結果を患者、または医師もしくは他の医療提供者に提供するための方法に含む。これらの結果またはデータは、ハードコピーもしくは紙コピーの形態、またはコンピュータ可読媒体などの電子形態であってもよい。

#### 【実施例】

#### 【0084】

##### 実施例 1

20

##### 腫瘍細胞クラスターの単離及び分析

患者のコンセンサスを受け取った後、結腸直腸癌患者からの外科検体を Beijing Tumor Hospital から得た。患者由来の異種移植片腫瘍検体は、患者からの外科腫瘍検体の接種を受けた Nod / SCID マウスから得た。

#### 【0085】

簡潔に、非腫瘍組織及び壊死画分を腫瘍検体から慎重に除去した。はさみを使用して腫瘍組織を直径 1 mm 未満の薄片に切断した。磁石攪拌棒を装填した滅菌 100 ml 三角形ガラスフラスコに刻んだ腫瘍画分を移した。0.25 U/ml のリペラーゼ DH を含有する 10 ~ 15 ml の消化培地を刻んだ腫瘍組織に添加して、酵素消化を開始させた。穏やかに攪拌しながら酵素混合物を 37 °C で 1 ~ 2 時間インキュベートした。部分的に消化された腫瘍細胞クラスターを、100 µm の細胞保持装置を通して濾過した。濾液を、40 µm の細胞拘束装置 (restrainer) を通して再濾過した。40 µm の細胞拘束装置上に保持された腫瘍細胞クラスターを収集し、HBSS で 2 回洗浄し、次いで、細胞成長因子及び小分子阻害剤で補充された合成成長培地中に再懸濁した。

30

#### 【0086】

エクスピボ薬物感度アッセイに関して、腫瘍細胞クラスターを合成成長培地中で一晩回復させた。合成成長培地は、ニコチンアミド、Wnt3A、ノギン、R-スポンジン-1、及び Y27632 を含む StemPro hESC SFM サプリメントであった。次いで、薬物を洗浄する前に 24 時間、腫瘍細胞クラスターを薬物 (例えば、2 µM (Cmax) のドセタキセル) に曝露した。薬物による曝露後、腫瘍細胞クラスターを 5-エチニル-2'-デオキシウリジン (Edu) で標識して、腫瘍細胞増殖速度を評価した。薬物曝露 48 時間後に標識を開始し、96 時間継続した。対照群において、腫瘍細胞クラスターは培地交換に伴い薬物曝露を受けなかったが、同様に Edu で標識された。標識された腫瘍細胞クラスターを単一細胞に解離し、固定した。固定した細胞を、4 °C で一晩、0.2% の Triton X-100 を含有する PBS 中で、Hoechst 33342 で染色した。組み込まれた Edu は、固定した細胞を、暗所で、1 倍の Click-iT Edu 反応緩衝液、CuSO<sub>4</sub>、及びアジド抱合型 Alexa Fluor 色素を含有する反応混合物と共にインキュベートした Click-iT 反応によって検出された。画像取得及び分析のために黒色壁プレートに分配する前に、染色した細胞を PBS で洗浄した。

40

50

## 【0087】

画像取得及び分析に関して、染色した腫瘍細胞を高含有スクリーニング（HCS）プラットフォーム（Thermo Scientific Cellomics Array Scan XT i HCSリーダー）によって撮像した。10倍の対物レンズを使用して画像を収集した。25個のフィールドを各ウェルに関して撮像し、3000個を超える細胞を分析用に捕捉した。画像から2つの蛍光シグナルがHCSリーダーから得られた。青色蛍光シグナルは、Hoechst 33342で染色された核シグナルを記録し、緑色蛍光シグナルは、新しく合成されたDNAに組み込まれたEduを検出した。Edu陽性サブ集団細胞の百分率は、全細胞計数のパーセントとして計算された。このエクスピオアッセイにおける薬物耐性のカットオフポイントは、腫瘍細胞クラスターが2 $\mu$ Mドセタキセルに24時間曝露されたときの、Edu組み込みの90%未満の阻害と定義された。

10

## 【0088】

直接患者試料に関して、図1A～1Dは、腫瘍細胞クラスターが患者から外科的に除去される結腸/直腸腫瘍からの分離が成功し、合成成長培地中の懸濁液中で培養されたことを示す。図2は、Edu組み込みにより測定される時、腫瘍細胞が短期懸濁培養期間中に増殖されたことを示す（試料1は図1Aからのものであり、試料2は図1Bからのものであり、試料3は図1Cからのものであり、試料4は図1Dのものからである）。

## 【0089】

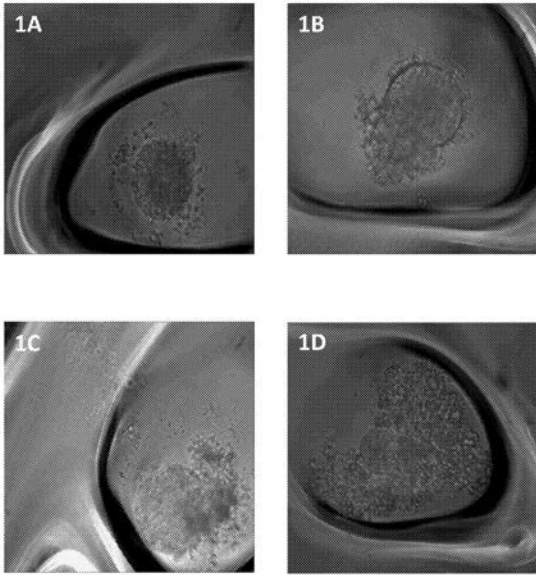
図3A～3Bは、短期懸濁培養（約7日以内）が腫瘍細胞クラスターの最も高い細胞増殖マーカーを示すことを示す。図3Aは4つの異なる患者試料の増殖マーカーを示し、図3Bは1週間にわたる1つの例示的な患者試料の増殖マーカーを示す。

20

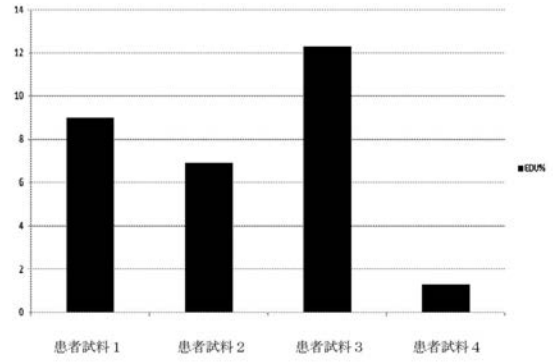
## 【0090】

図4は、試験条件下で（図3Bを参照されたい）、腫瘍細胞クラスターの成長が試験された薬物（スニチブ、ソラフェニブ、エルロチニブ、クリゾチニブ、オキサリプラチン）によって完全に阻害されないことを示し、これはこれらの薬物に対する患者由来の異種移植片（PDX）腫瘍応答と一致する。PDX増幅腫瘍が合成培地との懸濁液中で培養されたときの患者腫瘍組織から単離されたものと同様の形態を有することが確認された。

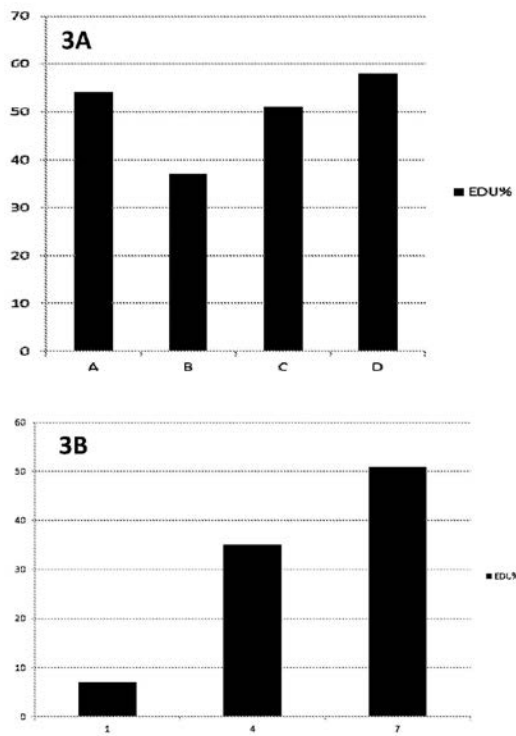
【 図 1 】



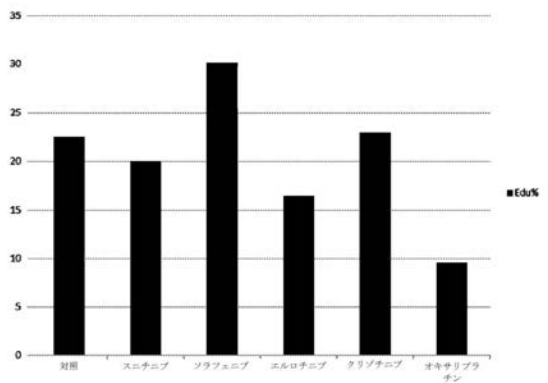
【 図 2 】



【 図 3 】



【 図 4 】



## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 17/21683
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(B) - C12N 5/09, C12N 5/02 (2017.01) CPC - C12N 5/02, C12N 5/071, C12N 2500/99		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) See Search History Document		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched See Search History Document		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) See Search History Document		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2014/0154735 A1 (SUNDSTROM et al.) 5 June 2014 (05.06.2014); para [0008], [0015], [0048], [0052], [0121], [0122]	1-3
A	US 2013/0071925 A1 (SKRIBEK et al.) 21 March 2013 (21.03.2013); abstract, para [0033]	1
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 3 May 2017		Date of mailing of the international search report <b>09 JUN 2017</b>
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8900		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OBP: 571-272-7774

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/AUS 17/21683

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
3.  Claims Nos.: 4-35  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

## フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ

(74)代理人 100181674

弁理士 飯田 貴敏

(74)代理人 100181641

弁理士 石川 大輔

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 チェン, イヨウ

アメリカ合衆国 カリフォルニア 95120, サンノゼ, メンロー ドライブ 6434

(72)発明者 ヤン, ジェン

中華人民共和国 100076 ベイジン, フェンタイ ディストリクト, ヘイシリ, ザ  
4ティーエイチ ビルディング 6 シングル 201

(72)発明者 ジャン, イホン

アメリカ合衆国 カリフォルニア 91301, カラバサス, エスワード ドライブ 270  
61

Fターム(参考) 4B063 QA19 QA20 QQ61 QR77 QS32 QX02

4B065 AA93X AC20 BA30 BB12 BB19 BC50 CA46

专利名称(译)	肿瘤细胞悬浮培养及相关方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2019509024A</a>	公开(公告)日	2019-04-04
申请号	JP2018538846	申请日	2017-03-09
[标]发明人	ヤンジエン		
发明人	チエン, イヨウ ヤン, ジエン ジャン, イホン		
IPC分类号	C12N5/09 G01N33/53 C12Q1/02		
CPC分类号	C12N5/0693 C12N2513/00 G01N33/5011 G01N2510/00 G01N2800/52 C12N5/0062 C12N5/04 G01N33/574		
FI分类号	C12N5/09 G01N33/53.Y C12Q1/02		
F-TERM分类号	4B063/QA19 4B063/QA20 4B063/QQ61 4B063/QR77 4B063/QS32 4B063/QX02 4B065/AA93X 4B065/AC20 4B065/BA30 4B065/BB12 4B065/BB19 4B065/BC50 4B065/CA46		
代理人(译)	夏木森下 饭田TakashiSatoshi 石川大介 山本健作		
优先权	PCT/CN2016/075947 2016-03-09 WO		
其他公开文献	JP2019509024A5		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

基于悬浮液的细胞培养系统和用于从患者适当且有效地生长人肿瘤细胞簇的培养基，以及用于评估肿瘤细胞的相关方法和患者对一种或多种治疗剂的潜在响应性它提供。本公开的实施方案涉及包含来自人患者的人肿瘤细胞簇群的培养基悬浮液（或多种培养基悬浮液），所述培养基悬浮液在约14天内包含肿瘤细胞簇。它导致至少约10%的增长。在某些实施方案中，所述培养基悬浮液在少于约14,13,12,11,10,9,8,7,6或5天内包含至少约10,20,30或约40个约人肿瘤细胞簇。结果为40,50,60,70,80,90或100%的增长。[选图]图4

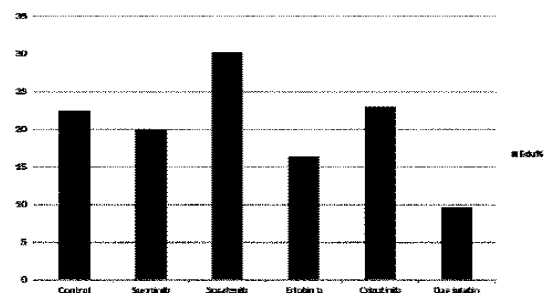


Figure 4