



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 697 37 684 T2** 2008.01.31

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 912 085 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **697 37 684.2**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US97/11595**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **97 933 267.3**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1998/002038**

(86) PCT-Anmeldetag: **10.07.1997**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **22.01.1998**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **06.05.1999**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **02.05.2007**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **31.01.2008**

(51) Int Cl.⁸: **A01N 1/02** (2006.01)

C12N 1/02 (2006.01)

C12N 5/00 (2006.01)

C12Q 1/02 (2006.01)

C12Q 1/18 (2006.01)

C12Q 1/24 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

679056 12.07.1996 US

(73) Patentinhaber:

Precision Therapeutics Inc., Pittsburgh, Pa., US

(74) Vertreter:

Arnold und Kollegen, 80331 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI,
LU, MC, NL, PT, SE**

(72) Erfinder:

KORNBLITH, Paul L., Pittsburgh, PA 15238, US

(54) Bezeichnung: **PRÄZISE WIRKSAMKEITSBESTIMMUNGSMETHODE FÜR WIRKSTOFFE EINSCHLIESSLICH
CHEMOTHERAPEUTIKA**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

Gebiet der Erfindung

[0001] Die Erfindung bezieht sich auf das Screenen und Testen von Wirkstoffen, einschließlich chemotherapeutischer Mittel, um die potentielle Wirksamkeit bei einzelnen Patienten, bei denen eine Behandlung mit derartigen Mitteln angezeigt ist, vorherzusagen.

Einleitung

[0002] Alle Wirkstoffe, einschließlich chemotherapeutischer Wirkstoffe, werden vor der Zulassung zur medizinischen Verwendung in den Vereinigten Staaten strengen Tests hinsichtlich Wirksamkeit und Sicherheit unterzogen. Verfahren zum Beurteilen der Wirksamkeit schlossen aufwändige Untersuchungen großer Populationen in Doppelblindstudien hinsichtlich einer gegebenen Behandlungsmethode und/oder einem Wirkstoff mit gleichzeitiger statistischer Auswertung der resultierenden Daten ein, aber diese Ergebnisse sind zwangsläufig verallgemeinert hinsichtlich den als Ganzes genommenen Patienten-Populationen. In vielen pharmazeutischen Wissenszweigen und besonders auf dem Gebiet der Chemotherapie können die Ergebnisse von individueller Patiententherapie jedoch nicht mit verallgemeinerten Daten übereinstimmen – zum Schaden des Patienten. Das Bedürfnis nach einem Verfahren, das aber nicht auf chemotherapeutische Mittel limitiert ist, zum Beurteilen des therapeutischen Potentials von Wirkstoffen bezüglich ihrer Wirksamkeit hinsichtlich einem gegebenen einzelnen Patienten vor der Behandlung dieses Patienten wurde seit Langem erkannt.

[0003] Es sind bereits Assays des Stands der Technik vorhanden, welche malignes Gewebe verschiedener Arten zum Zweck des Beurteilens der besten Auswahl bezüglich der therapeutischen Darreichung einer Vielzahl von Wirkstoffen aussetzt. Zum Beispiel wurde in Kruczynski, A., et. al., "Evidence of a direct relationship between the increase in the in vitro Aassage number of human non-small-cell-lung cancer primocultures and their chemosensitivity", Anticancer Research, Band 13, Nr. 2, Seiten 507-513 (1993) die Chemosensitivität des Krebses humaner, nicht-kleiner Lungenzellen in in-vivo-Transplantaten, in in-vitro-Primokulturen und in kommerziell erhältlichen langfristigen Krebszelllinien untersucht. Der Anstieg bezüglich der Chemosensitivität wurde dokumentiert und mit morphologischen Veränderungen in den fraglichen Zellen in Beziehung gesetzt. Manchmal werden maligne Zellen von Tiermodellen und/oder etablierte Zellkulturen mit potentiellen Therapiemitteln getestet, siehe zum Beispiel Arnold, J.T., "Evaluation of chemopreventive agents in different mechanistic classes using a rat tracheal epithelial cell culture transformation assay", Cancer Res., Band 55, Nr. 3, Seiten 537-543 (1995).

[0004] Wenn wirkliche Patientenzellen verwendet werden, um auf einzelne Patienten ausgerichtete in-vitro-Assays zu bilden, werden die Zellen in typischen Prozessen des Stands der Technik, zum Beispiel Kornblith et. al., J. Neurosurg. 48: 580-586, 1978, geerntet (biopsiert) und trypsiniert (Bindegewebe wird mit dem Enzym Trypsin aufgeschlossen), um eine für die Umwandlung in die gewünschte Zellkultur geeignete Zellsuspension zu ergeben. Die in-vitro-Gewebekultur-Zellensammlungen, welche aus diesen Techniken resultieren, werden gewöhnlich durch ihr Unvermögen beeinträchtigt, die Chemosensitivität des Originaltumors oder anderer Zellbiopsien exakt nachzuahmen. Standard-Klonen und Gewebekulturtechniken sind außerdem für die Verwendung in einem Patient-zu-Patient-Assay-Szenario maßlos kompliziert und teuer. Daher bleibt ein Bedarf für eine Zellkultur-Präparationstechnik, welche Zellkulturen für Arzneimittel-Screening-Zwecke bereitstellt, in welcher die Zellkulturen nach leichter Präparation in einer zu ihrer in-vivo-Reaktivität äquivalenten Weise reagieren, um das Screenen von Arznei- oder chemotherapeutischen Mitteln hinsichtlich einem bestimmten Patienten zu ermöglichen, für welchen ein derartiges Screenen angezeigt ist.

Zusammenfassung der Erfindung

[0005] Um dieses Bedürfnis zu erfüllen, stellt die vorliegende Erfindung ein verbessertes System für das Screenen einer Vielzahl von Kandidaten therapeutischer oder chemotherapeutischer Mittel bezüglich der Wirksamkeit hinsichtlich einem bestimmten Patienten dar, in welchem zum Zweck des objektiven Identifizierens der besten Behandlung für die vom Patienten erhaltenen kultivierten Zellen eine Gewebeprobe von dem Patienten geerntet, kultiviert und separat einer Vielzahl von Behandlungen und/oder therapeutischen Mitteln ausgesetzt wird. Besondere Verfahrensinnovationen wie Gewebeprobepräparations-Techniken machen dieses Verfahren praktisch und auch theoretisch nützlich. Eine besonders wichtige Gewebeprobepräparations-Technik ist die anfängliche Präparation von kohäsiven Mehrzellen-Partikeln von Gewebeproben, eher als enzymatisch getrennte Zellsuspensionen oder -präparationen, für die anfängliche Gewebekultur-Monoschicht-Präparation. Im Hinblick auf das Züchten maligner Zellen wird zum Beispiel angenommen (ohne irgendeine Absicht, an die

Theorie gebunden zu werden), dass durch Beibehalten der malignen Zellen innerhalb eines Mehrzellen-Partikels des ursprünglichen Gewebes das Wachstum der malignen Zellen als solchen erleichtert ist gegenüber dem Überwachstum von Fibroblasten oder anderen Zellen, was leicht auftritt, wenn suspendierte Tumorzellen in Kultur gezüchtet werden. Daher können praktische Monoschichten aus Zellen gebildet werden, um aussagekräftiges Screenen einer Vielzahl von Behandlungen und/oder Mitteln zu ermöglichen. Das Wachstum der Zellen wird überwacht, um die Zeit zum Beginnen des Assays zu ermitteln und um die Wachstumsgeschwindigkeit der gezüchteten Zellen zu bestimmen; Reihenfolge und Zeiteinteilung der Arzneimittelzugabe werden ebenfalls überwacht und optimiert. Durch das Unterwerfen einheitlicher Zellproben gegenüber einer großen Vielfalt an Wirkstoffen (und Konzentrationen davon) kann das wirksamste Mittel bestimmt werden. Für die Krebsbehandlung betreffende Assays wird eine zweistufige Bewertung in Betracht gezogen, in welcher sowohl akut zytotoxische als auch langfristige Hemmeffekte eines gegebenen Anti-Krebsmittels untersucht werden.

Detaillierte Beschreibung der Erfindung

[0006] Die vorliegende Erfindung stellt ein System zum Screenen einer Vielzahl an Kandidaten therapeutischer oder chemotherapeutischer Mittel bezüglich der Wirksamkeit hinsichtlich eines bestimmten Patienten dar, bei dem zum Zweck des objektiven Identifizierens der besten Behandlung oder Mittels eine Gewebeprobe von dem Patienten geerntet wird und separat einer Vielzahl von Behandlungen und/oder therapeutischen Mitteln ausgesetzt wird. Besondere Verfahrensinnovationen wie Gewebeprobepräparations-Techniken machen diese Methode praktisch und auch theoretisch nützlich. Eine besonders wichtige Gewebeprobepräparations-Technik ist die anfängliche Präparation von kohäsiven Mehrzellen-Partikeln (Explantate) der Gewebeprobe, eher als enzymatisch getrennte Zellsuspensionen oder -präparationen, für die anfängliche Gewebekultur-Monoschicht-Präparation. Zellwachstum, Reihenfolge und Zeiteinteilung der Arzneimittelzugabe werden überwacht und optimiert.

[0007] Eine besondere Anwendung der vorliegenden Erfindung ist das Screenen chemotherapeutischer Mittel und anderer antineoplastischer Therapien in Abhängigkeit von Gewebekulturpräparationen maligner Zellen von Patienten, von welchen maligne Proben biopsiert wurden. Verwandte Anti-Krebs-Therapien, welche unter Verwendung des erfinderischen Systems gescreent werden können, sind sowohl die Strahlentherapie als auch Mittel, welche die Zytotoxizität der Bestrahlung verstärken, als auch immunotherapeutische Anti-Krebsmittel. Screening-Prozesse für Behandlungen oder therapeutische Mittel für nichtmaligne Syndrome sind jedoch auch in diese Erfindung einbezogen und schließen ohne Einschränkung Mittel, welche Überwucherungs-Syndrome wie Schuppenflechte bekämpfen, oder wundheilende Mittel, ein. Auch ist der vorliegende Wirksamkeits-Assay nicht nur auf das Screenen von Wirkstoffen begrenzt, welche (das Heilen) beschleunigen oder das Zellwachstum verlangsamen (gegen Krebs, gegen Überwucherung), weil auch zur Verbesserung oder zum Unterdrücken intrazellulärer biochemischer Funktionen gedachte Mittel in dem vorliegenden Gewebekultursystem getestet werden können. Zum Beispiel kann die Bildung oder Blockierung von Enzymen, Neurotransmittern und anderen Biochemikalien mit den vorliegenden Assayverfahren vor der Behandlung eines Patienten gescreent werden.

[0008] Wenn der Patient auf das Vorliegen eines Tumors zu behandeln ist, wird in der bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung eine Tumor-Biopsie von >100 mg nicht-nekrotischem, nicht-kontaminiertem Gewebe vom Patienten durch irgendeine geeignete Biopsie oder in der bekannten chirurgischen Prozedur des Stands der Technik geerntet. Die Biopsie-Probenpräparation verläuft generell wie folgt unter einem Abzug mit Laminarströmung, welcher für mindestens 20 Minuten vor Verwendung eingeschaltet werden sollte. Ethanol von der Qualitätsstufe "Reagens" wird verwendet, um die Oberfläche des Abzugs vor Beginn der Probenpräparation abzuwischen. Der Tumor wird dann unter sterilen Bedingungen aus dem Transportbehälter entfernt und mit einer sterilen Schere zerkleinert. Wenn die Probe schon zerkleinert eintrifft, sollten die einzelnen Tumorstücke in vier Gruppen geteilt werden. Jedes der ungeteilten Gewebeviertel wird dann unter Verwendung einer sterilen Zange in 3 ml steriles Wachstumsmedium (Standard F-10 Medium, das 17% Kalbsserum und eine Standardmenge an Penicillin und Streptomycin enthält) gelegt, und unter Verwendung zweier steriler Skalpelle mit einer scherenähnlichen Bewegung oder mechanisch gleichwertig mit manuellen oder automatisierten gegenläufigen Schneideklängen zerkleinert. Dieses Querschneiden ist wichtig, weil diese Technik auf den Tumor-Mehrzellen-Partikeln glatt geschnittene Ränder erzeugt. Bevorzugt, aber nicht notwendigerweise, messen die Tumorpartikel jeweils 1 mm³. Nachdem jedes Tumor-Viertel zerschnitten wurde, werden die Partikel in Kultur-Kolben unter Verwendung einer sterilen Pasteur-Pipette (9 Explantate pro T-25 oder 30 Partikel pro T-75 Kolben) in Kultur-Kolben plattiert. Jeder Kolben wird dann mit dem Code des Patienten, dem Datum der Explantation und irgenwelchen anderen charakteristischen Daten gekennzeichnet. Die Explantate sollten gleichmäßig über die Bodenoberfläche des Kolbens verteilt werden, mit anfänglich 5-10 min invertierter Inkubation in einem 37°-Brutschrank, gefolgt von der Zugabe von etwa 5-10 ml sterilem Wachstumsmedium und

weiterer Inkubation in normaler, nicht-invertierter Stellung. Die Kolben werden in einen CO₂-freien 35°C-Brutschrank gelegt. Die Kolben sollten täglich auf Wachstum und Kontamination überprüft werden. Für eine Dauer von wenigen Wochen, bei wöchentlichem Entfernen und Ersetzen von 5 ml Wachstumslösung, werden die Explantate das Wachstum der Zellen in einer Monoschicht unterstützen. Im Hinblick auf die Kultivierung maligner Zellen wird angenommen, (ohne irgendeine Absicht, an die Theorie gebunden zu werden), dass durch Beibehalten der malignen Zellen innerhalb eines Mehrzellen-Partikels des ursprünglichen Gewebes das Wachstum der malignen Zellen als solcher erleichtert ist, im Gegensatz zu einem Überwachstum von Fibroblasten (oder anderer unerwünschter Zellen), was leicht auftritt, wenn suspendierte Tumorzellen in Kultur gezüchtet werden.

[0009] Die Verwendung der obigen Prozedur zum Bilden von Zell-Monoschicht-Kulturen maximiert das Wachstum maligner Zellen aus der Gewebeprobe und optimiert daher die Gewährleistung von Gewebeprobekultur-Assays für chemotherapeutisches Einwirken verschiedener zu testender Mittel. Erhöhtes Wachstum von wirklichen malignen Zellen ist jedoch nur ein Gesichtspunkt der vorliegenden Erfindung; ein anderes wichtiges Merkmal ist das Wachstumsgeschwindigkeits-Überwachungssystem, das zum Überwachen des Wachstums der einmal gebildeten Monoschicht verwendet wird. Wurde einmal eine Primärkultur und ihre davon abgeleitete sekundäre Gewebekultur-Monoschicht eingeleitet, wird das Wachstum der Zellen überwacht, um die Zeit zum Beginnen des Chemotherapie-Assays zu bestimmen und um die Wachstumsgeschwindigkeit der gezüchteten Zellen zu bestimmen.

[0010] Das Überwachen des Wachstums der Zellen wird durch Zählen der Zellen in der Monoschicht auf periodischer Basis ausgeführt, ohne Töten oder Anfärben der Zellen und ohne Entfernen irgendwelcher Zellen aus dem Kultur-Kolben. Das Zählen kann visuell oder durch automatisierte Verfahren ausgeführt werden, entweder mit oder ohne das Verwenden von im Fachgebiet bekannten Berechnungsmethoden (zum Beispiel Zählen in einer repräsentativen Fläche eines Rasters, die mit der Anzahl von Rasterflächen multipliziert wird). Die Daten des periodischen Zählens werden dann verwendet, um die Wachstumsraten zu bestimmen, welche parallel zu den Wachstumsraten der gleichen Zellen in-vivo im Patienten angesehen werden können oder nicht. Wenn die Wachstumsgeschwindigkeitszyklen dokumentiert werden können, dann kann zum Beispiel das Dosieren bestimmter Wirkstoffe auf den Patienten angepasst werden. Die gleiche Wachstumsgeschwindigkeit kann verwendet werden, um auch die Bestrahlungs-Behandlungs-Periodizität zu bestimmen. Es sollte angemerkt werden, dass durch die Wachstumsrate-Bestimmungen, die während des Wachstums der Monoschichten in ihren Kolben durchgeführt werden, das vorliegende Verfahren keine Blutzytometrie, Durchflusszytometrie oder Verwendung von Objektträgern und Färben, mit all ihren einhergehenden Arbeit und Kosten, benötigt.

[0011] Protokolle für die Monoschicht-Wachstumsgeschwindigkeit verwenden generell ein inverses Phasenkontrast-Mikroskop, um die in einem 37°C-Brutschrank (5% CO₂) inkubierten Kulturzellen zu untersuchen. Wenn der Kolben unter dem inversen Phasenkontrast-Mikroskop gelegt wird, werden zehn Felder (Flächen auf einem zum Kolben inhärenten Raster) unter Verwendung des 10 ×-Objektivs untersucht, mit der Maßgabe, dass die zehn Felder nicht benachbart sind oder signifikant voneinander entfernt sind, so dass die zehn Felder eine repräsentative Stichprobe des gesamten Kolbens sind. Die für jedes Feld untersuchte prozentuale Zellbelegung wird notiert, und die Mittelung dieser Prozente stellt dann einen Schätzwert der gesamten prozentualen Konfluenz in der Zellkultur bereit. Wenn die Patientenproben zwischen zwei oder mehr Kolben aufgeteilt wurden, sollte eine durchschnittliche Zell-Zahl für die gesamte Patientenprobe berechnet werden. Die berechnete durchschnittliche prozentuale Konfluenz sollte in ein Prozess-Protokoll eingetragen werden, um eine Sammlung von Daten – und das Plotten von Wachstumskurven – über die Zeit zu ermöglichen. Die Monoschichtkulturen können photographiert werden, um die Zellmorphologie und das Kultur-Wachstumsmuster zu dokumentieren. Die geeignete Formel ist:

$$\text{Prozent Konfluenz} = \frac{\text{Schätzwert der durch die Zellen belegten Fläche}}{\text{Gesamtfläche in einem beobachteten Feld}}$$

[0012] Als ein Beispiel dafür: wenn der Schätzwert der durch die Zellen belegten Fläche 30% beträgt und die Gesamtfläche des Felds 100% ist, ist die prozentuale Konfluenz 30/100 bzw. 30.

[0013] Die Anpassung des obigen Protokolls auf nicht-Tumorzellen ist einfach und stellt generell ein äquivalentes Verfahren dar.

[0014] Das Wirkstoff-Screening unter Verwendung der kultivierten Zellen findet nicht in den ursprünglichen Inkubationskolben statt, sondern findet generell unter Verwendung von Platten wie Mikrotiterplatten statt. Die Leistungsfähigkeit des für Screening-Zwecke verwendeten Chemosensitivitäts-Assays hängt von der Fähigkeit ab, eine reproduzierbare Zellenanzahl auf jede Reihe in einer Platte und/oder einer Serie von Platten zu fördern, sowie die Fähigkeit, eine gleichmäßige Verteilung von Zellen überall in eine gegebene Vertiefung zu

befördern. Die folgende Prozedur gewährleistet, dass die Zellen reproduzierbar vom Kolben zu den Mikrotiterplatten transferiert werden, und dass die Zellen gleichmäßig über die Oberfläche jeder Vertiefung verteilt werden.

[0015] Der erste Schritt beim Präparieren der Mikrotiterplatten ist natürlich das Vorbereiten und Überwachen der wie oben beschriebenen Monoschicht. Das folgende Protokoll ist beispielhaft und empfänglich für Variationen, wie sie für einen Fachmann offenkundig sein werden. Die Zellen werden von dem Kultur-Kolben entfernt und durch Zentrifugieren wird ein Zell-Pellet präpariert. Das aus der Monoschicht erzielte Zell-Pellet wird dann in 5 ml Wachstumsmedium suspendiert und 6 bis 10 Minuten in einem konischen Schlauch mit einer Vortex gemischt. Der Schlauch wird dann 10 mal vor und zurück geschüttelt. Ein 36 µl Tröpfchen von der Mitte des konischen Schlauchs wird auf eine Vertiefung einer Platte mit 96 Vertiefungen pipettiert. Dann wird eine frische Pipette verwendet, um ein 36 µl Aliquot Trypan-Blau-Lösung zu pipettieren, welche zu derselben Vertiefung zugegeben wird, und die zwei Tröpfchen werden mit wiederholter Pipettenansaugung gemischt. Die ursprüngliche Mischung wird dann zur Untersuchung unter Verwendung eines Standard-Lichtmikroskops zwischen zwei Blutzytometer-Kammern aufgeteilt. Die Zellen werden in zwei von vier Blutzytometer-Quadranten bei 10 ×-Vergrößerung gezählt. Nur die Zellen, welche den Trypan-Blau-Farbstoff nicht aufgenommen haben, werden gezählt. Dieser Prozess wird für die zweite Zählkammer wiederholt. So wird eine durchschnittliche Zell-Zahl pro Kammer bestimmt. Unter Verwendung von Mitteln, die im Fachgebiet bekannt sind, werden die Quadranten-Zahlenwerte geprüft, aufgezeichnet, mit 10^4 multipliziert, um die Zellen/ml zu ergeben, und die Gesamtmenge an Fluid (Wachstumsmedium), die notwendig ist, um die verbleibenden Zell-Aliquote zu suspendieren, wird entsprechend berechnet.

[0016] Nachdem die gewünschte Konzentration an Zellen im Medium ermittelt worden ist, werden zusätzliche Zell-Aliquote von der Monoschicht mittels einer Vortex im Wachstumsmedium suspendiert und geschüttelt und in einen im Fachgebiet bekannten Terasaki-Spender zugeführt. Aliquote der präparierten Zellsuspension werden unter Verwendung der im Fachgebiet bekannten Terasaki-Spender-Techniken in die Mikrotiterplatten ausgeführt. Bei Bedarf kann eine Vielzahl von Platten aus einer einzigen Zellsuspension präpariert werden. Die Platten werden dann in sterile, feuchte Baumwoll-Gaze gewickelt und durch im Fachgebiet bekannte Mittel in einem Brutschrank-Kasten inkubiert.

[0017] Nachdem die Mikrotiterplatten präpariert worden sind, wird eine Exposition der Zellen darin mit Wirkstoff gemäß dem folgenden beispielhaften Protokoll durchgeführt. Während dieses Abschnitts des erfinderischen Assays wird die passende Menge spezifischen Wirkstoffs in die wie oben beschriebenen Mikrotiterplatten transferiert. Ein allgemeines Protokoll, welches angepasst werden kann, folgt. Jede Mikrotiterplatte wird aus ihrem feuchten Baumwoll-Gaze-Schwamm ausgewickelt und bezüglich Zelladhäsion mikroskopisch untersucht. Eine Kontrolllösung wird in abgegrenzte Vertiefungsreihen innerhalb des Rasters der Mikrotiterplatte verteilt, und es werden passende Aliquote eines zu testenden Wirkstoffs zu den übrigen Vertiefungen in den übrigen Reihen zugegeben. Gewöhnlich werden laufend steigende Konzentrationen des getesteten Wirkstoffs in schrittweise höher nummerierte Reihen in der Platte verabreicht. Die Platten werden dann wieder in ihre Gaze eingewickelt und in einem 37°C-Brutschrank-Kasten unter 5% CO₂ inkubiert. Nach einer vorbestimmten Expositionszeit werden die Platten ausgewickelt, mit steriler Gaze abgetupft, um das Mittel zu entfernen, mit Hank's balanced salt solution gewaschen, mit Wachstumsmedium geflutet und für eine vorbestimmte Zeitdauer, nach welcher die Platten zur Auswertung fixiert und gefärbt werden können, in den Brutschrank-Kasten zurückgestellt.

[0018] Fixieren und Färben können gemäß einer Anzahl geeigneter Prozeduren durchgeführt werden; die folgende ist stellvertretend. Nach Entfernen der Platten aus dem Brutschrank-Kasten wird das Kulturmedium ausgegossen und die Platten werden mit Hank's balanced salt solution geflutet. Nach wiederholtem Fluten (jedes Mal mit Agitieren) werden die Platten dann 2-5 Minuten mit Ethanol von der Qualitätsstufe "Reagens" geflutet. Dann wird das Ethanol abgegossen. Das Färben wird mit ungefähr 5 ml Giemsa-Färbemittel pro Platte erreicht, obwohl das Volumen nicht entscheidend ist und das Fluten das Ziel ist. Das Giemsa-Färbemittel sollte 5 min $\pm$ 30 Sekunden stehenbleiben, da das Zeitintervall die Färbeintensität beeinflusst. Das Giemsa-Färbemittel wird dann abgegossen und die Platten werden 3 mal in kaltes Leitungswasser in einem Becher getaucht. Dann werden die Platten umgedreht, energisch geschüttelt und über Nacht (mit offenem Platten-Deckel) auf einem Gestell auf einer Laborbank luftgetrocknet. Dann werden die Zellen pro Vertiefung manuell oder durch automatisierte und/oder computerisierte Mittel gezählt, um Daten bezüglich der Chemosensitivität der Zellen bei verschiedenen Expositions-Konzentrationen abzuleiten. Eine besonders nützliche Computer-Betriebsausstattung zum Zellen-Zählen ist der kommerziell erhältliche OPTIMATE-Compiler, welcher konzipiert ist, eine für die computerisierten Zell-Zählungsprozeduren gut geeignete optische Zählfunktion und anschließende Berechnungen zu erlauben.

[0019] Die obigen Prozeduren ändern sich nicht nennenswert, wenn Zellwachstums-Promotoren untersucht werden, eher als bei Zell-Blockierungsmitteln wie chemotherapeutischen Mitteln. Der vorliegende Assay erlaubt das Überwachen von Zelltod oder Zellwachstum mit gleicher Leichtigkeit. Jedenfalls wird die Optimierung der Verwendung des vorliegenden Systems das vergleichende Testen einer Vielfalt an Wirkstoff-Kandidaten zur Auswahl des besten Kandidaten zur auf den in-vitro-Testergebnissen basierenden Patientenbehandlung mit sich bringen. Eine besonders vorteilhafte Ausführungsform der oben beschriebenen Erfindung umfasst einen zweistufigen Assay für Zytotoxizität mit nachfolgender Auswertung der längerfristigen Inhibitor-Wirkung. Daher können die therapeutischen Mittel separat bezüglich beider ihrer direkten chemotherapeutischen Wirkung sowie bezüglich ihrer längeren Wirksamkeitsdauer ausgewertet werden.

[0020] Die Bestimmung von einem oder mehreren Wirkstoffen oder chemotherapeutischen Mitteln ist bei der vorliegenden Erfindung peripher, welche für das Wirksamkeits-Screening von irgendeinem oder von allen von diesen gegenüber einem gegebenen Patienten beabsichtigt ist. Buchstäblich jeder Wirkstoff kann gemäß der vorliegenden Erfindung gescreent werden; das Auflisten beispielhafter Wirkstoffe wird daher hier unterlassen.

[0021] Die Hauptsache der Erfindung schließt daher das wichtige Merkmal der Einfachheit des vorliegenden Systems ein – zu testende kohäsive Mehrzellen-Partikel vom Patientengewebe werden verwendet, um Zell-Monoschichten zu bilden; das Wachstum dieser Monoschichten wird zur genauen Prognose des korrelierenden Wachstums derselben Zellen in-vivo überwacht; und unterschiedliche Konzentrationen einer Anzahl an Wirkstoffen können zu diesem Zweck zum Bestimmen von nicht nur des am besten geeigneten Mittels sondern auch für die besten geeigneten Konzentration dieses Mittels für wirkliche Patienten-Exposition (gemäß der berechneten Zellwachstums-Geschwindigkeiten) getestet werden. Im diesem Kontext der Erfindung ist es auch wichtig anzumerken, dass das vorliegende System es erlaubt, in-vitro-Tests in Suspensionen aus Gewebekultur-Monoschichten, die in Nährstoff-Medium unter schnellen Bedingungen (eine Sache von Wochen) gezüchtet werden, durchzuführen, eher als mit Einzelzell-Vermehrung durch Verdünnungs-Clonen über eine lange Zeitspanne. In manchen Fällen ist die vorliegende Erfindung ein zweistufiger Assay für sowohl Zytotoxizität als auch die längerfristige Wachstums-Inhibierung.

Patentansprüche

1. Verfahren zum Beurteilen der Chemosensitivität von Patientenzellen gegenüber einem Wirkstoff, derart, dass die Zellen auf eine im Wesentlichen zu ihrer in-vivo-Reaktivität äquivalenten Weise reagieren, umfassend die Schritte:

- a) Separieren einer Patienten-Gewebeprobe in kohäsive Mehrzellen-Partikel;
- b) Wachsen lassen einer Gewebekultur-Monoschicht aus den kohäsiven Mehrzellen-Partikeln;
- c) Behandeln einer Mehrzahl von getrennten Stellen, die Zellen von der Gewebekultur-Monoschicht umfassen, mit mindestens einem Wirkstoff; und
- d) Beurteilen der Chemosensitivität der Zellen in der Mehrzahl der Stellen gegenüber dem mindestens einen Wirkstoff.

2. Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei die Gewebeprobe von einer Biopsie und/oder Operation ist.

3. Verfahren gemäß irgendeinem der Ansprüche 1-2, wobei die Gewebeprobe malignes Gewebe ist.

4. Verfahren gemäß irgendeinem der Ansprüche 1-3, wobei die Gewebeprobe durch mechanisches Mittel in kohäsive Mehrzellen-Partikel getrennt wird.

5. Verfahren gemäß irgendeinem der Ansprüche 1-4, wobei die Mehrzellen-Partikel glatt geschnittene Ränder aufweisen.

6. Verfahren gemäß irgendeinem der Ansprüche 1-5, wobei die Mehrzellen-Partikel etwa 1 mm³ betragen.

7. Verfahren gemäß irgendeinem der Ansprüche 1-6, wobei die Mehrzahl der getrennten Stellen ferner eine Platte aufweist, die eine Mehrzahl von Vertiefungen darin beinhaltet.

8. Verfahren gemäß irgendeinem der Ansprüche 1-7, wobei die Zellen in Schritt (c) unter Verwendung von einer Mehrfachvertiefungs-Pipettiervorrichtung in die getrennten Stellen inokkuliert werden.

9. Verfahren gemäß irgendeinem der Ansprüche 1-8, wobei Schritt (c) die Behandlung der Mehrzahl von Stellen mit einer Mehrzahl von Wirkstoffen bei variierenden Konzentrationen umfaßt, derart, dass das Beurtei-

len von Schritt (d) eine optimale Chemosensitivität der Zellen gegenüber einem einzelnen Wirkstoff bei einer einzigen Konzentration ermittelt.

10. Verfahren gemäß irgendeinem der Ansprüche 1-9, wobei Schritt (c) das Behandeln der Mehrzahl von Stellen mit einer Mehrzahl von Wirkstoffen über eine Zeitdauer umfaßt, die geeignet ist, die Bestimmung von sowohl dem anfänglichen zytotoxischen Effekt als auch dem längerfristigen Inhibitoreffekt von zumindest einem der Mehrzahl von Wirkstoffen zu erlauben.

11. Verfahren gemäß irgendeinem der Ansprüche 1-10, wobei die gemäß Schritt (d) gemessene Chemosensitivität der Zellen die Sensitivität gegenüber einem Antikrebsmittel ist.

12. Verfahren gemäß irgendeinem der Ansprüche 1-11, wobei die Zellen in Schritt (c) vor dem Inokkulieren im Medium suspendiert werden.

13. Verfahren gemäß irgendeinem der Ansprüche 1-12, wobei der Wirkstoff ein chemotherapeutisches Mittel ist.

14. Verfahren gemäß irgendeinem der Ansprüche 1-12, wobei der Wirkstoff ein Wundheilmittel ist.

15. Verfahren gemäß irgendeinem der Ansprüche 1-14, wobei der Wirkstoff aus der Gruppe gewählt wird, die aus einem Strahlentherapiemittel, einem Strahlentherapie-Sensibilisator und einem Strahlen-Verbesserungsmittel besteht.

16. Verfahren gemäß irgendeinem der Ansprüche 1-12, wobei der Wirkstoff ein immunotherapeutisches Mittel ist.

17. Verfahren gemäß irgendeinem der Ansprüche 1-12, wobei der Wirkstoff ein Therapeutikum für ein nicht-malignes Syndrom ist.

18. Verfahren gemäß irgendeinem der Ansprüche 1-17, wobei das Beurteilen der Chemosensitivität eine Bildung oder Blockierung von Enzymen ist.

19. Verfahren gemäß irgendeinem der Ansprüche 1-17, wobei das Beurteilen der Chemosensitivität eine Bildung oder Blockierung von Neurotransmittern ist.

20. Verfahren gemäß irgendeinem der Ansprüche 1-19, wobei die Zellen vor dem Beurteilen der Chemosensitivität fixiert und eingefärbt werden.

21. Verfahren gemäß irgendeinem der Ansprüche 1-20, wobei das Beurteilen der Chemosensitivität eine manuelle oder automatisierte Zählung von Zellen ist.

22. Verfahren gemäß irgendeinem der Ansprüche 1-21, wobei die Zellen unter Verwendung einer optischen Zählfunktion gezählt werden.

23. Verfahren gemäß irgendeinem der Ansprüche 1-22, wobei die Zellen unter Verwendung eines Computers gezählt werden.

24. Verfahren gemäß irgendeinem der Ansprüche 1-23, wobei das Beurteilen der Chemosensitivität durch Messung von Zellwachstum oder Zelltod bestimmt wird.

25. Verfahren gemäß irgendeinem der Ansprüche 1-24, wobei die Monoschicht im Vergleich zu einer Monoschicht, die aus in Kulturen wachsen gelassenen, suspendierten Tumorzellen produziert ist, eine reduzierte Anzahl an Fibroblasten enthält.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen