

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6774685号

(P6774685)

(45) 発行日 令和2年10月28日(2020.10.28)

(24) 登録日 令和2年10月7日(2020.10.7)

(51) Int.Cl. F I
GO 1 N 33/50 (2006.01) GO 1 N 33/50 Z
GO 1 N 33/15 (2006.01) GO 1 N 33/15 Z

請求項の数 26 (全 35 頁)

(21) 出願番号	特願2018-518687 (P2018-518687)	(73) 特許権者	518121714
(86) (22) 出願日	平成28年11月4日(2016.11.4)		ヴィヴィア バイオテック, エス. エル
(65) 公表番号	特表2018-533728 (P2018-533728A)		スペイン 29590 マラガ カンパニ
(43) 公表日	平成30年11月15日(2018.11.15)		ラス カレ・セベロ・オチョア 35 ビ
(86) 国際出願番号	PCT/EP2016/076690		ーティーエー
(87) 国際公開番号	W02017/077046	(74) 代理人	100082072
(87) 国際公開日	平成29年5月11日(2017.5.11)		弁理士 清原 義博
審査請求日	令和1年10月24日(2019.10.24)	(72) 発明者	バレストロス ノベル, フアン アントニ
(31) 優先権主張番号	62/250,687		オ
(32) 優先日	平成27年11月4日(2015.11.4)		スペイン 28760 マドリッド トレ
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		ス・カントス カレ・サンティアゴ・グリ
			ソリア 2

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 薬物又は薬物の組み合わせに対する初代細胞集団の細胞応答性を試験するためのエクスピボの方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

薬物又は薬物の組み合わせに対する原発腫瘍細胞集団の細胞応答性を試験するためのエクスピボの方法であって、

i) 末梢血(PB)、骨髓(BN)、又はリンパ節(LN)から選択される被験体の全体のサンプルを、血漿分画、赤血球分画、又はそれらの組み合わせから成る、白血球の無い人工環境(AE)を分離させるための分離プロセスに送る工程、

i i) 前の工程で得た白血球の無いAEを原発腫瘍細胞集団と混合する工程、

i i i) 工程i i)の混合物に、少なくとも1つの試験される薬物を加える工程、

i v) 試験される薬物が原発腫瘍細胞集団上で活性を及ぼすことを可能にするために、工程i i i)で得た混合物を2時間から14日間までにわたりインキュベートする工程、

v) 試験された薬物がある状態又は無い状態で原発腫瘍細胞集団の生存率及び／又は増殖を評価する工程、

v i) 試験される薬物がある状態及び無い状態で行われる評価の間に原発腫瘍細胞集団の生存率及び／又は増殖に関する比較データを生成し、得られたデータを原発腫瘍細胞集団の生存率及び／又は増殖の減少／増大のための薬物活性を示す値に関連づける、工程を含む、エクスピボの方法。

【請求項2】

血漿分画及び赤血球分画の組み合わせは1:1の比率である、ことを特徴とする請求項1に記載のエクスピボの方法。

10

20

【請求項 3】

全体のサンプルはヒト由来である、ことを特徴とする請求項 1 又は 2 に記載のエキスピボの方法。

【請求項 4】

白血球の無い A E は、健康なドナー、又は癌に悩んでいた或いは悩んでいるドナー由来である、ことを特徴とする請求項 1 乃至 3 の何れか 1 つに記載のエキスピボの方法。

【請求項 5】

白血球の無い A E は、数人のドナーから得られ、原発腫瘍細胞集団及び／又は試験される薬物と混合される前に共にプールされる、ことを特徴とする請求項 1 乃至 4 の何れか 1 つに記載のエキスピボの方法。

10

【請求項 6】

白血球の無い A E は、原発腫瘍細胞集団が得られる患者と同じ疾患に悩むドナー、又は原発腫瘍細胞集団を提供する患者とは異なる疾患に悩むドナーから得られ、或いは代替的に、白血球の無い A E は健康なドナーから得られる、ことを特徴とする請求項 1 乃至 5 の何れか 1 つに記載のエキスピボの方法。

【請求項 7】

白血球の無い A E は原発腫瘍細胞集団を提供する同じ被験体から得られる、ことを特徴とする請求項 6 に記載のエキスピボの方法。

【請求項 8】

インキュベーション混合物はまた、少なくとも 1 つの可溶性因子、及び／又は、インビボの主要微小環境細胞集団に見出される細胞型の少なくとも 1 つの追加の細胞集団を含む、ことを特徴とする請求項 1 乃至 7 の何れか 1 つに記載のエキスピボの方法。

20

【請求項 9】

少なくとも 1 つの可溶性因子は、腫瘍由来エキソソーム、シグナル分子、成長因子、ケモカイン、サイトカイン、インターロイキン、及び腫瘍細胞又は非腫瘍細胞由来の任意の可溶性の分子から選択される腫瘍内微小環境の非細胞成分である、ことを特徴とする請求項 8 に記載のエキスピボの方法。

【請求項 10】

少なくとも 1 つの可溶性因子は、インターロイキン I L - 2、I L - 4、I L - 6、I L - 8、I L - 10、I L - 13、I L - 15、I L - 21、分化 (s C D) 40 リガンドの可溶性クラスタ、免疫グロブリン (I g) M、C p G、被メチル化 C p G ジヌクレオチドモチーフを含む短い合成一本鎖 DNA 分子、B 細胞活性化因子 (B A F F)、及び増殖誘導リガンド (A P R I L) から選択される、ことを特徴とする請求項 9 に記載のエキスピボの方法。

30

【請求項 11】

少なくとも 1 つの追加の細胞集団は、繊維芽細胞の細網細胞、ナース様細胞、間葉系幹細胞、濾胞樹状細胞、内皮細胞、周皮細胞、及び初代間質細胞由来の細胞株から選択される、ことを特徴とする請求項 8 に記載のエキスピボの方法。

【請求項 12】

初代間質細胞由来の細胞株は、H S - 5、H S 2 7 a、U E 6 E 7 T - 2、N K - T e r t、H M E C - 1、K U S A - H 1、M 2 1 0 B 4、S T - 2、及び K U M - 4 から選択される、ことを特徴とする請求項 11 に記載のエキスピボの方法。

40

【請求項 13】

少なくとも 1 つの可溶性因子及び／又は追加の細胞集団は、ヒト以外の他の種に由来する、ことを特徴とする請求項 8 乃至 12 の何れか 1 つに記載のエキスピボの方法。

【請求項 14】

原発腫瘍細胞集団は、それらの使用の前に新鮮に抽出され、或いは凍結保存され、使用前に解凍される、ことを特徴とする請求項 1 乃至 13 の何れか 1 つに記載のエキスピボの方法。

【請求項 15】

50

凍結保存された原発腫瘍細胞集団はA Eと共に解凍される、ことを特徴とする請求項14に記載のエキスピボの方法。

【請求項16】

原発腫瘍細胞集団は、癌のための前処置を受けなかった患者から抽出され、或いは、前記癌のための1以上の前処置を受けた癌患者から抽出され、又は、原発腫瘍細胞集団は微小残存病変(MRD)を持つ患者から抽出される、ことを特徴とする請求項1乃至15の何れか1つに記載のエキスピボの方法。

【請求項17】

原発腫瘍細胞集団は固形腫瘍から得られる、ことを特徴とする請求項1乃至16の何れか1つに記載のエキスピボの方法。

10

【請求項18】

固形腫瘍は、卵巣癌、直腸癌、肛門部の癌、胃癌、精巣癌、子宮癌、結腸癌、直腸癌、腎細胞癌、肝臓癌、肺非小細胞癌、小腸の癌、食道癌、黒色腫、内分泌系の癌、甲状腺の癌、副甲状腺の癌、副腎の癌、骨癌、膀胱癌、皮膚癌、頭頸部癌、皮膚又は眼内の悪性黒色腫、子宮癌、ファロピウス管の細胞腫、脳幹神経膠腫、下垂体腺腫、カポジ肉腫、類表皮癌、扁平上皮癌、子宮内膜の細胞腫、頸部の細胞腫、膣癌、外陰癌、軟組織の肉腫、尿道癌、陰茎癌、膀胱癌、腎臓癌若しくは尿管癌、腎盂癌、中枢神経系(CNS)の腫瘍、中枢神経原発リンパ腫、腫瘍血管新生、脊椎軸腫瘍、前記癌の転移巣、又はそれらの組み合わせを含むリストから選択される、ことを特徴とする請求項17に記載のエキスピボの方法。

20

【請求項19】

前記方法は、スフェロイド、細胞外マトリックスゲル、合成スキャフォールド、回転式細胞培養システム、又は低/非接着性培養プラスチックから選択される、固形腫瘍の微小環境構造を模倣するために構築された、3D細胞培養構築物を含む、ことを特徴とする請求項16又は18に記載のエキスピボの方法。

【請求項20】

原発腫瘍細胞集団は、血液学的疾患、自己免疫疾患、血液凝固異常、又は貧血から得られる、ことを特徴とする請求項1乃至19の何れか1つに記載のエキスピボの方法。

【請求項21】

血液学的疾患は、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫(例えばB細胞リンパ腫、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫、マントル細胞リンパ腫、辺縁帯B細胞リンパ腫、バーキットリンパ腫、リンパ形質細胞性リンパ腫、ヘアリー細胞白血病)、慢性リンパ球性白血病、急性骨髄性白血病、慢性骨髄性白血病、骨髄異形成症候群、多発性骨髄腫、又は急性リンパ性白血病を含むリストから選択される、ことを特徴とする請求項20に記載のエキスピボの方法。

30

【請求項22】

試験される少なくとも1つの薬物は、化学療法薬物、標的化された抗癌療法薬物、腫瘍溶解性の薬物、細胞毒性薬、免疫療法薬物、サイトカイン、微小環境を標的とする薬物、副刺激分子の活性剤、抑制分子の阻害剤、又は細胞免疫療法剤を含むリストから選択される少なくとも1つの薬剤を含む、ことを特徴とする請求項1乃至21の何れか1つに記載のエキスピボの方法。

40

【請求項23】

原発腫瘍細胞集団の細胞応答の評価は、パラメータとして、生存率、増殖、アポトーシス、細胞不足、表面マーカーの発現における変化、サイトカイン/ケモカインの生産における変化の少なくとも1つを測定することを含む、ことを特徴とする請求項1乃至22の何れか1つに記載のエキスピボの方法。

【請求項24】

原発腫瘍細胞集団はプールされたウェルに由来する、ことを特徴とする請求項1乃至23の何れか1つに記載のエキスピボの方法。

【請求項25】

50

処置を開始した後、被験体に処方された処置の効力を判定するために使用される、請求項 1 乃至 24 の何れか 1 つに記載のエキスピボの方法。

【請求項 26】

効力の判定は、処置を開始して少なくとも 7 日後である、ことを特徴とする請求項 25 に記載のエキスピボの方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、薬理学の分野、具体的には抗腫瘍薬物活性の評価に関する。

【背景技術】

10

【0002】

微小環境 (ME) は、腫瘍細胞の生残、増殖、及び薬物耐性に決定的な影響を及ぼす (1)。ME の役割は、ME の成分を特異的に標的とする制癌剤の発見と開発と共に更に重要なものである (2)。これは、癌を処置する薬物のエキスピボの試験の障害となっている。これらエキスピボのアッセイにおいて ME を構成する因子の欠如は、多くの薬物の認識された効能に影響を及ぼす。この結果、エキスピボの結果とこれら薬物の臨床効果との相関性が欠如する。

【0003】

様々なグループが、様々な成功の度合いで、これら障害の一部に試み且つこれを克服するために微小環境模倣アッセイを開発した。先行技術に開示されるそのような方法は、細胞要素を加える工程 (3-5)、細胞外マトリクスの成分を加える工程 (6、7)、及び／又は、可溶性サイトカイン／ケモカイン、又は腫瘍内微小環境に存在する非腫瘍細胞由来の分子のカクテルの追加を含む (8、9)。このような試みは幾らか成功しているが、本発明は、以前に試みられていない微小環境の成分を模倣する新たな方法を導入する。

20

【0004】

慢性リンパ球性白血病 (CLL) は、非常に異質な生態及び臨床経過を持つ疾患の原型であり；これは最も頻度の高い成人の血液系悪性腫瘍である (10)。この明白な臨床的多様性は、疾患の細胞内因機構及び細胞外因機構の両方に関連付けられる。細胞内因機構の中で最も良く知られているものは、ゲノムの異常、後成的修飾、及びマイクロ RNA に関する。化学療法抵抗性を含む CLL の挙動及び結果は、白血病の ME に存在する刺激にも依存する (11)。外部刺激の重大な役割は、CLL-ME の相互作用に干渉する薬物、即ちクローン型 B 細胞受容体 (BCR) を介するシグナル伝達の阻害剤の著しい治療活性により示され；これら新たな薬物 (イブルチニブとイデラリシブ) は、CLL 処置において主なパラダイム・シフトを構成する (12、13)。

30

【0005】

多発性骨髄腫 (MM) は、骨髄 (BM) 中のクローンの形質細胞 (plasmatic cell) の増殖を特徴とする悪性疾患である。MM は未だに難病であり、米国と欧州において 2 番目に頻度の高い血液悪性腫瘍である。MM 細胞は、強固な BM 微小環境依存性を有しており、抗アポトーシス性及び生残促進性のシグナル、及び薬物に対する耐性を付与する。MM 腫瘍細胞は、特定の BM 微小環境内での可溶性因子と分子の相互作用により促進される高い増殖速度を持つ。

40

【0006】

ここで、分離された原発腫瘍細胞を使用するエキスピボのアッセイへの人工環境 (AE) の追加が、前記腫瘍細胞の生存率及び増殖に対し深刻な効果をもたらしたことを示す。これは、エキスピボのアッセイにおいて、原発腫瘍細胞の薬物、特に抗腫瘍薬物に対する応答性を改善する新たな方法を構成する。

【0007】

癌患者から抽出した腫瘍サンプルは、非常に異質な環境のコンテキストにおいて腫瘍細胞を含んでいる。この環境は、例えば骨髄、末梢血、又はリンパ節などの血液の組織サンプル中の、患者から抽出したサンプルの 99% を表し得る。これら原発腫瘍細胞を研究す

50

るために、この異質な環境の大半を取り除いて、研究されている残りの腫瘍細胞を濃縮することが、共通の慣習である。血液サンプルにおいて、これは、サンプル全体の1%にしかほぼ一致しない、白血球を含む分画を分離させる密度勾配により一般に実行される。一般に廃棄される密度勾配の他の主要な分画は、血漿分画及び赤血球分画である。これら廃棄された分画の両方を人工環境(AE)と称する。これら廃棄された分画は白血球にかなり関連しており、それらの廃棄は、白血球の生態の中で人工産物に繋がることもある。密度勾配の分離を実行することにより、及び、同じ又は異なる患者サンプルから分離された人工環境分画を原発腫瘍細胞に加えることにより、原発腫瘍細胞上の化合物の活性に対するこれら廃棄された分画の効果を調査した。

【0008】

本発明の開示された方法は、原発腫瘍細胞に人工環境を加える。本発明は、先行技術を上回る様々な利点を有する。初代細胞上の化合物の活性は、エキスピボで分離された初代細胞を使用するアッセイにおいて人工的に変更される。潜在的な抗腫瘍薬物のアッセイも含まれる本発明の方法は、分離された細胞の微小環境の欠如を補う人工環境を加える。幾つかの以前のアッセイにおいて、全体のサンプルを使用したのが、これは通常、大いに希釈される。全体のサンプルアッセイへのAEの追加は、サンプルのMEの初期の希釈により与えられた人工産物を補う。別の利点は、本発明の方法が原発腫瘍細胞の集団の生存率を増強するという点である。付加的な利点は、本発明の方法が、以前に報告されなかったレベルにまで原発腫瘍細胞集団の増殖を促進するという点である(14)。これらの利点は、増殖を阻害する薬物を含む多くの薬物組成物の異なるインキュベーション時間及び試験を含む、多くの変動に対する原発腫瘍細胞集団の細胞の応答のエキスピボ分析を可能にする。更に、本発明の別の利点は、患者のインビボの微小環境をより良く模倣する様式で原発腫瘍細胞を分析する能力である。これは、微小環境を標的とする薬物、例えばイブルチニブとイデラリシブの場合には特に重要であり、その評価は微小環境を模倣するアッセイを恐らく必要とする。人工環境を用いた、これらの化合物及び該化合物と他の化合物との組み合わせの効果の調査は、分離された原発腫瘍細胞に基づいてアッセイで実際に存在する主な人工産物を防ぐ。本発明の方法は、それ故、薬物(複数可)が患者(複数可)にとって有益かどうかを判定するためのエキスピボの試験の能力を改善するという利点をもたらす。

【発明の概要】

【0009】

本明細書で提示される発明は、初代細胞集団の人工環境(AE)、特に原発腫瘍細胞集団の人工腫瘍環境を産生する方法、並びに、薬物又は薬物の組み合わせに対する原発腫瘍細胞集団の細胞応答性を試験するための方法におけるそれらの使用に関する。細胞応答性の試験は、人工腫瘍環境及び試験される薬物での原発腫瘍細胞のインキュベーションを含み、原発腫瘍細胞集団の反応を分析する。人工腫瘍環境での原発腫瘍細胞のインキュベーションは、前記腫瘍細胞の生存率を増強し、及び／又は、より大きなレベルの腫瘍細胞増殖を誘発させ、そして結果的に、分析される薬物に関する試験の感度及び精度を増大させる。

【0010】

本明細書にはまた、末梢血(PB)、骨髓(BM)、又はリンパ節(LN)のサンプルからAEの成分を得るためのプロセスも記載される。原発腫瘍細胞集団を安定させるために前記成分が使用される。AEを構成する、これらの選択された成分は、ドナー(図1及び実施例1)から得た末梢血、骨髓、又はリンパ節から選択されるサンプルから分離及び／又は混合された成分であるが、白血球分画は除く(白血球の無いAE)。

【0011】

ここで、本発明の好ましい実施形態に対する詳細な言及を行い、その例を本明細書に提供する。本明細書中の開示は特定の例示された実施形態を指すが、これら実施形態は一例であり、限定的なものとして提示されるものでないことを理解されたい。以下の詳細な説明の意図は、典型的な実施形態について議論するものであるが、付随する請求項により定

10

20

30

40

50

義されるように本発明の趣旨及び範囲内に含まれるものと同様の、実施形態の改良、変更、及び同等物を全て包含すると解釈されるべきである。開示された方法は、当該技術分野で従来使用される様々な医療処置と共に利用されてもよい。

【図面の簡単な説明】

【0012】

【図1】人工環境（A E）を得る方法である。末梢血、骨髓、又はリンパ節のサンプルの成分は、密度勾配遠心分離により様々な成分部分へと分離される。白血球分画は廃棄され、血漿層及び包装された赤血球はA Eを生成するために組み合わせられた。

【図2 A】A EがAML患者の新鮮且つ冷凍された原発腫瘍細胞間の結果の優れた相関性を可能にすることを示す。図2 Aは、24時間（中が塗りつぶされた円）及び48時間（中が塗りつぶされていない円）で7つの異なる薬物に関する新鮮且つ冷凍されたAMLサンプルの曲線下面積（AUC）間の相関性を表わす。中が塗りつぶされた円の異なる色彩強度は、異なる薬物を表わす。

10

【図2 B】A EがAML患者の新鮮且つ冷凍された原発腫瘍細胞間の結果の優れた相関性を可能にすることを示す。図2 Bは、基礎レベル（上部パネル）で及び48時間のインキュベーション後（下部パネル）にA Eを加えた、又は加えていない、新鮮且つ冷凍されたAML骨髓サンプルの生存率のパーセンテージを表す。

【図2 C】A EがAML患者の新鮮且つ冷凍された原発腫瘍細胞間の結果の優れた相関性を可能にすることを示す。図2 Cは、ALLサンプル中の薬物について48時間（左）及び72時間（右）での用量－反応曲線を示す。実線は新鮮なサンプルを表わし、点線はA Eで再構成された冷凍サンプル（血漿と赤血球の分画）を表わす。

20

【図3】原発腫瘍細胞集団を識別する細胞表面マーカーの使用を示す。アネキシン－Vを使用して、生存率とCFDAを評価し、増殖をモニタリングする。上部パネルAは、B－CLL細胞を識別するためのフローサイトメトリーによるゲーティング戦略を表わす。中央パネルBは、アネキシン－Vの発現に応じたアポトーシス性B－CLL細胞と生存可能なB－CLL細胞と間の識別を表わす。下部パネルCの右及び左は、CFDA発現に応じて増殖する集団を識別するための一例を表わす。

【図4】最良のサイトカインプロトコルを判定するための、NPB細胞、NBM細胞、及び＋／－HS－5細胞に由来するA Eでの生存率及び増殖を示す。中央値の応答は、72時間又は96時間で、NPB、NBM、＋／－HS－5の細胞株（0、1：10、1：100）の何れかのA Eで試験され、インキュベートされる、各条件に関する5つのCLL原発腫瘍サンプルについて示される。これら条件は、3つのサイトカインの組み合わせ（sCD40L＋IL－2、CpG＋sCD40L、CpG＋IL－2）、加えて対照について試験される。

30

【図5】図4の最良の条件を使用するNPB及びCLLPBに由来するA Eでの生存率及び増殖を示す。5つのドナーのA EをCLL原発腫瘍サンプル中で試験した。図5は、A Eの混合物と共にCpG＋IL2（左のパネル）又はHS－5＋CpG＋IL2（右のパネル）を追加したCLLサンプルの、生存率（上部パネル）又は増殖（下部パネル）のパーセンテージを表す。対照サンプルは、CpG＋IL2を加えた又は差し引いた、A Eの無いCLL原発腫瘍サンプルを指す。

40

【図6】サイトカインを含む又は含まない様々なA E条件を使用する生存率及び増殖を示す。4つのCLL原発腫瘍サンプルを使用し、健康なドナー（NPB）のA E及びCLLを患うドナー（CLLPB）のA Eを試験してデータを比較する。

【図7】ヒト血清（HS）対ウシ血清（FBS）を示す。アッセイ系に対する血清の効果を判定するために、3つのCLLサンプルを、2つの濃度（10及び20％）でFBSとHSの両方を使用する4つの異なる血清条件で試験した。Xは対照を指し、円はCpG＋IL2の組み合わせに相当する。垂直なエラーバーはSDの生存率に相当し、水平なエラーバーはSDの増殖に相当する。生存率と増殖に対する効果を報告する。

【図8】最良のサイトカインプロトコルを判定するためにCLLPB＋／－HS－5細胞を使用する生存率と増殖を示す。20のCLLサンプル中で試験したサイトカインの組み

50

合わせはそれぞれ、生存率と増殖に関する中央値の応答により表わされる。数は、表 2 に示されるサイトカインの組み合わせに相当する。

【図 9】 3つの異なる骨格刺激（s C D 4 0 L + C p G、s C D 4 0 L + I L 2 1、C p G + I L 2）によりグループ化される、表 2 の 2 4 のサイトカインの組み合わせの生存率及び増殖を示す。各条件につき 3つの異なる骨格刺激に関する中央値の応答が示される。

【図 1 0 A】 A E の存在下での初代 C L L 細胞上で試験されたイブルチニブ及びイデラリシブの増殖抑制作用を示す。非増殖性（左のパネル）及び増殖性（右のパネル）細胞分画の両方におけるイブルチニブの用量反応曲線が示される。

【図 1 0 B】 A E の存在下での初代 C L L 細胞上で試験されたイブルチニブ及びイデラリシブの増殖抑制作用を示す。非増殖性（左のパネル）及び増殖性（右のパネル）細胞分画の両方におけるイデラリシブ（図 1 0 B）の用量反応曲線が示される。

10

【図 1 0 C】 A E の存在下での初代 C L L 細胞上で試験されたイブルチニブ及びイデラリシブの増殖抑制作用を示す。図 1 0 C は、イブルチニブ（左のパネル）及びイデラリシブ（右のパネル）の非増殖性（N P、灰色の線）及び増殖性（P R、黒色の線）の細胞サブセットの中央値を表わす。

【図 1 1】 異なる試験条件での生存率及び絶対的な C D 3 4 芽細胞（b l a s t）回復を示す。図 1 1 は、異なる時間でのインキュベーションにおける、7つの異なる細胞培養条件に加えて対照を用いた、M D S サンプルの生存率（上部パネル）又は絶対的な C D 3 4 細胞回復（下部パネル）のパーセンテージを表わす。数は、実施例 1 0 で指定された条件を指す。

20

【図 1 2 A】 表 3 に示されるサイトカインカクテルを伴う 4つの B-N H L 原発サンプル、及び通常の B M の A E における、生存率及び増殖を示す。中央値の応答は、4つの B-N H L 原発腫瘍サンプル中で試験された 1 5 のサイトカインの組み合わせの各々における生存率及び増殖について示される。図 1 2 A は 7 2 時間のインキュベーションのデータである。塗りつぶされた正方形は C D 4 0 L を含む組み合わせであり、塗りつぶされていない正方形は I L 2 を含む組み合わせであり、円はサイトカインを含まない。

【図 1 2 B】 表 3 に示されるサイトカインカクテルを伴う 4つの B-N H L 原発サンプル、及び通常の B M の A E における、生存率及び増殖を示す。中央値の応答は、4つの B-N H L 原発腫瘍サンプル中で試験された 1 5 のサイトカインの組み合わせの各々における生存率及び増殖について示される。図 1 2 B は 9 6 時間のインキュベーションのデータである。塗りつぶされた正方形は C D 4 0 L を含む組み合わせであり、塗りつぶされていない正方形は I L 2 を含む組み合わせであり、円はサイトカインを含まない。

30

【図 1 3】 サイトカインを含む又は含まない異なる試験条件での 7つの M M 原発サンプルにおける生存率及び増殖を示す。原発 M M サンプルの生存率は、表 4 に要約された異なる試験条件下での増殖性（P R、塗りつぶされた円）及び非増殖性（N P、塗りつぶされていない円）の細胞の両方に示される。

【図 1 4】 A E の存在下での原発 M M 細胞上で試験されたレナリドミドの増殖抑制作用を示す。図 1 4 A は、4つ代表的なサンプルの非増殖性（N P、灰色の正方形）及び増殖性（P R、黒色の円）の細胞集団の生存率を示す。図 1 4 B は、4つ代表的なサンプルの非増殖性（灰色の線と正方形）及び増殖性（黒色の線と円）の生きた M M 腫瘍細胞の集団の両方におけるレナリドミドの用量反応曲線を表示する。

40

【発明を実施するための形態】

【0 0 1 3】

本発明は、原発腫瘍細胞の人工腫瘍環境を産生する方法と、薬物または薬物の組み合わせへの原発腫瘍細胞集団の細胞の応答性を試験するため、エクスピボでの方法における使用と、に関する。この方法は、エクスピボアッセイにおいて原発腫瘍細胞集団の増殖を増強および／または促進することの特徴とする。分離された原発腫瘍細胞は十分に分析することができず、というのも、これらは、インビボで腫瘍の生存および増殖を生体内で促進するのに重要な、特定の微小環境要素を欠くからである。

【0 0 1 4】

50

まず、アッセイ培地中の抗腫瘍薬物に、慢性リンパ性白血病（CLL）と診察された患者から分離された原発腫瘍細胞の応答性の評価のためのエキスピボ分析用のAEを組み込む方法を定義した。本開示は、CLLを中心とするものの、原発腫瘍細胞集団が血液学的悪性腫瘍または固形腫瘍からのものであっても、任意の原発腫瘍細胞集団に適用しうであろう技術の発明を提示する。同様に、急性骨髄性白血病（AML）、急性リンパ性白血病（ALL）、骨髄異形成症候群（MDS）、非ホジキンリンパ腫（NHL）および多発性骨髄腫（MM）を含む、他の血液学的悪性腫瘍からの原発腫瘍細胞集団に対するAEの影響を実証することが本明細書に含まれる。

【0015】

本発明はまた、患者のサンプルから分離された原発腫瘍細胞上での薬物の効果を判定（薬物の効果の分析および定量化）するための、エキスピボアッセイにおけるAEの使用を開示する。

10

【0016】

微小環境とは、腫瘍が存在する環境であり、ここには、周囲の血管、免疫細胞、繊維芽細胞、間質細胞、細胞外マトリックス（ECM）、可溶性因子（例えば、腫瘍由来エキソソーム、シグナル分子、成長因子、マイクロRNA、ケモカイン、サイトカイン、および、腫瘍細胞または非腫瘍細胞由来の任意の可溶性の分子）が含まれ、これらはすべて腫瘍細胞動態に影響する。

【0017】

人工環境（AE、AE分画とも称される）とは、白血球分画を除く、密度勾配遠心分離後の、ドナーからの末梢血、骨髄、またはリンパ節のサンプルから分離された分画または分画の混合物（白血球の無いAE）である。残存する白血球は、なおAE内に残留できるだろう。AEは、血漿分画のみであってもよく、赤血球分画のみであってもよく、または任意の比率（例えば1：1、1：2、2：1など）の2つの分画の組み合わせであってもよい。

20

【0018】

白血球の無いAE：白血球がないか、または、白血球の残存する数がAE 1 μ l 当たり100未満と定義された、分画またはサンプル。

【0019】

ドナーとは、生体サンプルを提供する人物を指す。当該人物は健康であってもよく、または、疾病（例えば癌）と診断されたことがあってもよい。生体サンプルは、例えば、血液、骨髄、リンパ節または腫瘍の生検標本であってもよい。

30

【0020】

エキスピボとは、自然状態の変化を最小限に抑えながら、外部環境内の有機体からの組織または細胞の中またはその上で行われる実験または測定である。本発明では、疾患に罹患している患者または正常個体からの、インビトロでの初代ヒト細胞に参照し、この細胞は、直近に抽出、凍結保存または凍結して、その状態を保存することができる。いくつかの実施形態では、これらの細胞は薬物効果のインビトロでの評価のために解凍される。本特許明細書のために、「エキスピボ」および「インビトロ」という用語が区別されずに使用される。

40

【0021】

血液学的悪性腫瘍（HM）とは、血液学的腫瘍とも呼ばれ、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫（例えばB細胞リンパ腫、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫、マンツル細胞リンパ腫、辺縁帯B細胞リンパ腫、パーキットリンパ腫、リンパ形質細胞性リンパ腫、ヘアリー細胞白血病）、慢性リンパ性白血病、急性骨髄性白血病、慢性骨髄白血病、骨髄異形成症候群、多発性骨髄腫または急性リンパ性白血病を含む、世界保健機関の分類に従って定義される疾病の一群を指す。

【0022】

固形腫瘍とは、血液、骨髄またはリンパ性細胞以外の体組織細胞の成長異常によって形成された腫瘍または病変からなる。固形腫瘍には、限定されないが、卵巣癌および直腸癌

50

、肛門部の癌、胃癌、精巣癌、子宮癌、結腸癌、直腸癌、腎細胞癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、小腸の癌、食道癌、黒色腫、内分泌系の癌、甲状腺の癌、副甲状腺の癌、副腎の癌、骨癌、膀胱癌、皮膚癌、頭部または頸部の癌、皮膚または眼内の悪性黒色腫、子宮癌、卵管の癌腫、脳幹神経膠腫、下垂体腺腫、カポジ肉腫、類表皮癌、扁平上皮癌、子宮内膜の細胞腫、子宮頸癌、陰癌、外陰癌、軟組織の肉腫、尿道の癌、陰茎の癌、膀胱癌、腎臓または尿管の癌、腎盂の細胞腫、中枢神経系（CNS）の腫瘍、原発性CNSリンパ腫、腫瘍の血管新生、脊椎軸腫瘍、前記癌の転移性病巣、またはその組み合わせ、が含まれる。

【0023】

サンプルとは、患者サンプル、原発腫瘍細胞、分離された腫瘍細胞、初代細胞とも呼ばれ、これらすべてが、患者から抽出され、分析のために分離された初代細胞を指す。サンプルは、健康な個体、癌と診察された患者、または他の血液学的疾患と診断された患者からの初代細胞であってもよい。サンプルは凍結保存される場合とされてない場合がある。使用前に凍結保存されたサンプルを解凍しなければならない。

10

【0024】

Ex vivo Techとは、応答を評価するために、患者のサンプル上で直接、微小環境の刺激の状況において薬物および薬物の組み合わせの処置の薬理学的特性を有効にする、自動的かつ独自のフローサイトメトリープラットフォームである（15）。

【0025】

原発腫瘍細胞とは、生体組織（例えば骨髄、末梢血、リンパ節、脾臓または腫瘍生検標本）から直接採取された腫瘍細胞を指し、エキスビボでの成長のために分離され株化される。原発腫瘍細胞は予め抽出され凍結保存され、使用前に解凍されてもよく、凍結保存されることなく直近で抽出され使用されてもよい。

20

【0026】

初代細胞集団とは、生体組織（例えば骨髄、末梢血、リンパ節、脾臓または腫瘍生検標本）から直接採取された細胞（非発病）を指し、エキスビボでの成長のために株化される。

【0027】

細胞型を表す間質細胞集団が、インビボでの腫瘍微小環境に見られた。腫瘍微小環境は、いくつかの非腫瘍細胞型からなり、これらには、限定されないが、繊維芽細胞の細網細胞、ナース様細胞（nurse-like cells）、間葉系幹細胞、濾胞樹状細胞、内皮細胞および周皮細胞が含まれる。間質細胞は、初代細胞、または、HS-5、HS27a、UE6E7T-2、NK-Tert、HMEC-1、KUSA-H1、M210B4、ST-2およびKUM-4を含むが、これらに限定されない初代間質細胞に由来する細胞であってもよい。

30

【0028】

密度勾配遠心分離とは、血液、骨髄、またはサンプルを、個別の成分、例えば血漿、赤血球、顆粒球、単球の分画に分離するプロセスを指す。血液、骨髄、またはリンパ節のサンプルは、勾配培地（例えばFicoll-Paque（登録商標）、Lymphoprep（登録商標）、Histopaque1077TM（登録商標）または他の同様の培地）上で重なっており、遠心分離後、各成分の分離された分画を除去できる（図1）。

40

【0029】

血漿分画または血清分画とは、密度勾配遠心分離後に、血液、骨髄、またはリンパ節サンプルから得られた血漿である。図1で見られるように、これは上部の分画である。残存する白血球がなおこの分画に残留している可能性があるが、AE1 μ lあたり白血球が100未満の濃度であろう。血清は血漿であり、凝固因子は除去される。

【0030】

赤血球分画とは、主に赤血球を含むAE。末梢血、骨髄またはリンパ節のサンプルが、密度勾配遠心分離によって様々な成分部分へ分離される場合、図1で見られるように、赤血球は底部の分画である。残存する白血球がなおこの分画に残留している可能性があるが、AE1 μ lあたり白血球が100未満の濃度であろう。

50

【0031】

可溶性因子とは、腫瘍微小環境の非細胞成分を指し、これには、腫瘍由来エキソソーム、シグナル分子、成長因子、ケモカイン、サイトカイン、マイクロRNA、および、腫瘍細胞または非腫瘍細胞由来の任意の可溶性分子が含まれる（9, 16, 17）。これらの例には、限定されないが、インターロイキン（IL）-2、IL-4、IL-6、IL-8、IL-10、IL-13、IL-15、IL-21、分化（sCD）40リガンドの可溶性クラスター、免疫グロブリン（Ig）M、CpG（非メチル化CpGジヌクレオチドモチーフを含む短い合成一本鎖DNA分子）、B細胞活性化因子（BAFF）、増殖誘導リガンド（Proliferation Inducing Ligand）（APRIL）、腫瘍由来エキソソーム（腫瘍微小環境の中に存在する腫瘍細胞由来の小胞）、が含まれる。

10

【0032】

種々の薬物とは、化学療法薬または細胞障害性薬物であり、細胞に対し有毒な化学製品を含み、細胞の複製または成長を妨害する薬剤（例えばブスルファン、シクロホスファミド、ミトキサントロン、ダウノルビシン、ドキソルビシン、メルファラン、ビンクリスチン、ビンブラスチンおよびクロラムブチル）；標的化された抗癌療法薬であり、腫瘍の成長および進行に必要な特定の分子を妨害するように設計された薬物（例えばイマチニブ、ダサチニブ、ニロチニブ）；腫瘍溶解性薬物、すなわち腫瘍に侵入して自身を複製するウイルスで、それにより、癌を死滅させ、その効果を増幅するために免疫応答を喚起するもの（例えばImlygicとペプチケミオ）；免疫療法薬であり、免疫応答を誘導、増強、または抑制することによる疾患の処置するもの（例えばアレムツズマブ、オファツムマブ、リツキシマブ）；サイトカイン療法であり、サイトカインは疾病を処置するために使用される細胞シグナリングにおいて重要な、幅広いカテゴリーの小さいタンパク質（例えばインターフェロン（IFN α 、IFN β 、IFN γ およびIFN λ ）およびインターロイキン（IL-2、IL-8、IL-21））；腫瘍微小環境薬物、すなわち、腫瘍よりも微小環境を標的とする薬物（例えばイブルチニブおよびイデラリシブ）；共刺激分子の活性化剤、すなわち有効な免疫応答の進行にとって重要な共刺激分子を活性化する薬剤（例えば分化（CD）28、OX40、CD137、CD27、のクラスター、ヘルペスウイルス侵入メディエータ（Herpesvirus-entry mediator）（HVEM））；抑制分子の阻害剤、すなわち、システムのサイレンシング阻害剤により、応答を喚起する薬物（例えば、プログラム細胞死1（PD1）およびリンパ球活性化遺伝子3（LAG-3）に対する抗体）。

20

30

【0033】

測定されるパラメータは、生存率、すなわち生細胞の測定値；増殖、すなわち、細胞の形成または発達；アポトーシス、すなわち、プログラム細胞死のプロセス；細胞不足、すなわち、壊死またはアポトーシスではないメカニズムによる細胞の損失；表面マーカー発現の変化、すなわち、CDマーカーなどの細胞表面マーカーの出現または消失をモニタリングする；サイトカイン／ケモカイン産生の変化、すなわち、細胞集団によって産生されるこれらの分子のレベルを測定する。

【0034】

40

3D細胞培養とは、生物学的細胞が成長すること、または3次元すべてにおいて周囲と相互作用することを可能にする、人工的に創出された環境（例えばスフェロイド構築物、細胞外マトリックスゲル、合成スキャフォールド、回転式細胞培養システム、または低／非接着性培養プラスチック（15, 18, 19））である。

【0035】

循環腫瘍細胞とは、腫瘍から抜け出し、癌患者の血流を通して移動する細胞である。

【0036】

サンプル全体（例えば、末梢血全体、骨髄全体、またはリンパ節全体）とは、サンプルを全体的に使用することである。成分はサンプルから取り除かれず、分離されなかった。一例として、骨髄サンプルから分離されたリンパ球はサンプル全体とは見なされない。

50

【0037】

本発明で開示された薬物または薬物の組み合わせの方法に対する、原発腫瘍細胞集団の応答性を試験するためのA Eの使用には、本明細書に記載される先行技術のものを上回るいくつかの利点がある。1つの利点は、本発明の方法が原発腫瘍細胞集団の生存率を増強させるということであり、これにより、試験の期間および薬の長期的な活性についての対応する評価を延長させる。別の利点としては、この方法は、原発腫瘍細胞集団の増殖を、以前に報告されていないレベルにまで促進する(14)ということである。これらの利点により、様々なインキュベーション時間および細胞増殖を阻害する薬物のような多くの薬物組成物を含む、原発腫瘍細胞集団の細胞応答のエキスピボ分析における多数の変数の使用が可能になる。別の利点は、患者の原発腫瘍細胞集団のインビボの微小環境をより厳密に模倣するような方法で、原発腫瘍細胞集団を分析できるということである。これは、評価に微小環境模倣アッセイを必要とする、微小環境を標的とする薬物、例えばイブルチニブおよびイデラリシブの場合には特に重要である。該方法の前述された特徴および利点と組み合わせたり、本発明はまた、1つまたは複数の薬物が原発腫瘍の処置において患者(または複数の患者)にとって有益であるかどうかを決定するためのエキスピボ試験の能力を改善するという利点をもたらす。特定の実施形態では、この試験は、患者における所与の治療の有効性を決定するために使用することができる。

10

【0038】

ある実施形態では、A E(例えば、血漿分画のみ、赤血球分画のみ、またはその両方であるが、白血球分画は常に除外する、すなわち白血球の無いA E)は、薬物(複数可)に対する初代細胞の細胞応答性を試験する、エキスピボアッセイに加えられる。別の実施形態では、A E(例えば、血漿分画のみ、赤血球分画のみ、またはその両方であるが、白血球分画は常に除外する、すなわち無白血球A E)は、薬物(複数可)に対する原発腫瘍細胞の細胞応答性を試験する、エキスピボアッセイに加えられる。ある実施形態では、A Eは、残存する数がA E 1 μ l 当たり100未満の白血球を含んでいる。別の実施形態では、A E調製物中に存在する残存する白血球は、試験される原発腫瘍細胞と区別するために標識される。一実施形態では、原発腫瘍細胞は、原発腫瘍細胞と、A Eと、薬物(複数可)と、を含むインキュベーション混合物中でインキュベートされる。別の実施形態では、原発腫瘍細胞は、A Eと、1つ以上の可溶性因子(例えば、サイトカイン/ケモカインまたは非腫瘍細胞由来の分子)と、薬物(複数可)と、を含むインキュベーション混合物中でインキュベートされる。別の実施形態では、原発性腫瘍細胞は、A Eと、インビボ腫瘍微小環境において見出される細胞型を表すさらなる細胞集団の共培養物と、薬物(複数可)と、を含むインキュベーション混合物中でインキュベートされる。さらなる実施形態では、原発腫瘍細胞は、A Eと、1つ以上の可溶性因子(例えば、サイトカイン/ケモカインまたは非腫瘍細胞由来の分子)と、インビボ腫瘍微小環境において見出される細胞型を表すさらなる細胞集団の共培養物と、薬物(複数可)と、を含むインキュベーション混合物中でインキュベートされる。

20

30

【0039】

ある実施形態では、A Eは、他の種からの成分を含むエキスピボアッセイ系に加えられる。これらの成分には、限定されないが、ウシ胎児血清、子ウシ血清、またはこれらに由来する成分が含まれる。一実施形態では、A Eは、様々な栄養素で補足された培地を含むエキスピボアッセイに加えられる。これらの培地には、限定されないが、RPMI-1640、AIM-V、DMEMとIMDMが含まれる。さらなる実施形態では、A Eは、固形腫瘍の微小環境構造を模倣するために構築された、エキスピボの3D細胞培養構築物で構成されたアッセイ系に加えられる。これは、例えば、スフェロイド、細胞外マトリックスゲル、合成スキャフォールド、回転式細胞培養システム内、または、低/非接着性培養プラスチック(18-20)上の一次組織または樹立細胞株の培養により達成される。

40

【0040】

一実施形態において、インキュベーション混合物は、原発腫瘍細胞に対する薬物(複数可)の効果の分析前に、2時間から14日の期限の間インキュベートされる。一実施形態

50

において、インキュベーション混合物に添加された溶性因子は、限定されないが、腫瘍由来のエキソソーム、シグナル分子、成長因子、ケモカイン、サイトカイン、および腫瘍または非腫瘍細胞（9、16、17）に由来するいかなる可溶性分子を含むリストにあるものから構成される。これらの例は、限定されないが、IL-2、IL-4、IL-6、IL-8、IL-10、IL-13、IL-15、IL-21、sCD40L、IgM、CpG、BAFF、またはAPRILを含む。

【0041】

一実施形態において、インビボ腫瘍微小環境において発見され、インキュベーション混合物に添加された細胞型の代表であるさらなる細胞集団は、限定されないが、以下のものに由来する初代細胞または細胞株のいずれかを含むリストから含まれる：細網線維芽細胞、ナース様細胞、間葉系幹細胞、濾胞樹状細胞、内皮細胞、および周皮細胞（5、21、22）。初代間質細胞に由来する細胞株は、限定されないが、HS-5、HS27a、UE6E7T-2、NK-Tert、HMEC-1、KUSA-H1、M210B4、ST-2、およびKUM-4を含む。

10

【0042】

好ましい実施形態において、AE分画は数人のドナーから採取され、全てのドナーは原発腫瘍細胞を提供する患者とは異なり、ここで全ての血漿分画はともにプールされ、適合する血液型からの赤血球がプールされ、AE内の患者間のドナー変動性を低下させた。別の実施形態において、AE分画は、原発腫瘍細胞を提供する患者とは異なる単独のドナーからの分画から成る。さらなる実施形態において、AE分画は、原発腫瘍細胞を提供した

20

【0043】

好ましい実施形態において、AEは、試験される原発腫瘍細胞が抽出された患者と同じタイプの癌のドナー／患者から得られた分画から成る（例えばCLLと診断された患者からの第1の腫瘍サンプルを試験するために、アッセイにおいて使用されるAEは、CLLと診断された1人以上の患者から得られた血漿分画および血清分画から成るだろう。）。別の実施形態において、AEは健康的なドナーから得られた分画から成る。さらなる実施形態において、AEは、試験される原発腫瘍細胞の癌とは異なる癌と診断されたドナーから得られた分画から成る。

【0044】

一実施形態において、初代細胞サンプルに対応するAEは別々に保存され、それによって、血漿分画は-80℃で凍結することができ、赤血球分画は4℃でCPDAバッグ内に最大45日間保存される。

30

【0045】

好ましい実施形態において、初代細胞サンプルは、試験の前に凍結保存された。別の実施形態において、初代細胞サンプルは新たに抽出された。特定の実施形態において、凍結保存された初代細胞サンプルは、AEと共に解凍される。好ましい実施形態では、凍結保存された初代細胞サンプルは、AEと共に凍結保存される。初代細胞サンプルは、凍結した後に任意の時間凍結保存することができた。一実施形態において、初代細胞サンプルは、凍結した5日後から1年後まで凍結保存される。別の実施形態において、初代細胞サンプルは、凍結した1年後から20年後まで凍結保存される。AEと共に凍結保存された初代細胞サンプルを再構成することによって、前記初代細胞のネイティブ環境により類似したサンプルが提供され、初代細胞の、生存率および／もしくは増殖、ならびに／または薬理学的特性の維持が向上する。

40

【0046】

一実施形態において、第1の腫瘍サンプルは成人の癌患者から抽出された。別の実施形態において、第1の腫瘍サンプルは小児患者から抽出された。一実施形態において、第1の腫瘍サンプルは、癌のための前処置を受けていない癌患者から抽出された。別の実施形態において、第1の腫瘍サンプルは、癌のための1回以上の前処置を受けた癌患者から抽出された。さらなる実施形態において、第1の腫瘍サンプルは微小残存病変（MRD）の

50

患者から抽出された。

【0047】

特定の実施形態において、原発腫瘍細胞は血液学的悪性腫瘍と診断された患者から得られる。血液学的悪性腫瘍は、限定されないが、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫（例えばB細胞リンパ腫、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫、マントル細胞リンパ腫、辺縁帯B細胞リンパ腫、バーキットリンパ腫、リンパ形質細胞性リンパ腫、ヘアリー細胞白血病）、慢性リンパ球性白血病、急性骨髄性白血病、慢性骨髄性白血病、骨髄異形成症候群、多発性骨髄腫、または急性リンパ性白血病を含む。好ましい実施形態において、血液学的悪性腫瘍と診断された患者から原発腫瘍細胞は、末梢血液、骨髄、リンパ節、および脾臓から成る群から選択される。

10

【0048】

別の実施形態において、原発腫瘍細胞は、固形腫瘍と診断された患者から抽出される。固形腫瘍は、限定されないが、卵巣癌、直腸癌、肛門部の癌、胃癌、精巣癌、子宮癌、結腸癌、直腸癌、腎細胞癌、肝臓癌、肺非小細胞癌、小腸の癌、食道癌、黒色腫、内分泌系の癌、甲状腺の癌、副甲状腺の癌、副腎の癌、骨癌、膀胱癌、皮膚癌、頭頸部癌、皮膚または眼内の悪性黒色腫、子宮癌、ファロピウス管の細胞腫、脳幹神経膠腫、下垂体腺腫、カポジ肉腫、類表皮癌、扁平上皮癌、子宮内膜の細胞腫、頸部の細胞腫、膣癌、外陰癌、軟組織の肉腫、尿道癌、陰茎癌、膀胱癌、腎臓癌もしくは尿管癌、腎盂癌、中枢神経系（CNS）の腫瘍、中枢神経原発リンパ腫、腫瘍血管新生、脊椎軸腫瘍、前記癌の転移巣、またはそれらの組み合わせを含む。好ましい実施形態において、固形腫瘍からの原発腫瘍細胞は固形腫瘍の生検を介して得られる。別の実施形態において、固形腫瘍細胞は末梢血液のサンプルを介して抽出された循環腫瘍細胞である。一実施形態において、AEを含むインキュベーション混合物中で試験された薬物（複数可）は、限定されないが、以下のカテゴリーから選択された1つ以上の治療剤から成る：化学療法、標的化された抗癌療法、腫瘍溶解性の薬物、細胞毒性薬、免疫療法、サイトカイン、微小環境を標的とする薬物、副刺激分子の活性剤、抑制分子の阻害剤、または細胞免疫療法。

20

【0049】

一実施形態において、原発腫瘍細胞集団の細胞応答のエクスピボ分析は、限定されないが、以下のものの1つ以上の測定を含む：生存率、増殖、アポトーシス、細胞不足、表面マーカーの発現における変化サイトカイン／ケモカインの生産における変化、原発腫瘍細胞集団内で特定された1つ以上の細胞亜集団に対するこれらのパラメータの分析。

30

【0050】

一実施形態において、AE（例えば血漿分画のみ、赤血球分画のみまたは両方）は、薬物（複数可）に対する、初代細胞すなわち腫瘍細胞でない細胞の細胞応答性を試験するエクスピボアッセイに加えられる。初代細胞は、限定されないが、自己免疫疾患、血液凝固異常、および貧血症を含む血液疾患と診断された患者から抽出されることもある。特定の実施形態において、疾患の処置が開始された後、原発腫瘍細胞は患者から抽出される。原発腫瘍細胞の細胞応答性を試験するエクスピボアッセイは、所定の処理が前記患者に対して効果的であるかどうかを判定するために使用されうる。一実施形態において、患者のサンプルは、処置の開始5、6、7、8、9、または10日後に得られる。特定の実施形態において、患者からのサンプルは、処置を始めて7日後にイデラリシブを用いて処理されて得られたリンパ節生検標本に対応する。

40

【0051】

一実施形態において、AE（例えば血漿分画のみ、赤血球分画のみまたは両方）は、開発中の薬物（複数可）に対する、健康的なまたは病的な初代細胞の細胞応答性を試験するエクスピボアッセイに加えられる。

【0052】

一実施形態において、AE（例えば血漿分画のみ、赤血球分画のみまたは両方）は、臨床試験において試験されている薬物（複数可）に対する、初代細胞の細胞応答性を試験するエクスピボアッセイに加えられる。本実施形態において、結果から、その薬物が患者に

50

潜在的に有用であるかどうか、かつその患者が臨床試験にとって優れた候補であったかどうかに関する情報を提供することができた。

【実施例】

【0053】

本明細書中で使用されるPB、BM、およびLNサンプルは、18歳以上の成人の患者からのものであった。全ての患者は、各病院の倫理委員会により承認されたプロトコルを使用する研究への参加のための書面でのインフォームド・コンセントを与えた。サンプルは、Programa Espanol de Tratamientos en Hematologia (PETHEMA)のグループからのSpanish Centers、およびHospital San Raffaele, Milan, Italyにより提供された。

10

【0054】

実施例1 — 密度勾配遠心分離による人工環境(AE)成分の調製

本発明において記載されるAEの成分を以下のように調製する：Histopaque 1077 (Sigma)をコニカル遠心管に添加する。ドナーからの末梢血液(PB)、または骨髄(BM)、またはリンパ節(LN)サンプルを、慎重にHistopaque-1077の溶液上へと重ね、そして1500rpmで40分間遠心分離にかける。血漿分画を含む上部の層を先に取り除く。単核細胞(MNC)、Histopaque-1077、および顆粒球層(白血球分画)を含む中心の層を取り除き、廃棄する。その後、赤血球(RBC)または赤血球分画を含む下部の層を取り除く(図1)。血漿分画を、使用するまで-80℃で貯蔵する。抗凝血性クエン酸リン酸デキストロースアデニン溶液(CPDA-1, Terumo Corporation, Tokyo, Japan)を、RBC分画(150μl CPDA/ml RBC)に添加し、これを最大35日の間4℃で貯蔵する。血漿および赤血球の分画を、AEが細胞培地を補う全ての実験用に1:1の割合で混合する。

20

【0055】

中間部分を勾配培地(gradient media)および白血球集団を取り除くために除外する。白血球を除外することによって、主要組織適合遺伝子複合体(MHC)の相互作用を心配することなく、他のドナーからの初代細胞のサンプルの試験においてAE調製物を使用することを可能にする。白血球集団(例えばT細胞およびNK細胞)一部上のMHC受容体は、白血球集団に自己由来ではないサンプルからの初代細胞を攻撃させることもある。したがって、AE調製物から白血球集団を除外することが必要である。しかしながら、実際問題として、記載された方法は富化プロセスである。全ての分画は残留数の白血球を含むこともあるが、その数は試験されている初代細胞集団に対する測定可能なMHCの効果を持つには十分ではないこともある。血漿と赤血球からなるAEを使用して、初代細胞の生存率およびそれらの増殖する能力に影響を与えるエキスピボアッセイ系へ因子を加える。これらのAE因子はまた、薬物がどのように有効性と潜在能力に関して初代細胞と相互作用するか、に影響を与えることもある。

30

【0056】

血漿分画だけを使用する場合には、AEは以下のように調製される：全PB、BM、またはLNのサンプルを、4℃で15分間、2500rpmで遠心分離機にかける。血漿分画を含む上部の層を取り除き、少量の分画に小分けし、使用するまで-80℃で保管する。

40

【0057】

実施例2 — AEは、新鮮な原発性腫瘍細胞と冷凍の原発性腫瘍細胞との間の結果の優れた相関作用を可能にする

予め凍結保存されたサンプルの解凍におけるAEの役割を調査した。凍結保存の方法は、一般的に白血球を分離するために密度勾配に依存し、白血球分画だけが凍結保存される。ゆえに、これらの細胞が解凍されたとき、分離された白血球はそのAEを全く持たないという結果となる。したがって、これらの解凍された細胞上の化合物の活性を、AEが存在しないことで、人為的に改変することができた。これらの凍結保存された細胞のAEを加

50

減 (a d d b a c k) することができるのか、および、凍結／解凍のプロセスによって細胞毒性や抗増殖性の薬物の化合物の活性が変わるかどうかを調査した。新鮮な B M A M L のサンプルを 2 つのパートに分けた；1 つ目のパートでは、新鮮なサンプルとして、その A E 中のいくつかの化合物の用量反応曲線の評価した。他のパートでは、凍結保存された白血球分画、 -20°C で冷凍された血漿分画、および血液バッグからの C P D A 内に 4°C で保存されていた赤血球－顆粒球分画を分離する密度勾配を行った。2 週後に、凍結保存されたガラス瓶は解凍された。また、各患者からの血漿と赤血球の分画は 1 : 1 比率で混合され、解凍された初代細胞へ添加した。これらの化合物の活性と同じ評価を繰り返し、再構成された A E を用いて同じ患者の新鮮なサンプル対凍結されたサンプルにおける結果を比較した。

10

【0058】

7 つの様々な薬物の 8 つの濃度について試験し、24 時間および 48 時間インキュベートし、また、インキュベーションの前の生存率の結果も得た。インキュベーションの後、赤血球を溶解し、白血球細胞を特定するために、白血球をモノクローナル抗体の組み合わせを使用して染色した。分析からアポトーシス細胞を除外するためにアネキシン V も含ませた。曲線下面積 (A U C) を、各薬物および各疾患に対して算出した。図 2 A は、新鮮な及び冷凍の初代 A M L 細胞を使用して、24 時間および 48 時間 (黒丸対白丸) で、各薬物 (様々な色彩強度) に対する得られた A U C 間の相関作用を示す。優れた相関作用が、各薬物および条件に対して得られた ($r^2 = 0.618$)。このことは、A E が回復する限り、これらの化合物の活性は、これらの細胞を凍結し解凍することによる影響を受けなかったことを示す。したがって、再構成された A E を有する凍結保存されたサンプルは、化合物の活性を評価するために使用することもできる。

20

【0059】

図 2 B は、同じ A M L サンプルが様々な分析を用いて処理されるときに得られた生存率の違いを示す。新鮮な骨髓全体中の白血球細胞の生存率と、凍結して解凍した同じサンプルから分離された白血球の生存率との比較を、5 つの A M L サンプルにおいて分析した (灰色の四角)。新鮮な骨髓全体中の白血球細胞の生存率と、凍結して解凍した再構成された A E を有する同じサンプルから分離された白血球の生存率との比較を、10 の A M L サンプルにおいて分析した (黒色の四角)。上のパネルは白血球細胞の最初の生存率を表わすが、下のパネルは 48 時間のインキュベーション後の白血球細胞の生存率を示す。各条件の中央値、平均 (A v g) および標準偏差 (S t d D e v) を、各グラフの下表に示す。各条件に関する最初の生存率において、有意差は観察されない。しかしながら、骨髓全体と比較して、再構成された A E 用いることなく分離した白血球が使用されるとき、生存率の低下が観察される。この低下は、A E が分離した白血球へ一旦加えられると観察されなくなり、新鮮な骨髓全体で得られる能力に類似の非常によい生存率が得られる。

30

【0060】

類似の結果が、A L L などの他の血液学的悪性腫瘍に対しても観察された。図 2 C は、A L L のサンプル中の化合物に関する 48 時間および 72 時間の用量反応曲線を示す。実線は新鮮なサンプルを表わし、点線は、患者 (血漿および赤血球の分画) からの凍結保存された A E で再構成された同じサンプルから解凍し分離したリンパ球を表わす。図 2 C で見られるように両方の方法の間で有意差が観察されず、これによって A E を解凍されたサンプルへ後に加えて、類似の薬物感受性を得ることができることを示す。

40

【0061】

実施例 3 — 原発性腫瘍細胞集団における生存率および増殖を試験ための分析

原発性腫瘍細胞集団を試験する全ての分析に関して、V y b r a n t (登録商標) C F D A S E C e l l T r a c e r K i t (分子プローブ) は細胞増殖を測定するために使用される。C F D A S E (成分 A) を、原液として 5 m M の濃度でジメチルスルホキシド (成分 B) 内に溶解し、次の使用まで -20°C で保存する。本実施例において、新たに抽出し分離した C L L 細胞を、リン酸緩衝食塩水 (P B S (S i g m a)) 中に 1.0×10^6 c e l l s / m l で調節した。C F D A を、初代 C L L 細胞の 1 m l 細胞懸濁液へ

50

加え、5 μ Mの最終濃度とする。CFDAの添加後、連続的に振とうし光から保護した状態で、細胞を10分間室温で攪拌してインキュベートした。インキュベーション期間の終わりに、細胞を培地中で再攪拌し、5分間氷上で維持した。その細胞を培養液で2回洗浄し、使用するまで4℃で維持した。このステップを、実験用調製における全ての他のステップ前に実施した。

【0062】

その後、CFDAで標識された初代CLL細胞を96ウェルプレートへと分配する。細胞は、1 μ g/mlのオリゴデオキシリボヌクレオチド含有CpGモチーフ(ODN2006; Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany)と、50 ng/mlのインターロイキン2(IL-2, Peprotech, London, United Kingdom)と、のサイトカインの組み合わせで刺激した。刺激は、生存率および増殖の両方を制御するためには使用されない。インキュベーションの96時間後、そのプレートを洗浄した。その後、20 μ lのアネキシンV CF Blue(Immunostep, Salamanca, Spain)と、CD19 PC7(Clone J4.119, Beckman Coulter)と、CD45-APC(clone HI30, Immunostep, Salamanca, Spain)との組み合わせを添加した。暗所において室温で15分間インキュベーションした後洗浄ステップを実施し、そのペレットを、ViviaのExviTechプラットフォームにおける分析のために、80 μ lバッファー中で再攪拌する。

【0063】

分析に関して、初代CLL細胞を特定するために、抗体CD19とCD45を使用し、アネキシンV染色によってアポトーシス細胞および生細胞を区別して生存率を試験し、CFDAによって増殖をモニタリングすることを可能にする。図3Aは、初代CLL細胞が、前方散乱(FSC)および/または側方散乱(SSC)に基づくゲーティング戦略(gating strategy)、および様々な表面マーカー(CD19とCD45)の発現を使用してどのように特定されるかを示す。図3Bは、Aにおいて特定された初代CLL細胞を表示するプロットを示すが、しかし、アネキシンV染色がアポトーシス細胞および生存細胞を区別する場合である。図3Cは、増殖する集団をCFDA染色によってどのように特定するかを示す。左のパネルは、サイトカインへさらされておらず、なお単一の集団を示すCLL細胞の実施例を示す。右のパネルは、サンプルのある部分が増殖しており、サンプルのある部分がそうではないサイトカインへさらされたCLL細胞を示す。

【0064】

実施例4 — HS-5間質細胞で共培養された、正常なPBまたはBMからAEを補足されたCLLサンプル中の生存率および増殖

CLLと診断された患者からの原発腫瘍細胞に対する最適条件に関して試験するために、フローサイトメトリーベースのスクリーニング過程が使用される。試験される条件は表1に要約される。各アッセイにおけるB細胞に対するHS-5間質細胞の比率が示される。

【0065】

【表 1】

表 1

サイトカイン	AE (血漿及び赤血球分画)		
	無し	正常な PB (3)	正常な BM (3)
無し	無し	無し	無し
	1:10	1:10	1:10
	1:100	1:100	1:100
sCD40L+IL2	無し	無し	無し
	1:10	1:10	1:10
	1:100	1:100	1:100
sCD40L+CpG	無し	無し	無し
	1:10	1:10	1:10
	1:100	1:100	1:100
IL2+CpG	無し	無し	無し
	1:10	1:10	1:10
	1:100	1:100	1:100

【0066】

3つの凍結保存されたCLL原発腫瘍サンプルが、HS-5間質細胞とともに及びそれなしで試験される（無し、1:10および1:100）。HS-5（23）細胞を組み込んだプレートは、 10^2 または 10^3 細胞/ $60\mu\text{l}$ /ウェルで96ウェルプレートに蒔かれ、24時間インキュベートされて、細胞を接着させる。CLL原発腫瘍細胞はCFDAで標識される。AEに存在する残余の白血球は、CFDAで標識されず、これによって、試験されている原発腫瘍細胞集団と区別され得る。

【0067】

AE、血漿および赤血球分画は、PBから3人およびBMから3人の、6人の健康なドナーから分離され、別々に試験される（サンプルはプールされなかった）。AEは $1\mu\text{l}$ /ウェルで適切なウェルに加えられる。3つのサイトカインの対も試験される： $1\mu\text{g}/\text{ml}$ のCD40リガンド（sCD40L、PeproTech, London, United Kingdom）+ $25\text{ng}/\text{ml}$ のIL-2（PeproTech, London, United Kingdom）、 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ のsCD40L+ $1\mu\text{g}/\text{ml}$ のCpG（ODN2006 Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany）および $1\mu\text{g}/\text{ml}$ のCpG+ $50\text{ng}/\text{ml}$ のIL-2。刺激は、生存率および増殖の両方の制御として使用されない。各条件に対する複製（Replicate）プレートは、それぞれ3回繰り返して、72時間および96時間の2つの時間点に対してインキュベートされる。

【0068】

実験は、CLL患者のサンプルにおける悪性B細胞集団の生存率および増殖両方を試験した。全体的な結果は図4に示され、グラフはそれぞれ、中央値の生存率+/-SD（標準偏差）として測定された、Y軸上の生存率およびX軸上の増殖を示す。72時間または96時間の各時間点に関して、縦の列は、HS-5細胞（0）での共培養のない状態、または腫瘍細胞に対するHS-5細胞の1:10（1:10）または1:100（1:100）比率での共培養を示している。3つの横の行はAE条件を示し、一番上の行はAEを含まず。真ん中の行は正常なBMからのAEを含み、および一番下の行は正常なPBからのAEである。図4は、各サイトカインの組み合わせに対する中央値の応答を示す。増殖の最高レベルは、AEを含んでいないサンプルである（一番上の行）。これは、AE成

分なしで分離された細胞に対する薬物の効果を試験することが、薬物の有効性を過大評価することになり得ることを示しており、これは、A Eが腫瘍細胞にも影響を与える成分を有し得るからである。薬物が主として増殖細胞に対して影響を与える場合、それはA Eがない状態でより大きなエクスピボでの効果を有するだろう。多くの条件は生存率を改善したが、増殖を誘発することはより難しい。試験されたすべての条件のうち、C p G + I L - 2 サイトカインの対だけが、生存率および増殖両方に対してプラスの効果があった（円を参照）。これは、A Eなしでの又はN P B由来のA Eを含む、H S - 5細胞での1 : 1 0 0の共培養の存在下において9 6時間で見られる。N B M由来のA Eは、C p G + I L - 2によって誘発された増殖を阻害するように見える。生存率および増殖両方を考慮する最良の全体的な条件は、C p G + I L - 2およびN P B由来のA Eが、1 : 1 0 0でH S - 5細胞で共培養された、9 6時間のインキュベーションであった（図4の右下）。 10

【0069】

実施例5 — 健康なドナーからの及びC L L患者のサンプルからのP B由来のA Eを使用する生存率および増殖

本発明の方法を、健康なドナーおよびC L L患者両方のP B由来のA Eを評価するために使用した。この実験のための条件を、 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ のC p G + $50 \text{ ng}/\text{ml}$ のI L - 2を使用して、H S - 5共培養なしで及び1 : 1 0のH S - 5共培養を用いて、各々7 2時間および9 6時間のインキュベーション時間でサンプルを刺激するように設定した。代表的な患者のサンプルからの凍結保存された原発性C L L腫瘍細胞は、図5に示される。白棒は7 2時間の結果であり、黒棒は9 6時間の結果である。対照サンプルは、C p G + I L 2をプラスした又はマイナスした、A EのないC L L原発腫瘍サンプルを指す。原発腫瘍サンプルを、5人の健康なドナー（N P B）から及び5人のC L Lドナー（C L L）からのA E（血漿および赤血球分画、 $1 \mu\text{l}/\text{ウェル}$ ）を用いて試験した。上のグラフの設定において見るように、生存率のレベルは2つのタイプのA E間でかなり近似しており、H S - 5共培養の存在は、両方に対するレベルを幾らか低下させた。下のグラフは増殖のレベルを示し、最も大きな効果は、H S - 5共培養およびC L L患者からのA E（右下）を用いる条件である。これらの条件は、最大6 0 %までの腫瘍細胞増殖のレベルをもたらした。これは、最近報告された（1 4）原発性C L L細胞におけるわずか1 5 %の増殖レベルを十分に超えるものである。対象の1つの他のポイントは、類似したドナーサンプル内では、結果が様々であるということである。これは、H S - 5共培養でC L L腫瘍細胞の生存能を大いに阻害した1つの特定のA Eにおいて有意である（円を参照）。これは、得られるA Eが、本明細書に見られる患者間の変動性を限定するために使用前に試験される必要があり、潜在的にプールされる必要があることを示している。 20 30

【0070】

実施例6 — 血漿のみ又は血漿+赤血球でのプールされたA Eを使用する生存率および増殖

本発明の方法を、C L Lの凍結保存したサンプルにおけるC L Lまたは正常なサンプルからのA Eの異なる成分の効果を評価するために使用した。4つのC L Lの冷凍したサンプルを、対照（黒丸）と一緒に $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ のC p G + $50 \text{ ng}/\text{ml}$ のI L - 2（灰色の丸）で播種し、増殖（X軸、中央値の増殖+ / - S D）および生存率（Y軸、および中央値の生存率+ / - S D）両方を試験した（図6）。丸からの縦および横の線は、両方のパラメータに対するエラーバーを表わす。6つの正常なP B（N P B）および6つのC L LのP Bの培地を、A E補足のソースとして使用した。高い患者間の変動性を回避するために、前に記載されたように、6つすべてのサンプルに対する血漿およびR B Cを、同じリザーバーと一緒に加え、割合（1 : 1）を維持した。3つの横の列は、9 6時間のインキュベーションでの異なるH S 5間質細胞株の密度（1 : 1 0、1 : 1 0 0および無し）を示す。列はそれぞれ異なる細胞培養条件を表わす： 40

・ 第1の列（C L L P B）：C L Lからの末梢血から得られた血漿および赤血球（R B C）から構成されたA E。 50

- ・ 第2の列 (N P B) : 正常な末梢血から得られた血漿および赤血球から構成された A E。
- ・ 第3の列 (血漿 C L L P B) : C L L P Bの血漿分画だけ (R B Cなし)。
- ・ 第4の列 (血漿 N P B) : N P Bサンプルの血漿分画だけ (R B Cなし)。
- ・ 第5の列 (2 x C L L P B) : C L L P Bから得られた血漿および赤血球から構成された A Eの量の倍。
- ・ 第6の列 (2 x N P B) : N P Bから得られた血漿および赤血球から構成された A Eの量の倍。
- ・ 第7の列 (2 x 血漿 C L L N P B) : C L Lサンプルの血漿分画の二倍の量。
- ・ 第8の列 (2 x 血漿 N P B) : N P Bサンプルの血漿分画の二倍の量。

10

【0071】

これらの条件は、C L L P B (列1) からの血漿および赤血球から構成された加える A EとN P B (列2) からの血漿および赤血球から構成された加える A Eとの間の明確な差を示している。C L L P B+サイトカインからの A Eは増殖を増加させ (円を参照)、一方、正常な患者 (N P B) からの A Eは、サイトカインの存在下でさえも増殖に対する効果がほとんどなかった。加えた、C L L由来の A Eに関して、血漿だけが使用されたときに、増殖 (X軸) および生存率 (Y軸) 両方が縮小されるため、血漿分画のみで構成される (列3および列7) よりむしろ、血漿および赤血球 (列1および列5) で構成された A Eを加えることに関連性があるようである。同様に加えられる A Eの量で飽和効果があるように見える。列5-8におけるようにより高い濃度を加えることは、列1-4に見られる改善を超える著しい改善がなかったことを示していた。これらの実験は、特に C L L P B由来の A Eで、増殖および生存率を改善することの A Eの重要性を実証しており、成分の幾つかは、N P Bと比較して、これらのパラメータを増大させるようである。

20

【0072】

実施例7 - ヒト血清対ウシ胎児血清

原発性 C L L腫瘍細胞がインキュベーション過程の間に維持される培地は、10%のウシ胎児血清 (F B S) を含有している。アッセイ系に対する F B Sの効果を判定するために、3つの C L Lサンプルを、インキュベーション培地に対して4つの異なる血清条件、10%の F B S、20%の F B S、10%のヒト血清 (H S)、または20%の H Sにおいて試験した。C L L腫瘍サンプルを、H S-5共培養なしで、または1:10または1:100の比率での共培養で試験し、1 μ g/mlの C p G + 50 ng/mlの I L-2で刺激した。A Eは C L L患者からの6つの P Bサンプルに由来するものであった。6つのサンプルからの血漿および赤血球の分画を、1:1の比率で混合し、1 μ l/ウェルでウェルに加えた。結果は、H Sが、すべての条件において F B Sよりも腫瘍細胞の生存率を著しく増加させることを示している (図7)。試験された各サンプルに対する中央値が示される。H Sおよび F B S両方を20%に増加させることは、細胞の生存率の増加に結びつくが、より高い血清中濃度も増殖を阻害する。H S-5細胞株での共培養は、H Sサンプル中の生存率を低下させるが、増殖に必要とされる。生存率および増殖のための全体的な最良の条件は、10%の H Sである。

30

【0073】

実施例8 - 表2の条件を使用して最良のサイトカインプロトコルを判定するための C L L P B+/-H S-5細胞を使用する生存率および増殖

本実験は、異なる細胞シグナル伝達を網羅する24のサイトカインの組み合わせ (表2) の生存率および増殖の効果を評価する。使用されるサイトカインは以下の通りであった: C p G (1 μ g/ml)、I L-2 (50 ng/ml)、s C D 4 0 L (1 μ g/ml)、B細胞活性化因子 (B A F F、10 ng/ml)、I g M + I g G (B C R、10 μ g/ml)、I L-2 1 (インターロイキン-21、50 ng/ml)。間質細胞、H S-5を、含めたときに1:100の希釈で使用した。これらの実験のための A Eは、C L Lを有する3人の患者の P Bから得られた血漿および赤血球であった。各サンプルからの A E分画を、培養培地に加える前に等しく分けて混合した。使用される培地は、A E (1

40

50

． 6 %) + ヒト血清 (H S) 1 0 % を含有していた。 2 0 の C L L の凍結保存した原発腫瘍サンプルを処理し、サイトカインの組み合わせのそれぞれで試験した。増殖 (X 軸) および生存率 (Y 軸) 両方を、各々のサイトカインの組み合わせに対して前に記載されたように試験した。表 2 に示された番号は、図 8 および図 9 に表わされる各組み合わせに対応している。

【 0 0 7 4 】

【表 2】

表 2

C L L サンプル + C L L P B から の A E + 1 0 % の H S				
培地 + C L L 細胞	サイトカイン		間質細胞なし	間質細胞 HS5
	2 シグナル	CD40L+CpG	1	6
		CD40L+IL21	9	14
		CpG+IL2	15	22
	3 シグナル	CD40L+CpG+BCR	4	5
		CD40L+CpG+BAFF	2	3
		CD40L+CpG+IL21	7	8
		CD40L+IL21+BCR	12	13
		CD40L+IL21+BAFF	10	11
		CpG+IL2+CD40L	20	21
		CpG+IL2+BCR	18	19
		CpG+IL2+BAFF	16	17
		サイトカインなし	24	23

【 0 0 7 5 】

図 8 におけるドットプロットのデータポイントはそれぞれ、番号によって示された 1 つの特定のサイトカインの組み合わせに対応している。

図 8 は、各組み合わせのためのすべてのサンプルに対する中央値を反映しており、これは、C L L P B A E および H S 1 0 % と一緒に C p G (1 μ g / m l) + I L 2 (5 0 n g / m l) + H S 5 (1 : 1 0 0) のサイトカインの組み合わせが、96 時間のインキュベーションで最大で 6 0 % の生存率および 4 0 % の増殖を提供する、最良の条件であることを示している。これは表内および図 8 上の組み合わせ 2 2 である。

【 0 0 7 6 】

図 9 は、すべての前の 2 4 のサイトカインの組み合わせをグ、異なる範囲の C L L 増殖 (X 軸) および生存率 (Y 軸) に改善すると前に報告された、3 つの異なる骨格刺激にグループ化している。これらは、s C D 4 0 L + C p G、s C D 4 0 L + I L - 2 1 および C p G + I L - 2 に対応している。表 2 から の 同 じ 組 み 合 わ せ 番 号 を 使 用 す る 図 9 は、各骨格刺激のためのサイトカインの組み合わせに対するすべてのサンプルの中央値を表わしている。図 9 は、細胞シグナル伝達の組み合わせ C p G + I L - 2 が、他の細胞シグナル伝達経路と比べた対照と比較して、より優れた生存率 (7 0 %) はそのままに、より高い増殖 (2 0 %) を誘発するための最良の経路であることを示している。

【 0 0 7 7 】

実施例 9 - A E の存在下での原発性 C L L 細胞上で試験されたイブルチニブおよびイデラリシブの増殖抑制作用

凍結保存された末梢血 (P B) 単核細胞は、処置を必要としている 1 5 人の C L L 患者

から提供された。これらの実験のためのA Eは、C L Lを有する3人の患者のP Bから得られた血漿および赤血球であった。各サンプルからのA E分画を、培養培地に加える前に等しく分けて混合した。試験される凍結保存されたC L L原発腫瘍細胞を、1.6%のA E、10% (v o l / v o l) のヒト血清、2%のH E P E S、1%の抗生物質、および1%のL-グルタミン200mMを補足したA I M-V (A I M-V (登録商標) + A l b u m a x (登録商標) (B S A 1 X)) において、H S-5細胞株の融合層 (c o n f l u e n t l a y e r s) 上で100:1の比率で培養した。細胞を、以下の対のサイトカインの組み合わせで刺激した: 5%のC O₂を含有している加湿空気中の37℃での96時間の1 μg / mlのC p G O D N + 50 ng / mlのI L-2。C L L細胞の生存率 (アネキシンV染色によって評価された) および増殖 (C F D A色素によって評価された) は、患者にわたる作用の範囲を網羅する8濃度のイブルチニブ (N = 15) およびイデラリシブ (N = 21) で試験される。図10A-Cは、サンプルからの用量反応 (D R) 曲線を示し、ここで灰色線はそれぞれ、異なるサンプルを表わしている。B細胞の生存指数は、100%で開始してY軸に表示され、X軸は、イブルチニブ (図10A) またはイデラリシブ (図10B) の薬物濃度を表わしている。図10Aおよび図10Bにおける左のパネルは、非増殖性 (N P) 生存腫瘍細胞における各薬物の効果を示し、右のパネルは、増殖性 (P R) 細胞分画における薬物の効果を示している。図10Aおよび図10Bは、イブルチニブ (A) およびイデラリシブ (B) 両方がN P分画に対してほとんど効果がないことを実証しており、これは薬物の直接的なアポトーシス促進活性が制限されることを示唆している。対照的に、増殖の強力な障害が、増殖 (P R) をほぼ完全にブロッ

10

20

【0078】

実施例10 — 異なるテスト条件でのM D Sサンプル中の生存率および絶対的なC D 3 4芽細胞回復

A M LおよびM D Sは両方とも、それらのC D 3 4+の発現によって特定され得る多能性造血幹細胞中の悪性腫瘍に関連付けられている。これらの細胞は、エクスビボで生存可能状態を維持することが難しいことが判明し、増殖のレベルは非常に低い。血清、培地またはA Eの適切なソースは、C D 3 4+細胞死を回避する及び特定のサイトカインでの増殖を可能にするために使用されるべきである。これらの実験では、骨髓異形成症候群 (M D S) の患者からのB Mから得られた、凍結保存された初代細胞 (単核) を試験した (図11)。7つの異なる条件を、対照を加えて試験し、これは、対照が100 ng / mlの幹細胞因子 (P e p r o t e c h, L o n d o n, U n i t e d K i n g d o m) + 50 ng / mlのI L-3を含有しているM y e l o C u l t H 5 1 0 0培地 (S t e m c e l l T e c h n o l o g i e s, V a n c o u v e r, C a n a d a) を含有していたことを除くすべての条件で、それぞれ3つの時間、24時間、48時間および72時間 (各々三通りで) に対して行われた。下記の番号はそれぞれ、サンプルセットに加えられた異なる成分を示し、図11上の番号にも対応しており、結果を示している:

30

40

1. H S 5細胞株の上清の+10% (v o l / v o l)。
2. H S 5細胞株の上清の+20% (v o l / v o l)。
3. 正常な骨髓 (N B M) からの+1.6%のA E (血漿および赤血球分画)。
4. +10% (v o l / v o l) のヒト血清 (H S)。
5. +20% (v o l / v o l) のヒト血清、R P M I + 20% (v o l / v o l) のウシ胎児血清 (F B S)。
6. H S 5細胞株+20% (v o l / v o l) のウシ胎児血清 (F B S) の+高いコンフルエント。

50

7. HS5細胞株+20% (vol/vol) のウシ胎児血清 (FBS) の+低いコンフルエント。

【0079】

対照 (CON) を、RPMI+20%のFBSにおいてインキュベートした。生存率を、我々のExvitech (登録商標) プラットフォームによるアネキシンVおよび絶対的なCD34+細胞数によって評価した。解析するべく、抗体CD45-APC (Clon HI30, Immunostep) およびCD34-PerCP (Clon581, Biolegend) が、原発性CD34+細胞を特定するために使用される。図11における上のパネルは生存率を示し、下のパネルは絶対的なCD34+芽細胞数である。AEの追加を含む異なる条件は、両方のパラメータに影響する。これらの条件の多くは、対照と比較可能である細胞培養後の生存率と類似したパターンを示し、これは、CD34+数対ベースラインに対しても同じである。しかしながら、この特定のMDSサンプルに関して興味深いことに、1つのみのNBM (番号3) からのAEの追加およびHS5間質細胞株 (高い及び低いコンフルエンス、番号6および7) での共培養は、CD34+生存率を減少させる。

10

【0080】

実施例11 — 正常なBMに由来する異なるサイトカイン混合物およびAEを含む、4つのB-NHL一次サンプルにおける生存率および増殖

CLLサンプルが示すように、異なるサイトカインの組み合わせおよび/またはAEを加えることで、B-非ホジキンリンパ腫 (B-NHL) 一次サンプルの生存率または増殖を改善しうる (図12AおよびB)。本実験では、アネキシンVおよびCFDAを用い、2つの異なる時間、72時間と96時間、異なる条件で、前述したように生存率 (Y軸) と増殖 (X軸) の両方をテストした。凍結保存された4つのB-NHL原発腫瘍サンプルが含まれた。すなわち、2つの濾胞性リンパ腫 (FL) および2つの脾辺縁帯リンパ腫 (SMZL) である。表3に示されるように、生存率と増殖の最適化のために15の異なる条件がテストされた。表3の各条件の数字は、図12のサンプルに対応する。本実施例に使用された該AEは、濃度1.6% (vol/vol) の血漿と赤血球分画より成る。

20

【0081】

【表 3】

表 3

CLL 細胞 + AIM-V		No AE	AE (NMB)
サイトカインの 組み合わせ + 10% HS	No	1	6
	HS5 (1 :100)	4	
	HS5Sup	5	7
	CpG+CD40L	8	9
	CpG+CD40L+HS5 (1:100)		10
	CpG+CD40L+HS5Sup		11
	CpG+IL2	12	13
	CpG+IL2+ HS5 (1:100)		14
	CpG+IL2+ HS5Sup		15
+ 20% HS		2	
+ 10% FBS		3	

【0082】

分析に用いられる抗体は、CD19-PE（クローン HI B19、e-Bioscience）、CD10-PE-Cya7（クローン HI10a、Biolegend）、CD45PO（クローン HI30、Invitrogen）およびCD20APC（クローン L27、Becton Dickinson）であり、初代リンパ腫細胞を特定するために使用される。4つのB-NHLサンプルに対する中央値の応答が、テストされた各条件ごとに示され、ドットプロットにおける各データポイントは、表3に示された組み合わせを表す。72時間のインキュベーションの結果は図12Aに、また96時間のインキュベーションについては図12Bに示される。グラフのY軸は生存率を示し、X軸は増殖を示す。黒い正方形はCD40Lを含む組み合わせ、白い正方形はIL2を含む組み合わせであり、円はサイトカインを含まない。CLLが示すように、様々な条件において生存率が保持されるが、最大の増殖を誘導するためにはCpG+sCD40L（黒い正方形）が必要である。最良の全般的条件は、NBMのAEを含む（あるいは含まない）CpG+sCD40L+HS 10%と共に96時間インキュベーションした場合であった（図12Bの右側の2つのデータポイント8と9）。双方ともに60%を超えるレベルの生存率と増殖を示す。

【0083】

実施例12 — MM一次サンプルの生存率および増殖

MM患者から得られた骨髄サンプルは、生存率と増殖速度を維持するための最良の条件を判定することを目的として評価された。様々なサンプルの処理が、腫瘍細胞の生存率および／または増殖にどのように影響するかを判定するために分析された。さらに、各サンプルはアッセイでの使用に先立ち、異なる処理を施された。条件は以下のとおりである：

A. MM患者の骨髄全体+FBS（20%）。

B. フィコール・ハイバック遠心法によって該MMサンプルより分離された骨髄単核細胞+自己由来血漿（5、10、20および50%）および赤血球。

C. （塩化アンモニウム溶液とBulk Lysis Cytognosによって）溶解された赤血球を含む骨髄全体+自己由来血漿（20%）。

【0084】

RPMI 1640、AIMV、DMEMおよびIMDMを含む4種の培地がテストされた。2つのヒト間質細胞株(HS27aおよびHS5)が、様々な比率(1:1、1:10および1:100)で加えられ、同様にテストされた。

【0085】

患者のBM全体は、各サンプル種別のために、前記のように得られ、調製された。Vybrant(登録商標)CFDA SE Cell Tracer Kit(分子プローブ)が、実施例3において開示される細胞増殖を測定するために用いられた。該CFDAプロトコルの後、全てのサンプルは、培地+Zell Shield(Labclinics)+L-Glu(Lonza)+20%FBSにおいて再懸濁された。条件Aのサンプルに変化はなく、条件Bのサンプルは自己由来MM血漿+RBCが加えられた異なる濃度を有し、条件Cのサンプルは20%の自己由来血漿を受け入れた。最終的な細胞濃度は20 cells/ μ l~70 cells/ μ lに及んだ。代替として、自己由来血漿は3つのMM血漿のプールに置き換えることができる。

10

【0086】

CFDA標識血漿細胞は、96ウェルプレート(60 μ l/ウェル)に分注され、37℃で、5%のCO₂において72時間あるいは96時間、インキュベートされた。分析のために、MM細胞(モノクローナル抗体による評価)は、生存率(アネキシンV染色)および増殖(CFDA)の両方についてテストされた。

【0087】

96時間のインキュベーションの後、イムノフェノタイピングを伴ったCFDA染色が、ViviaのExviTechプラットフォームを使用する前述の方法に従い、血漿細胞の生存率(アネキシンV陰性)および増殖(CFDAピーク)の両方の分析を許容した。

20

【0088】

96時間のインキュベーションの後に検知されたMM細胞の数が、単一のウェルだけではあまりにも少なかったため、プールされたウェルのアッセイは、同一の手法で処理された4つのウェルからサンプルを得て行なわれた。したがって、大幅に多くの数の細胞を評価することができ、データの信頼度は増した。これに従って、また原始細胞計算に基づいて、各ウェルにつき1000~4000の生病理学的MM細胞を蒔くためのサンプル量の計算が行われた。取得中に、4つのウェルのサンプルは、各処置のために得られ、それによって最小4000および最大16000の生血漿細胞を得た。これらの実験の結果は、20%の自己由来血漿を加えた患者の骨髓全体、あるいは少なくとも3つのMM血漿(上記の条件C)のプールの使用、およびIMDM培地の使用が、より良好なMM細胞生存率とより高い増殖速度(データなし)を達成するための、最良の条件を提供したことを示す。さらに、2つのヒト間質細胞株(HS27aおよびHS5)のいずれかの存在が、生存率と増殖の双方に負の効果を持つことが明らかになった。

30

【0089】

フォローアップ実験が、本実験の設定条件における2つのサイトカイン、IL-6(インターロイキン6)およびCpGの効果进行分析するために行なわれた。表4は、各サンプルでアッセイされた特定の条件を示す。実験手順は上述のとおりである。サイトカインが含まれる場合(xとしてマークされる)、それはインキュベーションのはじめに加えられた。

40

【0090】

【表 4】

表 4

No.	サンプル		培地	間質細胞	MM 細胞: 間質細胞 比率	FBS (%)	血漿 (%)	IL-6	CpG
1	B (フィコール)	1A	RPMI	no		20			
		1B	AIM-V	HS27a	1:100		20	X	X
2	B (フィコール)	2A	RPMI	no		20			
		2B	AIM-V	HS27a	1:100		20	X	X
3	B (フィコール)	2A	RPMI	no		20			
		3B	AIM-V	HS27a	1:100		20	X	X
4	C (BM 全体)	4A	IMDM	HS27a	1:10	13,75	6.25		
		4B						X	
5	C (BM 全体)	5A	IMDM	no		7,6	12,4		
		5B		HS5	1:20				
6	C (BM 全体)	6A	IMDM	HS27a	1:10	11,1	9		
		6B						X	
7	C (BM 全体)	7A	IMDM	no		16,5	3,5		
		7B						X	X

【0091】

サンプル種別は、本実施例のはじめに概説された異なるサンプルの処理を指す。全てのサンプルは、複製してアッセイされた（サンプル5を除く）。数字は図13のサンプルに対応する。結果は、非増殖（NP）生腫瘍細胞（白い円）、および増殖（PR）細胞分画（灰色の円）の両方に対して示される。

【0092】

前記結果は、前記サイトカインの存在が、細胞の生存率と細胞の増殖のパーセンテージに関して何の利点ももたらさないことを示す。サンプル1は、IL-6およびCpGのない状態でもより高い水準の生存率を示しさえした。間質細胞を含まないサンプル7は、最も高いレベルの生存率と増殖を示し、これは前述の結果と一致する。ここにおいても、サイトカインは前記結果に何の影響も与えなかった。エクスビボアッセイでは、IL-6およびCpGがMM細胞の生存率と増殖に影響するようには思われないと結論付けられる。間質細胞およびIL-6のない自己由来血漿の存在は、MM細胞にとってこれまでで最良の条件を提供する。他のサイトカインは異なる結果を示すかもしれない。

【0093】

実施例13 — AE（血漿のみ）の存在下における初代MM細胞上でテストされたレナリドミドの増殖抑制作用

腫瘍細胞の処置に使用されるいくつかの薬物は、活発に増殖する細胞を優先的に標的とし、抗増殖剤として作用する。この一例は、MMを診断された患者を処置するためのレナリドミドの使用である。レナリドミドの効能を、MM原発腫瘍細胞に対するエクスビボアッセイで評価するのは難しい。なぜなら、従来、使用されてきた条件下では、これらの細胞の増殖のレベルは極めて低いからである。本実施例では、MMを診断された10人の患者から得たBMサンプルを、エクスビボアッセイでテストした。AE（血漿のみ）は、増殖のレベルを増大させるために培地に加えられ、レナリドミドは0.03〜30 μMの濃

縮範囲に渡ってテストされた。

【0094】

10人のMM患者から得たBM全体は、1%の抗生物質、1%のL-グルタミン、さらに20%の自己由来血漿(AE)を補足されたIMDM培地において、96時間、培養された。サンプルは、実施例12に概説されるように処理され分析された。MM細胞の生存率(アネキシンV)および増殖(CFDA)は4の濃度のレナリドミドに対してテストされた。

【0095】

図14は、4つの標準サンプルから得た結果を示す。サンプル1、3、6および7における非増殖(NP、灰色)と増殖(PR、黒色)双方の集団中の生細胞数が図14Aに示される。AEの存在は、全てのサンプルにおける集団の増殖を誘導する。レナリドミドに反応するこれら4つのサンプルから得られた用量反応(DR)曲線(図14B)は、NP MM細胞(灰色の正方形)およびPR MM細胞(黒丸)に対する結果を示す。該MM細胞の生存指数はY軸に示され、X軸はレナリドミド薬物濃度を表す。この図は、NP MM細胞集団とPR MM細胞集団との間には、レナリドミドの感受性に明確な違いがあることを実証する。さらに、かなりのレベルの患者間の変動性があることを示す。サンプル1(図14Bの左上)では、レナリドミドはPRおよびNP細胞のいずれにも何の効果も示さない。右上のグラフは、レナリドミドがサンプル3のPR集団に対して非常に効力を発揮することを示し、低濃度で効力を発揮するが、該PR細胞の約60%を除去するのみである。より高い濃度では、レナリドミドはさらにNP細胞の約20%を除去する。サンプル6(図14Bの左下)では、PR集団に対する効力はないが、NP集団にわずかな効力がある。他方サンプル7(右下)では、レナリドミドは非常に効力があり、該PR細胞に対して非常に有効であり、より高い濃度においても該NP細胞に効果があることがわかる。これらの結果は、レナリドミドの有効性が、臨床患者間と同様、エクスピボアッセイにおける患者のサンプル間でも、大幅に変動しうること示す。さらに、それは抗増殖と細胞毒性の両方を有すると思われる。なぜならいくつかの実施例においては、増殖抑制効果はより強力であり、より低い濃度において前記細胞毒性が生じるからである。

【0096】

培地へAEを追加することによって、エクスピボ環境において、薬物に対する細胞の反応の仕方を変化させることができると結論付けられる。これは最終的に、レナリドミドのような薬物のエクスピボにおける効果を、具体的に特定の患者それぞれに対する臨床結果に関連づける手助けとなりうる。

【0097】

文献

1. Pottier, C., Wheatherspoon, A., Roncarati, P., Longuespee, R., Herfs, M., Duray, A., Delvenne, P., and Quatresooz, P. (2015) The importance of the tumor microenvironment in the therapeutic management of cancer, Expert Rev Anticancer Ther 15, 943-954.
2. Sounni, N. E., and Noel, A. (2013) Targeting the tumor microenvironment for cancer therapy, Clin Chem 59, 85-93.
3. Buggins, A. G., Pepper, C., Patten, P. E., Hewamana, S., Gohil, S., Moorhead, J., Folarin, N., Yallop, D., Thomas, N. S., Mufti, G. J., Fegan, C., and Devereux, S. (2010) Interaction with vascular endothelium enhances survival in primary chronic lymphocytic leukemia cells via NF-kappaB activation

and de novo gene transcription, *Cancer Res* 70, 7523–7533.

4. Ding, W., Nowakowski, G. S., Knox, T. R., Boysen, J. C., Maas, M. L., Schwager, S. M., Wu, W., Wellik, L. E., Dietz, A. B., Ghosh, A. K., Secreto, C. R., Medina, K. L., Shanafelt, T. D., Zent, C. S., Call, T. G., and Kay, N. E. (2009) Bi-directional activation between mesenchymal stem cells and CLL B-cells: implication for CLL disease progression, *Br J Haematol* 147, 471–483. 10

5. Kurtova, A. V., Balakrishnan, K., Chen, R., Ding, W., Schnabl, S., Quiroga, M. P., Sivina, M., Wierda, W. G., Estrov, Z., Keating, M. J., Shehata, M., Jager, U., Gandhi, V., Kay, N. E., Plunkett, W., and Burger, J. A. (2009) Diverse marrow stromal cells protect CLL cells from spontaneous and drug-induced apoptosis: development of a reliable and reproducible system to assess stromal cell adhesion-mediated drug resistance, *Blood* 114, 4441–4450. 20

6. Gill, B. J., and West, J. L. (2014) Modeling the tumor extracellular matrix: Tissue engineering tools repurposed towards new frontiers in cancer biology, *J Biomech* 47, 1969–1978.

7. Mallikarjun Sundaram, P. M., Misti Jain, Saravanan Thiagarajan, Dency Pinto, Padhma Radhakrishnan. (2014) ECM Composition, Tumor Microenvironment Platform and Methods Thereof. (UDPTO, Ed.), Mitra Biotech, India. 30

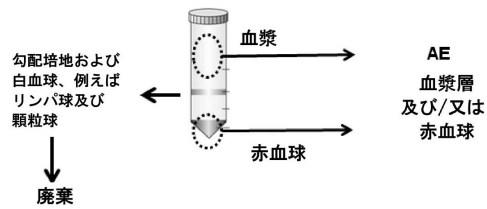
8. Mongini, P. K., Gupta, R., Boyle, E., Nieto, J., Lee, H., Stein, J., Bandovic, J., Stankovic, T., Barrientos, J., Kolitz, J. E., Allen, S. L., Rai, K., Chu, C. C., and Chiorazzi, N. (2015) TLR-9 and IL-15 Synergy Promotes the In Vitro Clonal Expansion of Chronic Lymphocytic Leukemia B Cells, *J Immunol* 195, 901–923. 40

9. Pascutti, M. F., Jak, M., Tromp, J. M., Derks, I. A., Remmerswaal, E. B., Thijssen, R., van Attekum, M. H., van Bochove, G. G., Luijckx, D. M., Pals, S. T., van Lier, R. A., Kater, A. P., van Oers, M. H., and Eldering, E. (2013) IL-21 and CD40L signals from autologous T cells can induce antigen-independent proliferation of CLL cells, *Blood* 122, 3010–3019. 50

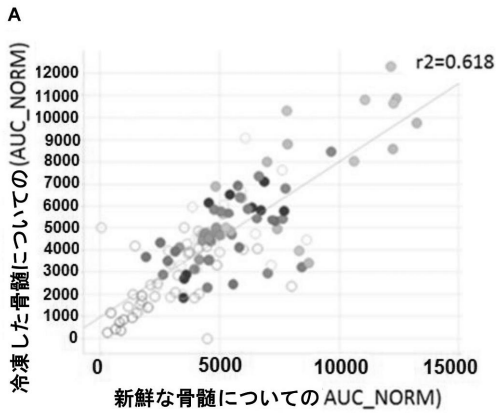
10. Nabhan, C. , and Rosen, S. T. (2014) Chronic lymphocytic leukemia: a clinical review, *JAMA* 312, 2265–2276.
11. Mittal, A. K. , Chaturvedi, N. K. , Rai, K. J. , Gilling-Cutucache, C. E. , Nordgren, T. M. , Moragues, M. , Lu, R. , Opavsky, R. , Bockiek, G. R. , Weisenburger, D. D. , Iqbal, J. , and Joshi, S. S. (2014) Chronic lymphocytic leukemia cells in a lymph node microenvironment depict molecular signature associated with an aggressive disease, *Mol Med* 20, 290–301. 10
12. Burger, J. A. , and Buggy, J. J. (2013) Bruton tyrosine kinase inhibitor ibrutinib (PCI-32765), *Leuk Lymphoma* 54, 2385–2391.
13. Chung, C. , and Lee, R. (2014) Ibrutinib, obinutuzumab, idelalisib, and beyond: review of novel and evolving therapies for chronic lymphocytic leukemia, *Pharmacotherapy* 34, 1298–1316. 20
14. Purroy, N. , Abrisqueta, P. , Carabia, J. , Carpio, C. , Palacio, C. , Bosch, F. , and Crespo, M. (2015) Co-culture of primary CLL cells with bone marrow mesenchymal cells, CD40 ligand and CpG ODN promotes proliferation of chemoresistant CLL cells phenotypically comparable to those proliferating in vivo, *Oncotarget* 6, 7632–7643.
15. Bennett, T. A. , Montesinos, P. , Moscardo, F. , Martinez-Cuadron, D. , Martinez, J. , Sierra, J. , Garcia, R. , de Oteyza, J. P. , Fernandez, P. , Serrano, J. , Fernandez, A. , Herrera, P. , Gonzalez, A. , Bethancourt, C. , Rodriguez-Macias, G. , Alonso, A. , Vera, J. A. , Navas, B. , Lavilla, E. , Lopez, J. A. , Jimenez, S. , Simiele, A. , Vidriales, B. , Gonzalez, B. J. , Burgaleta, C. , Hernandez Rivas, J. A. , Mascunano, R. C. , Bautista, G. , Perez Simon, J. A. , Fuente Ade, L. , Rayon, C. , Troconiz, I. F. , Janda, A. , Bosanquet, A. G. , Hernandez-Campo, P. , Primo, D. , Lopez, R. , Liebana, B. , Rojas, J. L. , Gorrochategui, J. , Sanz, M. A. , and Ballesteros, J. (2014) Pharmacological profiles of acute myeloid leukemia treatments in patient samples by automated flow cytometry: a bridge to individualized medicine, *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 14, 305–318. 30
16. Ghamlouch, H. , Ouled-Haddou, H. , Damaj, G. , Royer, B. , Gubler, B. , and Marolleau, 40 50

- J. P. (2013) A combination of cytokines rescues highly purified leukemic CLL B-cells from spontaneous apoptosis in vitro, *PLoS One* 8, e60370.
17. Brinton, L. T., Sloane, H. S., Kester, M., and Kelly, K. A. (2015) Formation and role of exosomes in cancer, *Cell Mol Life Sci* 72, 659–671.
18. Benien, P., and Swami, A. (2014) 3D tumor models: history, advances and future perspectives, *Future Oncol* 10, 1311–1327. 10
19. Fennema, E., Rivron, N., Rouwkema, J., van Blitterswijk, C., and de Boer, J. (2013) Spheroid culture as a tool for creating 3D complex tissues, *Trends Biotechnol* 31, 108–115.
20. Nam, K. H., Smith, A. S., Lone, S., Kwon, S., and Kim, D. H. (2015) Biomimetic 3D Tissue Models for Advanced High-Throughput Drug Screening, *J Lab Autom* 20, 201–215. 20
21. KucEROVA, L., and Skolekova, S. (2013) Tumor microenvironment and the role of mesenchymal stromal cells, *Neoplasma* 60, 1–10.
22. Ghia, P., Circosta, P., Scielzo, C., Vallario, A., Camporeale, A., Granziero, L., and Caligaris-Cappio, F. (2005) Differential effects of CLL cell survival exerted by different microenvironmental elements, *Curr Top Microbiol Immunol* 294, 135–45.
23. RoEcklein, B. A., and Torok-Storb, B. (1995) Functionally distinct human marrow stromal cell lines immortalized by transduction with the human papilloma virus E6/E7 genes, *Blood* 85, 997–1005. 30

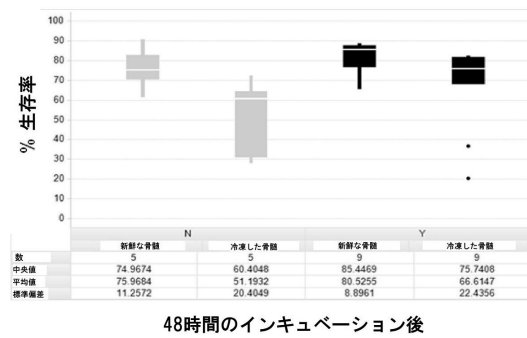
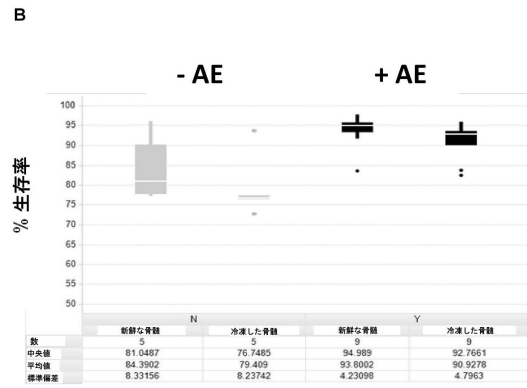
【図 1】



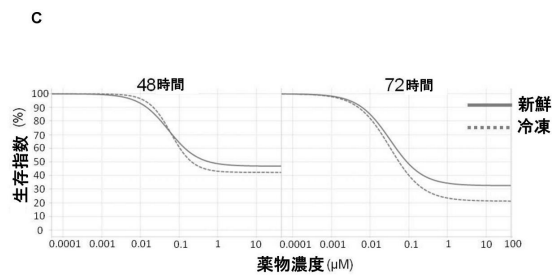
【図 2 A】



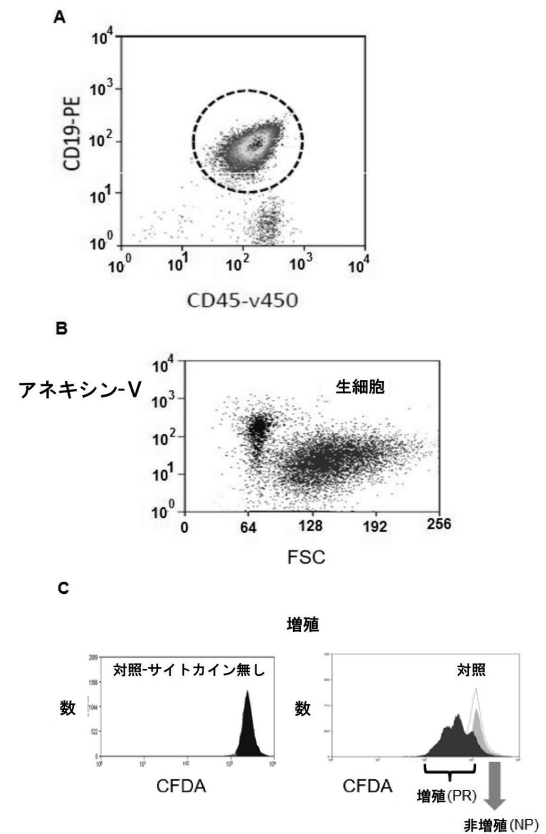
【図 2 B】



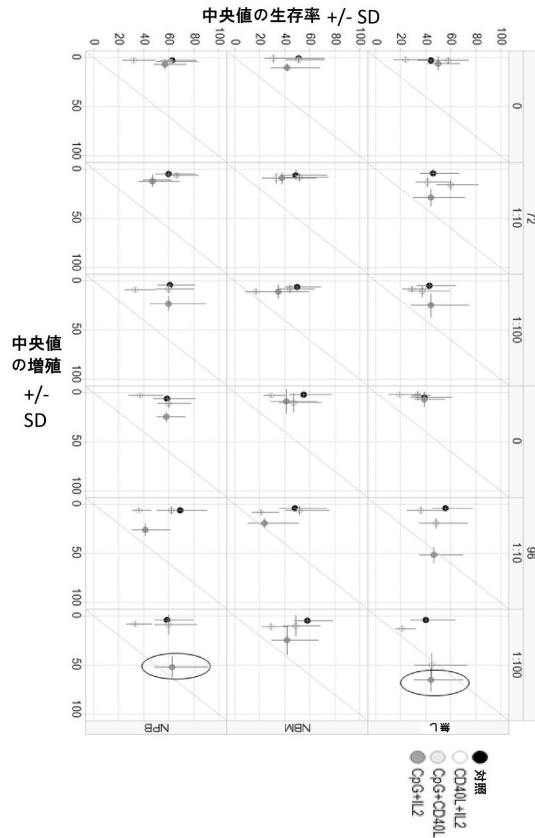
【図 2 C】



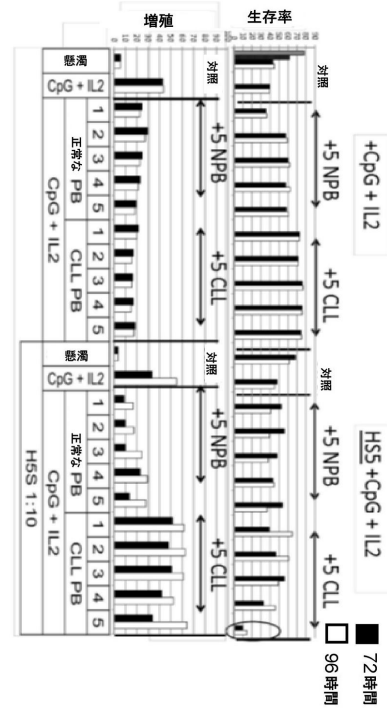
【図 3】



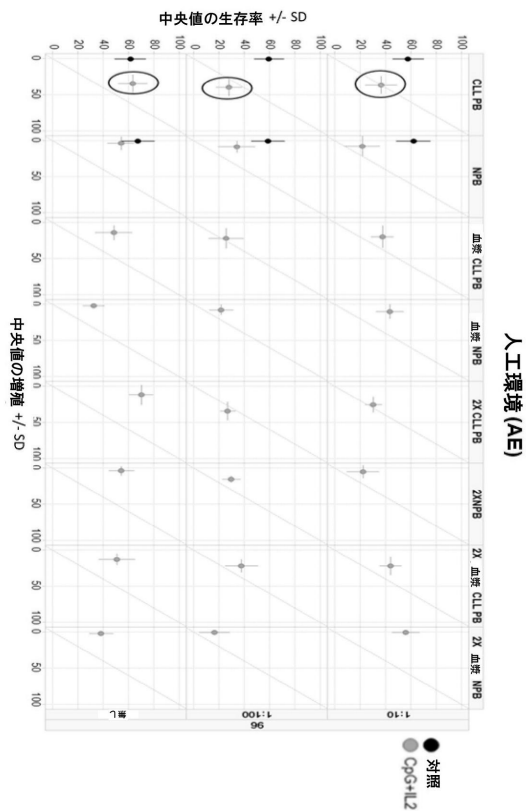
【図 4】



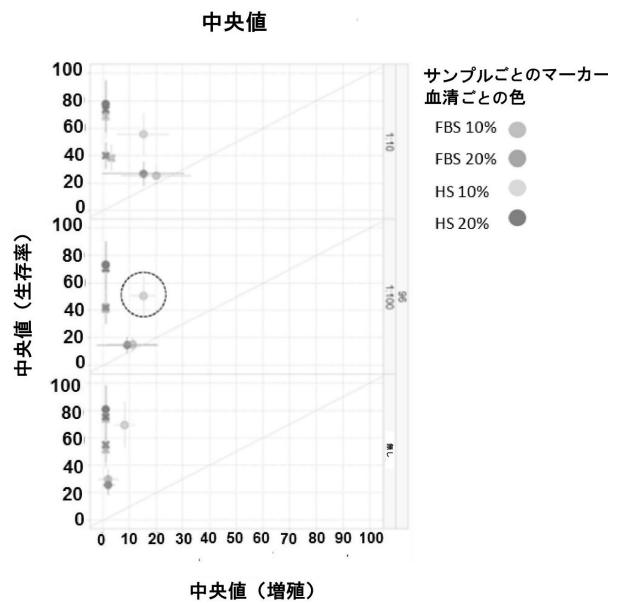
【図 5】



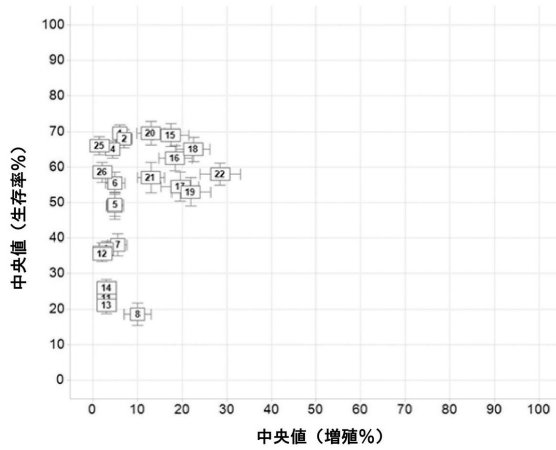
【図 6】



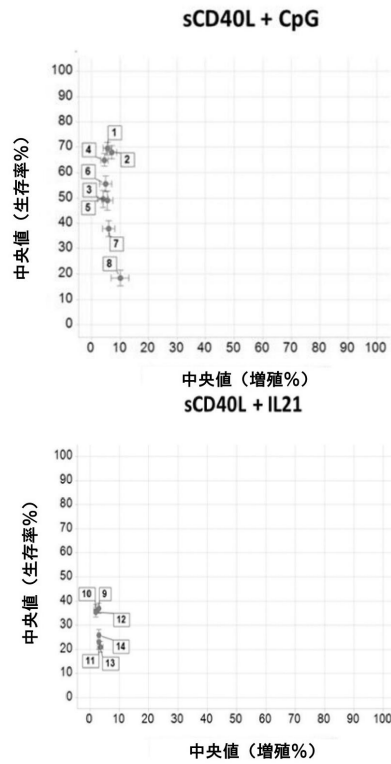
【図 7】



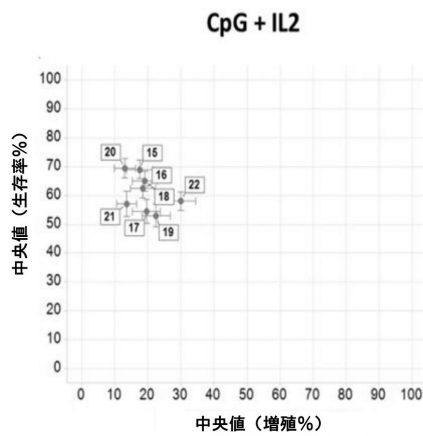
【図 8】



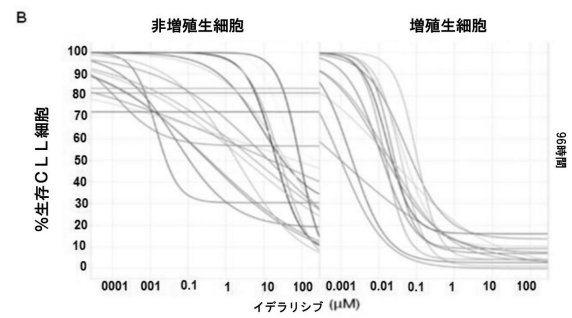
【図 9 - 1】



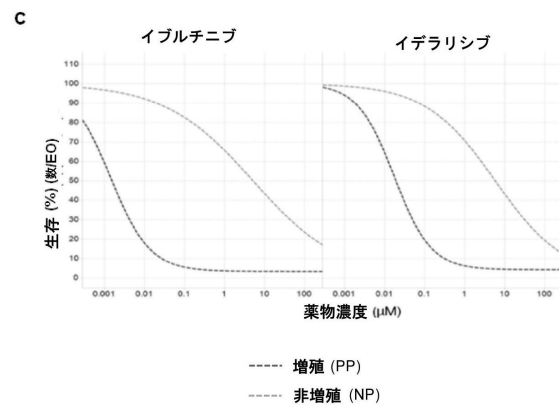
【図 9 - 2】



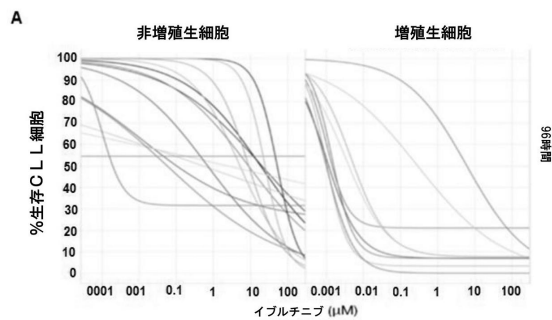
【図 10 B】



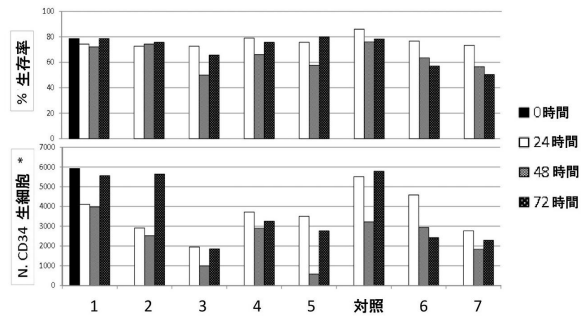
【図 10 C】



【図 10 A】



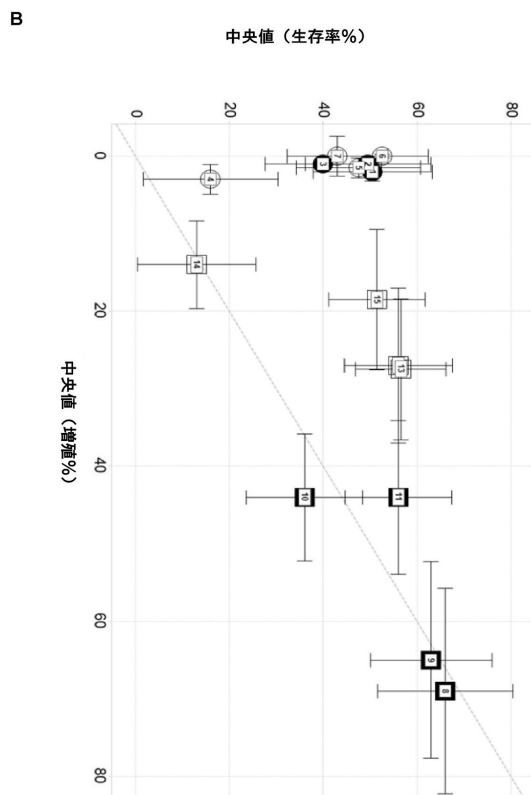
【図 1 1】



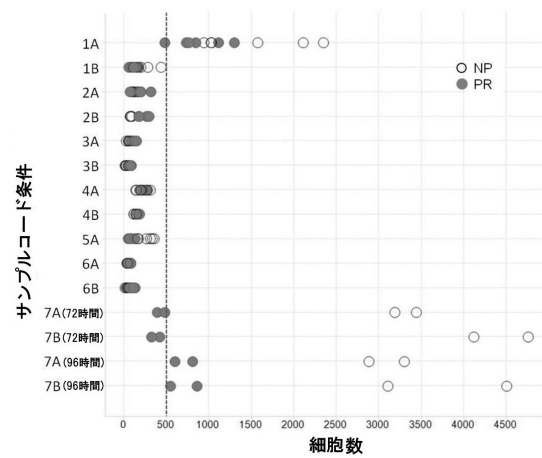
【図 1 2 A】



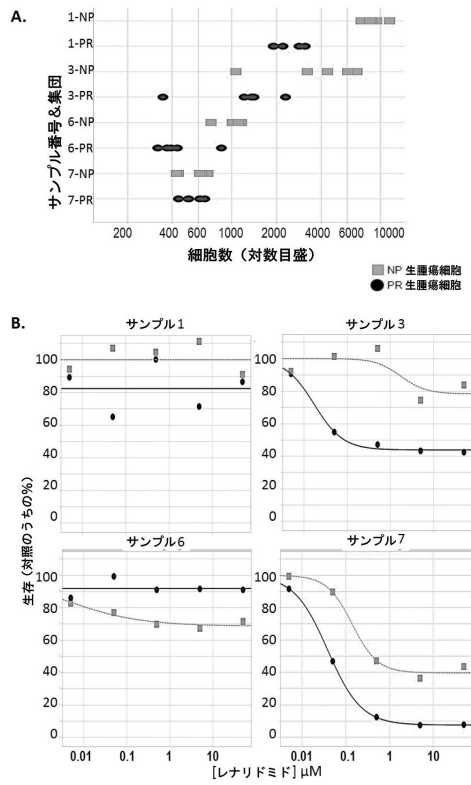
【図 1 2 B】



【図 1 3】



【図 14】



フロントページの続き

- (72)発明者 ベネット, テレサ
スペイン 28760 マドリード トレス・カントス カレ・サンティアゴ・グリソリア 2
- (72)発明者 プリモ ラモス, ダニエル
スペイン 28760 マドリード トレス・カントス カレ・サンティアゴ・グリソリア 2
- (72)発明者 プロスペロ ギア, パオロ
イタリア 20132 ミラノ ヴィア・オルジェッティナ 58
- (72)発明者 エスピノーサ オキラス, アナ ベレン
スペイン 28760 マドリード トレス・カントス カレ・サンティアゴ・グリソリア 2
- (72)発明者 ゴロチャテギ ギレン, ジュリアン
スペイン 28760 マドリード トレス・カントス カレ・サンティアゴ・グリソリア 2
- (72)発明者 ロブレス マテオス, アリシア
スペイン 28760 マドリード トレス・カントス カレ・サンティアゴ・グリソリア 2
- (72)発明者 ヘルナンデス カンポ, ピラール
スペイン 28760 マドリード トレス・カントス カレ・サンティアゴ・グリソリア 2

審査官 三好 貴大

- (56)参考文献 国際公開第2010/120329 (WO, A1)
特表2012-527627 (JP, A)
国際公開第2014/035668 (WO, A1)
特表2011-516039 (JP, A)
特表2012-503765 (JP, A)
BENNETT, T.A. et al., Pharmacological Profiles of Acute Myeloid Leukemia Treatments in Patient Samples by Automated Flow Cytometry: A Bridge to Individualized Medicine, Clinical Lymphoma, Myeloma & Leukemia, 2014年, 14(4), 305-318

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
G01N 33/48-33/98
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)