

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】令和1年10月10日(2019.10.10)

【公表番号】特表2018-531021(P2018-531021A)

【公表日】平成30年10月25日(2018.10.25)

【年通号数】公開・登録公報2018-041

【出願番号】特願2018-520106(P2018-520106)

【国際特許分類】

C 1 2 N	5/09	(2010.01)
C 1 2 M	1/34	(2006.01)
C 1 2 M	3/00	(2006.01)
C 1 2 Q	1/02	(2006.01)
C 1 2 Q	1/00	(2006.01)
C 1 2 N	11/00	(2006.01)
C 1 2 N	9/26	(2006.01)
C 1 2 N	9/50	(2006.01)
C 1 2 N	9/66	(2006.01)
C 1 2 N	9/76	(2006.01)
C 1 2 N	9/16	(2006.01)
C 0 7 K	14/50	(2006.01)
C 0 7 K	14/575	(2006.01)
C 0 7 K	14/65	(2006.01)
C 0 7 K	14/54	(2006.01)
C 0 7 K	14/52	(2006.01)
C 1 2 N	15/113	(2010.01)
C 0 7 K	14/475	(2006.01)
C 0 7 K	14/78	(2006.01)
C 1 2 N	1/00	(2006.01)
C 1 2 N	9/99	(2006.01)

【F I】

C 1 2 N	5/09	
C 1 2 M	1/34	B
C 1 2 M	3/00	A
C 1 2 Q	1/02	
C 1 2 Q	1/00	B
C 1 2 N	11/00	
C 1 2 N	9/26	
C 1 2 N	9/50	
C 1 2 N	9/66	
C 1 2 N	9/76	
C 1 2 N	9/16	Z
C 0 7 K	14/50	
C 0 7 K	14/575	
C 0 7 K	14/65	
C 0 7 K	14/54	
C 0 7 K	14/52	
C 1 2 N	15/113	Z
C 0 7 K	14/475	
C 0 7 K	14/78	

C 1 2 N	1/00	D
C 1 2 N	1/00	F
C 1 2 N	9/99	

【手続補正書】**【提出日】**令和1年9月2日(2019.9.2)**【手続補正1】****【補正対象書類名】**特許請求の範囲**【補正対象項目名】**全文**【補正方法】**変更**【補正の内容】****【特許請求の範囲】****【請求項1】**

ヒト対象から得られた、臨床検査用の生存疾患細胞の試料を調製する方法であって、前記ヒト対象から得られた生存疾患細胞の前記試料を、6～17%の酸素を含む条件下、少なくとも1種のアノイキス阻害剤を含む培地中、水和細胞外マトリックス(ECM)でコートした細胞培養容器表面上で培養すること、を含む方法。

【請求項2】

前記試料が、10%の酸素を含む条件下で培養される、および/または生存疾患細胞の前記試料が、20%の酸素を含む条件下で、アノイキス阻害剤を欠く前記培地に移される、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記試料が、少なくとも1種の内因性アノイキス経路の阻害剤および少なくとも1種の外因性アノイキス経路の阻害剤を含む培地中で培養される、および/または前記少なくとも1種のアノイキス阻害剤が、抗アノイキス経路をアゴナイズする、請求項1および2のいずれか1項に記載の方法。

【請求項4】

前記少なくとも1種のアノイキス阻害剤が、必要に応じて、キナーゼ阻害剤、プロテアーゼ阻害剤、ストレス阻害剤、デスレセプター阻害剤、チトクロムC阻害剤および接着関連アノイキス阻害剤からなる群から選択される；または必要に応じて、Rh_o結合キナーゼ阻害剤、ALK5阻害剤、カスパーーゼ阻害剤、マトリックスメタロプロテアーゼ阻害剤、WNTシグナル伝達アゴニスト、レドックス緩衝剤、活性酸素種阻害剤、TNF-阻害剤、TGF-阻害剤、チトクロムC放出阻害剤、カルシウムチャネル活性化のない炭酸脱水酵素アンタゴニスト、インテグリン安定剤、インテグリンリガンド、Fas阻害剤、FasL阻害剤、Bax阻害剤およびApaf-1阻害剤からなる群から選択される、請求項1～3のいずれか1項に記載の方法。

【請求項5】

前記試料が、少なくとも3種のアノイキス阻害剤を含む培地中で培養され、必要に応じて、前記少なくとも3種のアノイキス阻害剤が、少なくとも1種のカスパーーゼ阻害剤、少なくとも1種の MMP3阻害剤および少なくとも1種の Rh_o結合キナーゼ阻害剤を含む、請求項1～4のいずれか1項に記載の方法。

【請求項6】

生存疾患細胞の前記試料が、培養の前に、消化培地に一定時間接触され、前記消化培地が、アノイキス、細胞表面接着分子損傷または非アノイキス手段による細胞死を生ずることなく、組織を消化し、必要に応じて、前記消化培地が、少なくとも1種のアノイキス阻害剤を含む、請求項1～5のいずれか1項に記載の方法。

【請求項7】

生存疾患細胞の前記試料が、
(i) 少なくとも1種のアノイキス阻害剤を含む前記培地中で少なくとも1時間培養される；および/または

(i i) 必要に応じて、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 、トリヨードサイロニン、テトラヨードサイロニン、フェチュイン、溶液型の細胞外マトリックス成分、フィブロネクチン、コラーゲン、ラミニン、ビトロネクチン、細胞間CAM、血管CAM、MAdCAM、グリコサミノグリカン、プロテオグリカン、および増殖因子からなる群から選択される、接着経路の活性化を促進する少なくとも1つの成分を含む培地中で培養される；および／または

(i i i) 必要に応じて、EGTA、EDTA、二価の金属イオンキレート化剤などの Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、および／または Mn^{2+} キレート化剤、ディスパーゼ、TrypLE、トリプシン、アクターゼ、アキュマックス、コラゲナーゼ、ヒアルロニダーゼ、エラスターーゼ、トリプシン阻害剤、STEMzyme、プロナーゼおよびデオキシリボヌクレアーゼからなる群から選択される、接着の一時的反転を促進し、細胞の1つの容器から別の容器への移動を容易にする少なくとも1つの成分を含む培地中で培養される；および／または

(i v) 無血清培地中で培養される；および／または

(v) 必要に応じて、必須および非必須アミノ酸、ビタミン、希少必須金属、pH緩衝剤（単一または複数）、塩（ Na^+ 、 K^+ 、 Fe 、 Zn 、 Cu ）、亜セレン酸塩、ケイ酸塩、ブドウ糖またはその他の生物学的に実用的な炭素源、脂質、リポ酸などの脂肪酸、ピルビン酸塩、トランスフェリン、増殖因子、ケモカイン、サイトカイン、マイトジエン、エタノールアミン、アルブミン、ホルモン（例えば、プロゲステロン、テストステロン、エストラジオール）、ブトレシン、ピルビン酸塩、チミジン、リノール酸、葉酸、フォリン酸、コリン、ピリドキサール塩酸塩、ビオチン、ヒポキサンチン、プリンおよびプリン誘導体、ピリミジンおよびピリミジン誘導体、からなる群から選択される、前記生存疾患細胞の生理特性またはゲノム特性を保存する少なくとも1つの成分を含む培地中で培養される；および／または

(v i) 必要に応じて、腫瘍または疾患微小環境に関連する増殖因子、HGF、FGF（1～4型）、エキソソーム、mRNA、その他の低分子タンパク質非コードRNA、より長いタンパク質非コードRNA、ホルモン、IGF、VEGF、インターロイキン、サイトカイン、ケモカイン、および前記疾患細胞中およびその周辺の細胞により產生されるオートクリンまたはパラクリン因子、からなる群から選択される、細胞成長、細胞分裂または細胞周期を促進して細胞増殖を容易にする少なくとも1つの成分を含む無血清培地中で培養される。

請求項1～6のいずれか1項に記載の方法。

【請求項8】

前記水和細胞外マトリックスが、

(i) 必要に応じて、フィブリルおよび親水性表面を含む、フィブロネクチンおよびコラーゲン；または

(i i) ラミニン332（ラミニンV）またはコラーゲン-ラミニン332（ラミニンV）共構造

からなり、必要に応じて、水和され、折り畳まれている、請求項1～7のいずれか1項に記載の方法。

【請求項9】

前記生存疾患細胞が癌細胞である、請求項1～8のいずれか1項に記載の方法。

【請求項10】

前記生存疾患細胞の試料を、水和細胞外マトリックス（ECM）を含むバイオセンサー表面に付着させるステップであって、前記ECMが、(i) フィブロネクチンおよびコラーゲン；(i i) コラーゲンおよびラミニン332（ラミニンV）または；(i i i) ラミニン332（ラミニンV）からなり、それにより、臨床試験のための前記試料を調製する、ステップをさらに含む、請求項1～9のいずれか1項に記載の方法。

【請求項11】

臨床検査が、バイオセンサーを使って前記試料で実施される、請求項1～10のいずれ

か 1 項に記載の方法。

【請求項 1 2】

6 % ~ 1 7 % の酸素を含む条件下、少なくとも 1 種のアノイキス阻害剤を含む培地中で培養される初代ヒト癌細胞を含む、細胞培養組成物。

【請求項 1 3】

前記培地が少なくとも 3 種のアノイキス阻害剤を含み、前記細胞が 10 % の酸素を含む条件下で培養され、必要に応じて、前記少なくとも 3 種のアノイキス阻害剤が、少なくとも 1 種のカスパーゼ阻害剤、少なくとも 1 種の M M P 3 阻害剤および少なくとも 1 種の R h o 結合キナーゼ阻害剤を含む、請求項 1 2 に記載の細胞培養組成物。

【請求項 1 4】

水和細胞外マトリックス (E C M) でコートした細胞培養容器表面上で培養される、請求項 1 2 または 1 3 に記載の細胞培養組成物。

【請求項 1 5】

前記水和細胞外マトリックスが、(i) 必要に応じて、フィブリル表面および親水性表面を含む、フィブロネクチンおよびコラーゲン；または(i i) ラミニン 3 3 2 (ラミニン V) またはコラーゲン - ラミニン 3 3 2 (ラミニン V) 共構造からなり；必要に応じて、水和され、折り畳まれている、請求項 1 4 に記載の細胞培養組成物。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 2 7

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 2 7】

本発明の種々の実施形態の詳細は、下記説明に記述される。本発明の他の特長、目的、および利点は、説明および図面、ならびに特許請求の範囲から明らかとなるであろう。

特定の実施形態では、例えば以下の項目が提供される。

(項目 1)

ヒト対象から得られた、臨床検査用の生存疾患細胞の試料を調製する方法であって、前記ヒト対象から得られた生存疾患細胞の試料を、2 % 超および 20 % 未満の酸素を含む条件下、少なくとも 1 種のアノイキス阻害剤を含む培地中で培養すること、および前記生存疾患細胞の試料で臨床検査を実施すること、を含む方法。

(項目 2)

ヒト対象から得られた、臨床検査用の生存疾患細胞の試料を調製する方法であって、前記ヒト対象から得られた生存疾患細胞の前記試料を、6 ~ 1 7 % の酸素を含む条件下、少なくとも 1 種の消化酵素および少なくとも 1 種のアノイキス阻害剤を含む培地中で培養すること、

前記試料を、6 ~ 1 7 % の酸素を含む条件下、少なくとも 1 種のアノイキス阻害剤を含み、消化酵素を欠く培地中で培養すること、を含む方法。

(項目 3)

ヒト対象から得られた、臨床検査用の生存疾患細胞の試料を調製する方法であって、前記ヒト対象から得られた生存疾患細胞の前記試料を、6 ~ 1 7 % の酸素を含む条件下、少なくとも 1 種のアノイキス阻害剤を含む培地中、水和細胞外マトリックス (E C M) でコートした細胞培養容器表面上で培養すること、を含む方法。

(項目 4)

ヒト対象から得られた、臨床検査用の生存疾患細胞の試料を調製する方法であって、前記ヒト対象から得られた生存疾患細胞の前記試料を、6 ~ 1 7 % の酸素を含む条件下、少なくとも 1 種のアノイキス阻害剤を含む培地中、水和細胞外マトリックス (E C M) を含む細胞培養容器表面上で培養すること、および

(i) フィブロネクチンおよびコラーゲン、(i i) コラーゲンおよびラミニン 3 3 2

(ラミニンV)または(i i i)ラミニン332(ラミニンV)からなる水和細胞外マトリックス(ECM)を含むバイオセンサー表面に生存疾患細胞の前記試料を付着させ、それにより、臨床検査用の前記試料を調製すること、を含む方法。

(項目5)

ヒト対象から得られた、臨床検査用の生存疾患細胞の試料を調製する方法であって、前記ヒト対象から得られた生存疾患細胞の前記試料を、6～17%の酸素を含む条件下、少なくとも1種のカスパーーゼ阻害剤、少なくとも1種のMMP3阻害剤および少なくとも1種のRho結合キナーゼ阻害剤を含む培地中で培養し、それにより、臨床検査用の前記試料を調製すること、を含む方法。

(項目6)

ヒト対象から得られた、臨床検査用の生存疾患細胞の試料を、バイオセンサーを使って調製する方法であって、

フィブロネクチンおよびコラーゲンからなる水和細胞外マトリックス(ECM)を含むバイオセンサー表面に生存疾患細胞の前記試料を付着させること、および

バイオセンサーを用いて、生存疾患細胞の前記試料で臨床検査を実施すること、を含む方法。

(項目7)

前記試料が、6～17%の酸素を含む条件下で培養される、項目1に記載の方法。

(項目8)

前記試料が、10%の酸素を含む条件下で培養される、項目1～5のいずれか1項に記載の方法。

(項目9)

前記試料が、少なくとも1種の内因性アノイキス経路の阻害剤および少なくとも1種の外因性アノイキス経路の阻害剤を含む培地中で培養される、項目1～4のいずれか1項に記載の方法。

(項目10)

前記少なくとも1種のアノイキス阻害剤が、抗アノイキス経路をアゴナイズする、項目1～4のいずれか1項に記載の方法。

(項目11)

前記少なくとも1種のアノイキス阻害剤が、キナーゼ阻害剤、プロテアーゼ阻害剤、ストレス阻害剤、デスレセプター阻害剤、チトクロムC阻害剤および接着関連アノイキス阻害剤からなる群から選択される、項目1～4のいずれか1項に記載の方法。

(項目12)

前記少なくとも1種のアノイキス阻害剤が、Rho結合キナーゼ阻害剤、ALK5阻害剤、カスパーーゼ阻害剤、マトリックスメタロプロテアーゼ阻害剤、WNTシグナル伝達アゴニスト、レドックス緩衝剤、活性酸素種阻害剤、TNF-阻害剤、TGF-阻害剤、チトクロムC放出阻害剤、カルシウムチャネル活性化のない炭酸脱水酵素アンタゴニスト、インテグリン安定剤、インテグリンリガンド、Fas阻害剤、FasL阻害剤、Bax阻害剤およびApaf-1阻害剤からなる群から選択される、項目1～4のいずれか1項に記載の方法。

(項目13)

前記試料が、少なくとも3種のアノイキス阻害剤を含む培地中で培養される、項目1～4のいずれか1項に記載の方法。

(項目14)

生存疾患細胞の前記試料を、培養の前に、消化培地に一定時間接触させる方法であって、前記消化培地が、アノイキス、細胞表面接着分子損傷または非アノイキス手段による細胞死を生ずることなく、組織を消化する、項目1および項目3～5のいずれか1項に記載の方法。

(項目15)

前記消化培地が、少なくとも1種のアノイキス阻害剤を含む、項目1～4に記載の方法。

(項目 16)

生存疾患細胞の前記試料が、少なくとも1種のアノイキス阻害剤を含む前記培地中で少なくとも1時間培養される、項目1および項目3～5のいずれか1項に記載の方法。

(項目 17)

生存疾患細胞の前記試料が、20%の酸素を含む条件下で、アノイキス阻害剤を欠く前記培地に移される、項目16に記載の方法。

(項目 18)

生存疾患細胞の前記試料が、接着経路の活性化を促進する少なくとも1つの成分を含む培地中で培養される、項目1～5のいずれか1項に記載の方法。

(項目 19)

前記少なくとも1つの成分が、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 、トリヨードサイロニン、テトラヨードサイロニン、フェチュイン、溶液型の細胞外マトリックス成分、フィブロネクチン、コラーゲン、ラミニン、ビトロネクチン、細胞間CAM、血管CAM、MAdCAM、グリコサミノグリカン、プロテオグリカン、および増殖因子からなる群から選択される、項目18に記載の方法。

(項目 20)

生存疾患細胞の前記試料が、接着の一時的反転を促進し、細胞の1つの容器から別の容器への移動を容易にする少なくとも1つの成分を含む培地中で培養される、項目1～5のいずれか1項に記載の方法。

(項目 21)

前記少なくとも1つの成分が、EGTA、EDTA、二価の金属イオンキレート化剤などの Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、および/または Mn^{2+} キレート化剤、ディスパーゼ、TrypLE、トリプシン、アクターゼ、アキュマックス、コラゲナーゼ、ヒアルロニダーゼ、エラスターーゼ、トリプシン阻害剤、STEMzyme、プロナーゼおよびデオキシリボヌクレアーゼからなる群から選択される、項目20に記載の方法。

(項目 22)

生存疾患細胞の前記試料が、無血清培地中で培養される、項目1～5のいずれか1項に記載の方法。

(項目 23)

生存疾患細胞の前記試料が、前記生存疾患細胞の生理特性またはゲノム特性を保存する少なくとも1つの成分を含む培地中で培養される、項目1～5のいずれか1項に記載の方法。

(項目 24)

前記生存疾患細胞の生理特性またはゲノム特性を保存する少なくとも1つの成分が、必須および非必須アミノ酸、ビタミン、希少必須金属、pH緩衝剤(単一または複数)、塩(Na^+ 、 K^+ 、 Fe 、 Zn 、 Cu)、亜セレン酸塩、ケイ酸塩、ブドウ糖または他の生物学的に実用的な炭素源、脂質、リポ酸などの脂肪酸、ピルビン酸塩、トランスフェリン、増殖因子、ケモカイン、サイトカイン、マイトジエン、エタノールアミン、アルブミン、ホルモン(例えば、プロゲステロン、テストステロン、エストラジオール)、ブトレシン、ピルビン酸塩、チミジン、リノール酸、葉酸、フォリン酸、コリン、ピリドキサール塩酸塩、ビオチン、ヒポキサンチン、プリンおよびプリン誘導体、ピリミジンおよびピリミジン誘導体、からなる群から選択される、項目23に記載の方法。

(項目 25)

生存疾患細胞の前記試料が、細胞成長、細胞分裂または細胞周期を促進して細胞増殖を容易にする少なくとも1つの成分を含む無血清培地中で培養される、項目1～5のいずれか1項に記載の方法。

(項目 26)

細胞増殖、細胞分裂、または細胞周期を促進する前記少なくとも1つの成分が、腫瘍または疾患微小環境に関連する増殖因子、HGF、FGF(1～4型)、エキソソーム、miRNA、その他の低分子タンパク質非コードRNA、より長いタンパク質非コードRN

A、ホルモン、IGF、VEGF、インターロイキン、サイトカイン、ケモカイン、および前記疾患細胞中およびその周辺の細胞により產生されるオートクリンまたはパラクリン因子、からなる群から選択される、項目25に記載の方法。

(項目27)

生存疾患細胞の前記試料が、水和細胞外マトリックス(ECM)を含む表面に付着される、項目1、2および5のいずれか1項に記載の方法。

(項目28)

前記ECMが水和され、折り畳まれている、項目3、4、6および27のいずれか1項に記載の方法。

(項目29)

前記表面がバイオセンサー表面である、項目27に記載の方法。

(項目30)

前記表面が細胞培養容器表面である、項目27に記載の方法。

(項目31)

前記水和細胞外マトリックスが、フィブロネクチンおよびコラーゲンからなる、項目3、4および27のいずれか1項に記載の方法。

(項目32)

前記細胞外マトリックスが水和され、折り畳まれている、項目31に記載の方法。

(項目33)

前記フィブロネクチンおよびコラーゲンが、フィブリルおよび親水性表面を含む、項目6または項目31に記載の方法。

(項目34)

前記水和細胞外マトリックスが、ラミニン332(ラミニンV)またはコラーゲン-ラミニン332(ラミニンV)共構造からなる、項目3、4および27のいずれか1項に記載の方法。

(項目35)

前記ECMが水和され、折り畳まれている、項目34に記載の方法。

(項目36)

臨床検査が、バイオセンサーを使って前記試料で実施される、項目1～6および29のいずれか1項に記載の方法。

(項目37)

前記臨床検査が、生存疾患細胞の前記試料を少なくとも1種の薬剤に接触させ、前記試料の前記少なくとも1種の薬剤との接触の前後に、細胞接着または付着を測定することを含む、項目36に記載の方法。

(項目38)

前記生存疾患細胞が癌細胞である、項目1～6のいずれか1項に記載の方法。

(項目39)

6%～17%の酸素を含む条件下、少なくとも1種のアノイキス阻害剤を含む培地中で培養される初代ヒト癌細胞を含む、細胞培養組成物。

(項目40)

前記培地が少なくとも3種のアノイキス阻害剤を含み、前記細胞が10%の酸素を含む条件下で培養される、項目39に記載の細胞培養組成物。

(項目41)

バイオセンサー表面であって、水和細胞外マトリックス(ECM)を介して前記バイオセンサー表面に付着した初代ヒト癌細胞を含み、前記ECMが、(i)フィブロネクチンおよびコラーゲン、(ii)コラーゲンおよびラミニン332(ラミニンV)または(iii)ラミニン332(ラミニンV)からなる、バイオセンサー表面。

(項目42)

前記水和ECMが、フィブリル表面および親水性表面を含むフィブロネクチンおよびコラーゲンからなる、項目41に記載のバイオセンサー表面。

(項目43)

細胞培養容器表面であって、水和細胞外マトリックス(ＥＣＭ)を介して前記細胞培養表面に付着した初代ヒト癌細胞を含み、前記ＥＣＭが、(i)フィブロネクチンおよびコラーゲン、(ii)コラーゲンおよびラミニン332(ラミニンV)または(iii)ラミニン332(ラミニンV)からなる、細胞培養容器表面。

(項目44)

前記水和ＥＣＭが、フィブリル表面および親水性表面を含むフィブロネクチンおよびコラーゲンからなる、項目43に記載の細胞培養容器表面。

(項目45)

前記水和ＥＣＭが折り畳まれている、項目41～44に記載の方法。