



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년01월21일

(11) 등록번호 10-2757122

(24) 등록일자 2025년01월15일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 5/09 (2010.01)

(52) CPC특허분류

C12N 5/0693 (2013.01)

C12N 2500/02 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2018-7010765

(22) 출원일자(국제) 2016년10월20일

심사청구일자 2021년10월19일

(85) 번역문제출일자 2018년04월17일

(65) 공개번호 10-2018-0057653

(43) 공개일자 2018년05월30일

(86) 국제출원번호 PCT/US2016/057923

(87) 국제공개번호 WO 2017/070353

국제공개일자 2017년04월27일

(30) 우선권주장

62/243,765 2015년10월20일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

EP01795897 A1

W02009066258 A1

W02014132032 A1

(73) 특허권자

셀퀴티 인크.

미국 55446 미네소타 미니애폴리스 씨티식스쓰 애
비뉴 노쓰 16305 스위트 100

(72) 발명자

랭, 란스, 가빈

미국 55356 미네소타주 오로노 헌트 팜 로드 994
리치, 벤미국 55446 미네소타주 미니애폴리스 36쓰 애비뉴
엔. 세인트 450 16305

단다팻, 아브히짓

미국 55446 미네소타주 미니애폴리스 36쓰 애비뉴
엔. 세인트 450 16305

(74) 대리인

양영준, 이상남

전체 청구항 수 : 총 12 항

심사관 : 김정태

(54) 발명의 명칭 1차 세포 샘플을 제조하는 방법

(57) 요약

본 발명은 임상 시험을 위해 인간 대상체로부터 수득된 생존 환부 세포의 샘플을 제조하는 방법을 제공하고, 여기서, 상기 방법은 아노이키스를 억제하고/하거나 이들이 생체내에 있는 경우 세포의 생리학적 기능 및 계층 조성을 유지하면서 세포에서 아노이키스를 억제한다. 본 발명의 방법에서, 1차 세포는 2 % 초과 및 20 % 미만의 산소와 같은 항-아노이키스 대기 조건하에서 적어도 하나의 아노이키스 억제제, 바람직하게 내인성 아노이키스 경로의 적어도 하나의 억제제 및 외인성 아노이키스 경로의 적어도 하나의 억제제를 포함하는 배지에서 배양한다. 아노이키스를 억제하는 조건하에서 표면 부착을 포함하는 다수의 배양 조건을 조합하는 방법이 또한 제공된다. 본 발명의 방법에 사용하기 위한 조성물 및 키트가 또한 제공된다.

(52) CPC특허분류

C12N 2501/48 (2013.01)

C12N 2501/727 (2013.01)

C12N 2501/734 (2013.01)

C12N 2503/00 (2013.01)

C12N 2533/52 (2013.01)

C12N 2533/54 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

임상 시험을 위해 인간 대상체로부터 수득된 생존 환부 세포 (viable diseased cell)의 샘플을 제조하는 방법으로서, 상기 방법은,

수화된 세포의 매트릭스 (ECM)로 코팅된 세포 배양 용기 표면 상에서 6-17 %의 산소를 포함하는 조건하에서 적어도 하나의 Rho-연합된 키나제 억제제, 적어도 하나의 카스파제 억제제 및 적어도 하나의 매트릭스 메탈로프로테아제 (MMP3) 억제제를 포함하는 배지에서 인간 대상체로부터 수득된 생존 환부 세포의 샘플을 배양하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 샘플이 10 % 산소를 포함하는 조건하에서 배양되는, 방법.

청구항 3

청구항 1 또는 2에 있어서, 상기 생존 환부 세포의 샘플을 배양 전 특정 기간 동안 분해 배지와 접촉시키고, 여기서 상기 분해 배지는 아노이키스를 유발하는 것 없이 또는 세포 표면 접촉 분자 손상 없이 또는 세포사의 비-아노이키스 수단 없이 조직을 분해하며, 임의로 상기 분해 배지는 적어도 하나의 Rho-연합된 키나제 억제제, 적어도 하나의 카스파제 억제제 및 적어도 하나의 매트릭스 메탈로프로테아제 (MMP3) 억제제를 포함하는, 방법.

청구항 4

청구항 1 또는 2에 있어서, 상기 생존 환부 세포의 샘플이

(i) 적어도 1시간 동안 적어도 하나의 Rho-연합된 키나제 억제제, 적어도 하나의 카스파제 억제제 및 적어도 하나의 매트릭스 메탈로프로테아제 (MMP3) 억제제를 포함하는 배지에서 배양되고/거나;

(ii) Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , 트리요오도티로닌, 테트라요오도티로닌, 페투인, 세포의 매트릭스 성분의 용액 형태, 피브로넥틴, 콜라겐, 라미닌, 비트로넥틴, 세포내CAMs, 혈관CAMs, MAdCAMs, 글리코사미노글리칸, 프로테오글리칸 및 성장 인자로 이루어진 그룹으로부터 임의로 선택되는, 접촉 경로의 활성화를 촉진시키는 적어도 하나의 성분을 포함하는 배지에서 배양되고/거나;

(iii) Ca^{2+} , Mg^{2+} , 및/또는 Mn^{2+} 킬레이터, 예를 들어, EGTA, EDTA, 2가 금속 이온 킬레이터, 디스파제, TrypLE, 트립신, 아쿠타제, 아쿠맥스, 콜라겐아제, 하이알루로니다제, 엘라스타제, 트립신 억제제, STEMxyme, 프로나제 및 데옥시리보뉴클레아제로 이루어진 그룹으로부터 임의로 선택되는, 하나의 용기로부터 또 다른 용기로의 세포 전달을 촉진시키기 위해 접촉의 일시적 역전을 촉진시키는 적어도 하나의 성분을 포함하는 배지에서 배양되고/거나;

(iv) 무혈청 배양 배지에서 배양되고/거나;

(v) 필수 및 비-필수 아미노산, 비타민, 희귀 필수 금속, pH 완충제(들), 염 (Na^+ , K^+ , Fe , Zn , Cu), 셀레나이트, 실리케이트, 글루코스 또는 다른 생물학적 실제 탄소원, 지질, 지방산, 예를 들어, 리포산, 피루베이트, 트랜스페린, 성장 인자, 케모킨, 사이토킨, 미토겐, 에탄올아민, 알부민, 호르몬 (예를 들어, 프로게스테론, 테스토스테론, 에스트라디올), 푸트레신, 피루베이트, 티미딘, 리놀레산, 폴산, 폴린산, 콜린, 피리독살 하이드로클로라이드, 비오틴, 하이포크산틴, 퓨린 및 퓨린 유도체, 피리미딘 및 피리미딘 유도체로 이루어진 그룹으로부터 임의로 선택되는, 상기 생존 환부 세포의 생리학적 또는 게놈 특징을 보존하는 적어도 하나의 성분을 포함하는 배지에서 배양되고/거나;

(vi) 종양 또는 환부 미세환경과 연관된 성장 인자, HGF, FGF (타입 1-4), 엑소솜, miRNA, 다른 소형 비-단백질 암호화 RNA, 보다 긴 비-단백질 암호화 RNA, 호르몬, IGF, VEGF, 인터류킨, 사이토킨, 케모킨, 및 환부 세포 내 및 이의 주변 세포에 의해 생성되는 자가분비 (autocrine) 또는 주변분비 인자 (paracrine factor)로 이루어진 그룹으로부터 임의로 선택되는, 세포 증식을 촉진시키기 위해 세포 성장, 세포 분열 또는 세포 순환을 촉진하는

적어도 하나의 성분을 포함하는 무혈청 배지에서 배양되는, 방법.

청구항 5

청구항 1 또는 2에 있어서, 상기 수화된 세포의 매트릭스가

- (i) 원섬유 (fibrillic) 및 친수성 표면을 임의로 포함하는 피브로넥틴 및 콜라겐; 또는
- (ii) 라미닌 332 (라미닌 V) 또는 콜라겐-라미닌 332 (라미닌 V) 동시 구조물로 이루어지고; 임의로 수화되고 폴딩되는, 방법.

청구항 6

청구항 1 또는 2에 있어서, 상기 생존 환부 세포가 암 세포인, 방법.

청구항 7

청구항 1 또는 2에 있어서,

수화된 세포의 매트릭스 (ECM)를 포함하는 바이오센서 표면에 생존 환부 세포의 샘플을 부착시켜 임상 시험을 위한 샘플을 제조하는 단계를 추가로 포함하며, 상기 ECM은 (i) 피브로넥틴 및 콜라겐; (ii) 콜라겐 및 라미닌 332 (라미닌 V) 또는 (iii) 라미닌 332 (라미닌 V)로 이루어지는, 방법.

청구항 8

청구항 1 또는 2에 있어서, 바이오센서를 사용하여 샘플에 대해 임상 시험이 수행되는, 방법.

청구항 9

6-17 %의 산소를 포함하는 조건하에서 적어도 하나의 Rho-연합된 키나제 억제제, 적어도 하나의 카스파제 억제제 및 적어도 하나의 매트릭스 메탈로프로테아제 (MMP3) 억제제를 포함하는 배지에서 배양된 1차 인간 암 세포를 포함하는 세포 배양 조성물.

청구항 10

청구항 9에 있어서, 상기 세포가 10 % 산소를 포함하는 조건하에서 배양되는, 세포 배양 조성물.

청구항 11

청구항 9 또는 10에 있어서, 수화된 세포의 매트릭스 (ECM)로 코팅된 세포 배양 용기 표면 상에서 배양되는, 세포 배양 조성물.

청구항 12

청구항 11에 있어서, 상기 수화된 세포의 매트릭스가 (i) 원섬유 및 친수성 표면을 임의로 포함하는 피브로넥틴 및 콜라겐; 또는 (ii) 라미닌 332 (라미닌 V) 또는 콜라겐-라미닌 332 (라미닌 V) 동시 구조물로 이루어지고; 임의로 수화되고 폴딩되는, 세포 배양 조성물.

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원

[0002] 본 출원은 2015년 10월 20일자로 출원된 미국 가출원 번호 제62/243,765호의 우선일의 우선권을 주장하고 이의 내용은 전문이 본원에 참조로 인용된다.

배경 기술

[0003] 세포가 인간 조직 표본으로부터 직접 수득되는 경우 다수의 제약이 임상 시험에서 샘플로서 사용하기에 적합한

생존 인간 환부 세포의 수득을 어렵게 한다. 이것은 조직으로부터 추출된 생존 인간 세포를 사용하여 임상 시험이 거의 없는 이유를 대부분 설명한다. 흔히, 생존 환부 세포의 샘플의 제조는 표본이 환자로부터 제거된 위치와는 상이한 위치에서 수행되어야만 한다. 이것은 연장된 기간 동안 세포 생존을 유지시키는 수거 컨테이너에서 수송되는 것을 필요로 한다. 추가로, 시험을 위해 가용한 환부 조직의 양은 제한된다. 표본이 생검 과정 동안에 수득되는 경우, 5-10 밀리그램 또는 그 이하의 환부 조직이 가용한 전부일 수 있다. 상기 크기의 조직 표본으로부터 생존 세포를 추출하기 위한 통상적 기술은 거의 생존 세포를 생성하지 않는다. 임상 시험은 몇 개 이상의 생존 환부 세포를 요구하고 이는 증식될 추출된 세포는 환자의 종양을 나타내는 적합한 수를 가질것을 요구한다. 이것은 여러 추가의 제약을 제공한다. 먼저, 세포를 증식시키기 위해 가용한 시간은 제한된다. 임상 시험 결과는 적당한 처리 프로토콜의 적절한 선택을 보장하기 위해 환자 표본의 획득 후 수일 내에 이상적으로 가용하다. 드문 경우에, 임상 결과는 표본이 환자로부터 수득된 후 30일에 여전히 유용할 수 있다. 대부분의 경우에, 임상 시험은 2주 미만에 유용한 결과를 산출하도록 디자인되어야 한다. 이것은 이상적으로 2주 미만에 충분한 수의 생존 환부 세포를 제공할 수 있는, 표본으로부터 추출된 소수의 생존 세포를 추출하고 증식시키기 위한 방법을 필요로 한다.

[0004] 추가로, 임상 시험 결과가 신뢰받을 수 있게 하기 위해, 세포는 본래 표본에서 발견된 환부 세포의 분포를 유지하는 방식으로 추출되고 증식되어야 한다. 이것은 인간 표본을 포함하는 임의의 임상 시험이, 상기 표본으로부터 유래된 시험 샘플이 본래의 표본 자체를 나타내도록 해야하기 때문이다. 예를 들어, 종양 표본은 서로의 특정 비율로 상이한 상피 세포 유형-내강, 근육, 기저, 줄기로 이루어지고 이로부터 수득된 샘플은 대략적으로 유사한 비율로 이들 세포 유형을 포함해야 한다. 그러나, 인간 표본으로부터 직접적으로 수득된 세포의 샘플이 추출되고 증식되는 경우, 이의 세포 유형이 다른 세포 유형 보다 큰 비율로 증식할 수 있거나 또 다른 세포 유형이, 사용된 조건에 의존하여 전혀 증식될 수 없다. 이것이 일어나는 경우, 수득한 샘플은 본래의 표본을 대표하지 못할 것이고 따라서 임상 샘플로서 손상될 수 있다.

[0005] 세포 샘플의 제조를 위한 관련 요건은 수득한 환부 세포가 이들의 생체내 계층 및 생리학적 활성 프로필을 보유하여 이들이 시험될 생리학적 또는 계층 특징을 보유하도록 하는 것이다. 예를 들어, 세포 접착 또는 세포 신호 전달 경로 활성을 측정하기 위해, 세포의 생체외 경로는 이들의 생체내 기능을 보유해야만 한다. 또한, 임상 시험 결과의 정확성이 포함된다. 또 다른 요건은 세포 샘플을 제조하기 위해 사용되는 임의의 방법이 수득된 높은 %의 표본으로부터 시험가능한 세포 샘플을 산출할 수 있어야만 한다는 것이다.

[0006] 연구를 위해 조직으로부터 1차 세포를 획득하기 위한 과학적 문헌에 기재된 현재 관행은 종양 조직으로부터 생존 세포 샘플을 수득하는데 50 % 미만의 성공율을 보고한다 (문헌참조: 예를 들어, Crystal, A.S. et al. (2014) 346:1480-1486). 임상이가 임상 시험 결과를 위해 2주까지 기꺼이 대기하고자 하는 의지는 이들 환자의 치료 지연을 정당화하기에 충분히 높은 성공적 시험의 가능성을 요구한다. 환자에 대한 치료 지연은 위험을 수반하기 때문에, 임상이는 높은 활용의 시험 결과가 가용할 수 있다는 합리적 가능성 없이, 이러한 위험을 부과하는 임상 시험을 채택할 가능성이 없다.

[0007] 따라서, 임상 시험에 대한 생존 환부 세포의 샘플을 제조하는 제시된 유일한 요건- 수송 기간 동안에 세포의 생존성, 단지 소량의 표본의 가용성, 환부 세포를 증식시키기 위해 가용한 짧은 시간을 보존하고, 본래의 종양과 일치하는 세포 샘플 조성물을 유지하고, 높은 %의 시험가능한 세포 샘플을 생성하고 생리학적 및 계층 특징을 유지하는 경우, 샘플이 임상 시험에 사용하기에 적합하도록 인간 조직 표본으로부터 유래된 1차 세포 샘플을 제조하는 신규한 방법을 개발할 필요가 있다.

발명의 내용

[0008] 발명의 요약

[0009] 본원에 기재된 방법은 임상 시험에 적합한 생존 환부 세포의 샘플을 제조하는 것에 대한 장애를 해결한다. 본 발명은 아노이키스 억제제 (예를 들어, 내인성 및/또는 외인성 아노이키스 억제제)를 포함하는 배지에서 및/또는 항-아노이키스 스트레스 감소 표면 (예를 들어, 수화된 세포외 매트릭스 단백질 조합) 상에서 및/또는 항-아노이키스, 스트레스 감소 대기 조건 (예를 들어, 2 % 초과 및 20 % 미만의 산소) 상에서 및 특히 생존 환부 세포가 아노이키스로 진입하도록 할 가능성이 높은 시험 샘플 제조 시간 동안에 상기 생존 환부 세포를 배양함에 의해 대상체로부터 수득된 생존 환부 세포 (즉, 1차 세포)의 샘플을 제조하는 조성물 및 방법을 제공한다. 본 발명의 방법은 고도로 정확한 임상 시험이 임상적 관련 시간 프레임에서 이들에 대해 수행될 수 있도록 생체내 세포의 생리학적 및 계층 특징을 유지하는 충분히 짧은 시간 양으로 충분한 수의 1차 인간 세포의 제조를 가능

하게 한다.

- [0010] 따라서, 하나의 양상에서, 본 발명은 임상 시험을 위해 인간 대상체로부터 수득된 생존 환부 세포의 샘플을 제조하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 다음을 포함한다:
- [0011] 2 % 초과 및 20 % 미만의 산소를 포함하는 조건하에서 적어도 하나의 아노이키스 억제제를 포함하는 배지에서 인간 대상체로부터 수득된 생존 환부 세포의 샘플을 배양하는 단계; 및
- [0012] 생존 환부 세포의 샘플에 대해 임상 시험을 수행하는 단계.
- [0013] 또 다른 양상에서, 본 발명은 임상 시험을 위해 인간 대상체로부터 수득된 생존 환부 세포의 샘플을 제조하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 다음을 포함한다:
- [0014] 예를 들어, 적어도 1시간 동안 (예를 들어, 3시간 동안) 6-17 %의 산소 (예를 들어, 10 % 산소)를 포함하는 조건하에서 적어도 하나의 아노이키스 억제제를 포함하는 배지에서 인간 대상체로부터 수득된 생존 환부 세포의 샘플을 배양하는 단계;
- [0015] 예를 들어, 적어도 1시간 동안 (예를 들어, 3시간 동안) 6-17 %의 산소 (예를 들어, 10 % 산소)를 포함하는 조건하에서 적어도 하나의 아노이키스 억제제를 포함하고 분해 효소가 없는 배지에서 샘플을 배양하는 단계; 및
- [0016] 20 % 산소를 포함하는 조건하에서 아노이키스 억제제가 없는 배지에서 샘플을 배양하여 임상 시험을 위한 샘플을 제조하는 단계.
- [0017] 또 다른 양상에서, 본 발명은 임상 시험을 위해 인간 대상체로부터 수득된 생존 환부 세포의 샘플을 제조하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 다음을 포함한다:
- [0018] 수화된 세포의 매트릭스 (ECM)로 코팅된 세포 배양 용기 표면 상에서 6-17 %의 산소 (예를 들어, 10 % 산소)를 포함하는 조건하에서 적어도 하나의 아노이키스 억제제를 포함하는 배지에서 인간 대상체로부터 수득된 생존 환부 세포의 샘플을 배양하는 단계.
- [0019] 또 다른 양상에서, 본 발명은 임상 시험을 위해 인간 대상체로부터 수득된 생존 환부 세포의 샘플을 제조하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 다음을 포함한다:
- [0020] 수화된 세포의 매트릭스 (ECM)로 코팅된 세포 배양 용기 표면 상에서 6-17 %의 산소 (예를 들어, 10 % 산소)를 포함하는 조건하에서 적어도 하나의 아노이키스 억제제를 포함하는 배지에서 인간 대상체로부터 수득된 생존 환부 세포의 샘플을 배양하는 단계; 및
- [0021] 생존 환부 세포의 샘플을 수화된 세포의 매트릭스 (ECM)를 포함하는 표면에 부착시켜 (여기서, 상기 ECM은 (i) 피브로넥틴 및 콜라겐; (ii) 콜라겐 및 라미닌 332 (라미닌 V) 또는 (iii) 라미닌 332 (라미닌 V)로 이루어진다) 임상 시험을 위한 샘플을 제조하는 단계.
- [0022] 또 다른 양상에서, 본 발명은 임상 시험을 위해 인간 대상체로부터 수득된 생존 환부 세포의 샘플을 제조하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 다음을 포함한다:
- [0023] 6-17 %의 산소 (예를 들어, 10 % 산소)를 포함하는 조건하에서 적어도 하나의 카스파제 억제제, 적어도 하나의 MMP3 억제제 및 적어도 하나의 Rho-연합된 키나제 억제제를 포함하는 배지에서 인간 대상체로부터 수득된 생존 환부 세포의 샘플을 배양하여 임상 시험을 위한 샘플을 제조하는 단계.
- [0024] 또 다른 양상에서, 본 발명은 바이오센서를 사용하여 임상 시험을 위해 인간 대상체로부터 수득된 생존 환부 세포의 샘플을 제조하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 다음을 포함한다:
- [0025] 피브로넥틴 및 콜라겐으로 이루어진 수화된 세포의 매트릭스 (ECM)를 포함하는 표면으로 생존 환부 세포의 샘플을 부착시키는 단계; 및
- [0026] 상기 생존 환부 세포의 샘플에 대해 바이오센서를 사용하여 임상 시험을 수행하는 단계.
- [0027] 또 다른 양상에서, 본 발명은 임상 시험을 위해 인간 대상체로부터 수득된 생존 환부 세포의 샘플을 제조하는 방법에 속하고, 상기 방법은 다음을 포함한다:
- [0028] 적어도 하나의 아노이키스 억제제 (예를 들어, 내인성 아노이키스 경로의 적어도 하나의 억제제 및 외인성 아노이키스 경로의 적어도 하나의 억제제)를 포함하는 배지에서 6-17 % 산소 (예를 들어, 10 % 산소)를 포함하는 조건하에서 인간 대상체로부터 수득된 생존 환부 세포의 샘플을 배양하는 단계;

- [0029] 피브로블라스트 및 콜라겐으로 이루어진 수화된 세포외 매트릭스 (ECM)를 포함하는 표면으로 생존 환부 세포의 샘플을 부착시키는 단계; 및
- [0030] 6-17 % 산소 (예를 들어, 10 % 산소)를 포함하는 조건하에서 적어도 하나의 아노이키스 억제제를 포함하는 배지에서 표면에 부착된 샘플의 배양을 계속하는 단계.
- [0031] 하나의 구현예에서, 상기 샘플은 내인성 아노이키스 경로의 적어도 하나의 억제제 및 외인성 아노이키스 경로의 적어도 하나의 억제제를 포함하는 배지에서 배양한다. 또 다른 구현예에서, 상기 샘플은 내인성 아노이키스 경로의 적어도 하나의 억제제 및/또는 외인성 아노이키스 경로의 적어도 하나의 억제제, 또는 이들의 조합물을 포함하는 배지에서 배양한다. 하나의 구현예에서, 적어도 하나의 아포토시스 억제제는 항-아노이키스 경로에 효능 작용을 한다. 하나의 구현예에서, 상기 샘플은 아노이키스 경로의 적어도 하나의 억제제를 포함하는 배지에서 배양한다.
- [0032] 하나의 구현예에서, 적어도 하나의 아노이키스 억제제는 키나제 억제제, 프로테아제 억제제, 스트레스 억제제, 사멸 수용체 억제제, 시토크롬 C 억제제 및 아노이키스 억제제로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 또 다른 구현예에서, 적어도 하나의 아노이키스 억제제는 Rho-연합된 키나제 억제제, ALK5 억제제, 카스파제 억제제, 매트릭스 메탈로프로테아제 억제제, 산화환원 완충제, 반응성 산소 종 억제제, TNF α 억제제, TGF β 억제제, 시토크롬 C 방출 억제제, 칼슘 채널 활성화 없는 카보닉 인하이드라제 길항제, 인테그린 안정화제, 인테그린 리간드, Fas 억제제, FasL 억제제, Bax 억제제 및 Apaf-1 억제제로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 아노이키스 억제제의 다양한 비-제한적 예는 본원에 추가로 기재된다. 특정 구현예에서, 세포 샘플이 배양되는 배지는 2개 이상의 아노이키스 억제제, 예를 들어, 2개, 3개, 4개, 5개 이상의 아노이키스 억제제를 포함한다. 예를 들어, 하나의 구현예에서, 샘플은 조합하여 사용되는, Rho-연합된 키나제 억제제, 카스파제 억제제 및 MMP3 억제제와 같은 적어도 3개의 아노이키스 억제제를 포함하는 배지에서 배양한다. 아노이키스 억제제 조합의 다양한 다른 비-제한적 예는 본원에 추가로 기재된다.
- [0033] 하나의 구현예에서, 샘플은 6-17 % 산소를 포함하는 조건하에서 배양한다. 또 다른 구현예에서, 샘플은 10 % 산소를 포함하는 조건하에서 배양한다. 또 다른 구현예에서, 샘플은 17-19 % 산소를 포함하는 조건하에서 배양한다. 특정 구현예에서, 샘플은 6-17 % 산소를 포함하는 조건하에서, 예를 들어, 특정 기간 동안 10 % 산소에서 첫번째 배양에 이어서 예를 들어, 1-5 % 산소, 또는 17-19 % 산소, 또는 20 % 산소를 포함하는 상이한 대기 조건으로의 샘플의 전환과 같은 상이한 시점에서 2개 이상의 상이한 대기 조건하에서 배양한다. 다양한 적합한 항-아노이키스, 스트레스-감소 대기 조건이 본원에서 추가로 기재된다.
- [0034] 특정 구현예에서, 생존 환부 세포의 샘플은 배양 전 특정 기간 동안 분해 배지와 접촉시키고, 여기서, 상기 분해 배지는 아노이키스를 유발하는 것 없이, 또는 세포 표면 부착 분자 손상 없이 또는 세포사의 비-아노이키스 수단 없이 조직을 분해한다. 전형적으로, 분해 배지는 하나 이상의 분해 효소를 포함한다. 특정 구현예에서, 분해 배지는 또한 적어도 하나의 아노이키스 억제제를 포함하고 다수의 아노이키스 억제제 (예를 들어, 내인성 아노이키스 경로의 적어도 하나의 억제제 및/또는 외인성 아포토시스 경로의 적어도 하나의 억제제)를 함유할 수 있다. 특정 구현예에서, 분해 배지는 또한 적어도 하나의 아노이키스 억제제를 포함한다.
- [0035] 본 발명의 방법은 상이한 기간 동안 다수의 상이한 배양 배지에서 세포 샘플을 배양하고/하거나 아노이키스 억제제(들)에 추가하여 추가의 성분을 포함하는 배양 배지에서 세포 샘플을 배양함을 포함할 수 있다. 예를 들어, 하나의 구현예에서, 생존 환부 세포의 샘플은 접착 경로의 활성화를 촉진시키는 적어도 하나의 성분을 포함하는 배지에서 배양한다. 상기 성분의 비-제한적 예는 본원에 추가로 기재된다. 또 다른 구현예에서, 생존 환부 세포의 샘플은 생존 환부 세포의 생리학적 또는 계통 특징을 보존하는 적어도 하나의 성분을 포함하는 무혈청 배양 배지에서 배양한다. 상기 성분의 다양한 비-제한적 예는 본원에 추가로 기재된다. 또 다른 구현예에서, 생존 환부 세포의 샘플은 세포 증식을 촉진시키기 위해 세포 성장, 세포 분열 또는 세포 순환을 촉진하는 적어도 하나의 성분을 포함하는 무혈청 배지에서 배양한다. 상기 성분의 비-제한적 예는 본원에 추가로 기재된다. 또 다른 구현예에서, 생존 환부 세포의 샘플은 하나의 용기로부터 또 다른 용기로 세포 전달을 촉진시키기 위해 접착의 일시적 역전을 촉진시키는 적어도 하나의 성분을 포함하는 배지에서 배양한다. 상기 성분의 다양한 비-제한적 예는 본원에 추가로 기재된다.
- [0036] 특정 구현예에서, 임상 시험을 수행하기 전에, 생존 환부 세포의 샘플은 아노이키스 억제제가 없는 배지로 전달한다. 하나의 구현예에서, 생존 환부 세포의 샘플은 아노이키스 억제제가 없는 배지로 전달하기 전 적어도 120 시간 동안 적어도 하나의 아노이키스 억제제를 포함하는 배지에서 배양한다. 또 다른 구현예에서, 샘플은 아노이키스 억제제가 없는 배지로 전달하기 전 적어도 24-96시간 동안 적어도 하나의 아노이키스 억제제를 포함하는

배지에서 배양한다. 하나의 구현예에서, 생존 환부 세포의 샘플은 20 % 산소를 포함하는 조건하에서 아노이키스 억제제가 없는 배지로 전달한다.

[0037] 특정 구현예에서, 임상 시험을 수행하기 전에, 생존 환부 세포의 샘플은 수화된 세포의 매트릭스 (ECM)를 포함하는 표면에 부착시킨다. 하나의 구현예에서, 수화된 ECM은 폴딩된다. 하나의 구현예에서, 수화된 세포의 매트릭스 (또는 수화되고 폴딩된 ECM)는 피브로넥틴 및 콜라겐으로 이루어지고, 바람직하게 상기 피브로넥틴 및 콜라겐은 원섬유 및 친수성 표면을 포함한다. 또 다른 구현예에서, 수화된 세포의 매트릭스 (또는 수화되고 폴딩된 ECM)은 콜라겐-라미닌 332 (라미닌 V) 동시-구조물로 이루어진다. 또 다른 구현예에서, 수화된 세포의 매트릭스 (또는 수화되고 폴딩된 ECM)는 라미닌 332 (라미닌 V)로 이루어진다. 하나의 구현예에서, 표면은 바이오센서 표면이다. 또 다른 구현예에서, 세포 표면은 세포 배양 용기 표면이다. 상기 방법은 생존 환부 세포의 샘플에 대해 바이오센서를 사용하여 임상 시험을 수행함을 추가로 포함할 수 있다.

[0038] 본 발명의 방법은 인간 대상체로부터 획득할 수 있는 광범위한 생존 환부 세포와 함께 사용하기에 적합하다. 바람직한 구현예에서, 생존 환부 세포는 암 세포이다. 추가로, 본 발명의 방법은 진단 시험, 유전학적 시험, 치료 용법 시험 등을 포함하는, 광범위한 시험관내 임상 시험을 위한 1차 인간 세포를 제조하기에 적합하다. 하나의 구현예에서, 임상 시험은 바이오센서를 사용하여 수행된다. 하나의 구현예에서, 임상 시험은 생존 환부 세포의 샘플을 적어도 하나의 제제와 접촉시키고 상기 샘플을 적어도 하나의 제제와 접촉시키기 전 및 후에 세포 집착 또는 부착을 측정함을 포함한다.

[0039] 또 다른 양상에서, 본 발명은 2 % 초과 및 20 % 미만의 산소 (예를 들어, 6-17 % 산소, 10 % 산소)를 포함하는 조건하에서 적어도 하나의 아노이키스 억제제를 포함하는 배지에서 배양된 1차 인간 암 세포를 포함하는 세포 배양 조성물과 관련된다. 상기 세포 배양 조성물의 하나의 구현예에서, 배지는 내인성 아노이키스 경로의 적어도 하나의 억제제 및 외인성 아노이키스 경로의 적어도 하나의 억제제를 포함하고, 여기서, 상기 세포는 6-17 % 산소 (예를 들어, 10 % 산소)를 포함하는 조건하에서 배양한다. 상기 세포 배양 조성물의 또 다른 구현예에서, 배지는 적어도 3개의 아노이키스 억제제 (예를 들어, Rho-연합된 키나제 억제제, 카스파제 억제제 및 MM3 억제제)를 포함하고, 상기 세포는 6-17 % 산소 (예를 들어, 10 % 산소)를 포함하는 조건하에서 배양한다.

[0040] 또 다른 양상에서, 본 발명은 수화된 세포의 매트릭스 (ECM)를 통해 바이오센서 표면에 부착된 1차 인간 암 세포를 포함하는 바이오센서 표면과 관련되고, 여기서, 상기 ECM은 (i) 피브로넥틴 및 콜라겐; (ii) 콜라겐 및 라미닌 332 (라미닌 V) 또는 (iii) 라미닌 332 (라미닌 V)로 이루어진다. 바이오센서 표면의 하나의 구현예에서, ECM은 원섬유 및 친수성 표면을 포함하는 피브로넥틴 및 콜라겐으로 이루어진다. 하나의 구현예에서, 수화된 ECM은 폴딩된다.

[0041] 또 다른 양상에서, 본 발명은 수화된 세포의 매트릭스 (ECM)를 통해 세포 배양 용기 표면에 부착된 1차 인간 암 세포를 포함하는 세포 배양 용기 표면과 관련되고, 여기서, 상기 ECM은 (i) 피브로넥틴 및 콜라겐; (ii) 콜라겐 및 라미닌 332 (라미닌 V) 또는 (iii) 라미닌 332 (라미닌 V)로 이루어진다. 세포 배양 용기 표면의 하나의 구현예에서, ECM은 원섬유 및 친수성 표면을 포함하는 피브로넥틴 및 콜라겐으로 이루어진다. 하나의 구현예에서, 수화된 ECM은 폴딩된다.

[0042] 본 발명의 방법을 수행하기 위한 키트, 및 인간 1차 세포 샘플로부터 생존 환부 세포를 배양하기 위한 세포 배양 조건을 최적화하기 위한 방법은 또한 본 발명에 의해 포함된다.

[0043] 본 발명의 다양한 구현예의 세부사항은 하기의 기재에 제시된다. 본 발명의 다른 특징, 목적 및 이점은 기재, 및 도면 및 청구범위로부터 자명하다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0044] 본 발명은 후속적으로 사용되는 인간 대상체로부터 획득된 조직 표본으로부터 추출된 생존 환부 세포의 샘플을 제조하는 방법을 기재하고, 상기 세포는 임상 시험을 위해 생존성이다. 이들 방법은 인간 1차 생존 환부 세포 샘플이 조직으로부터 추출되고 배양되고 시험을 위해 제조되는 경우 아노이키스에 진입하는 환부 (예를 들어, 암) 세포의 %를 감소시킨다. 지금까지 아노이키스에 대한 연구는 대부분 건강한 세포 기능을 보존하면서 암 세포를 사멸시키기 위해 세포 아포토시스 시스템을 이용하는 것을 목적으로 하였다. 아노이키스 연구는 종양 샘플로부터의 생존 암 세포와 같은 1차 인간 세포의 생존 배양물의 안정한 시험가능한 상태를 달성하기 위해, 일시적 현탁 아노이키스의 반대 기능을 밝히지 못했다.

[0045] 생존 세포를 획득하고 시험하기 위해, 이들은 먼저 환자로부터 새롭게 제거된 조직으로부터 단리될 수 있다.

본 발명은 세포가 생체내 이들의 상태를 대표하는 충분한 생존 세포를 회수할 수 있도록 천연 조직으로부터 분리되면 개시된 아노이키스 과정을 현탁시키기 위한 방법을 기재한다. 본 발명은 또한 이들이 생체내에 있는 경우 환부 세포에 필적하는, 생리학적 기능 및 계능 조성을 갖는 세포 샘플을 제조하기 위한 방법을 기재한다. 본 발명은 또한 세포 접착 경로가 세포 신호 전달 경로 기능을 방해하지 못하는 방식으로 배양 표면에 부착하는 세포 샘플을 제조하기 위한 방법을 기재하고 있다. 본 발명의 방법은 아노이키스 억제제를 포함하는 배양 배지의 사용 및/또는 항-아노이키스, 스트레스-감소 대기 조건 및/또는 세포의 항-아노이키스, 스트레스-감소 표면으로의 부착의 용도, 및/또는 이의 조합을 포함한다.

[0046] 본 발명의 활용 및 분명한 이점은 상이한 배지에 대한 경험적 결과를 본 발명과 비교함에 의해 자명하다. 구체적으로, 본 발명은 균일한 임상 시험 결과를 제공하기 위해 밀리그램 양의 질환 조직으로부터 신속하게 배양될 수 있는 세포의 이중성 집단을 제공한다. 본 발명의 조성물 및 방법을 사용하여 배양된 세포의 형태학적 및 바이오마커 분석은 질환과 동의어인 마커들 (에스트로겐 수용체, 프로게스테론 수용체, ErbB 패밀리 수용체, CD10, 클라우딘 4, CD49f, 및 본원에 기재된 다른 마커)이 충분한 다수의 환부 세포 유형 (내강, 근육, 기저, 줄기, 중간엽)의 존재를 입증하는 반면 당업계에 공지되고 시판되는 다른 배지는 임상 시험을 위해 환부 세포의 적합한 샘플을 생성할 수 없다. 다른 배지 유형은 또한 전형적으로 환부 세포 환자 샘플을 특성으로 하는 내강 환부 세포 유형의 증식을 지지하지 않는다. 추가로, 다른 배지 유형은 환자 샘플로부터 환부 세포들의 이중성 혼합을 위해 본 발명의 목적하는 결과와 부합하지 않는 단지 건강한 세포 또는 줄기 세포 또는 편평 세포 유형만을 지지한다. 요약하면, 본 발명은 임상 시험을 위해 적합한 대상체로부터 1차 환부 세포의 샘플로부터 동정된 마커를 갖는 이중성 유형의 세포를 제공하는 반면 당업계에 공지된 다른 배지는 제공하지 않는다.

[0047] 본 발명의 다양한 양상은 하기의 서브섹션에 추가로 기재되어 있다.

[0048] 아노이키스의 억제

[0049] 세포가 임상 시험에 사용될 수 있도록 대상체로부터 생존 환부 세포의 샘플과 같은 1차 세포의 성공적 배양에 대한 장애는 사멸을 프로그램화하는 세포에서 천연 제어 시스템의 일부인 아노이키스이다. 프로그램화된 사멸은 관용성이 아닌 수의 돌연변이의 증강, pH, 세포 나이, 환경적 인자, 다양한 형태의 스트레스, 예를 들어, 높거나 낮은 정도의 산소 분압, 사이토킨, 케모킨, 세포 신호 전달 분자, 단백질 및 다양한 RNA, 및 확립된 조직 경계선 이상의 세포 성장과의 접촉을 포함하지만 이에 제한되지 않는, 잠재적으로 함께 작용하는 많은 인자들에 응답하여 개시될 수 있다. 프로그램화된 세포 사멸 활성화의 균형은 아노이키스 촉진 또는 혈관형성 촉진 상호연결된 단백질 경로에 의해 세포에서 달성된다. 예를 들어, 다중-도메인 아노이키스 촉진 패밀리 구성원, 예를 들어, BAX 및 BAK는 일단 활성화되면 미토콘드리아에 침투하여 아노이키스를 유발하는 반면, 항-아노이키스 BCL-2 패밀리 구성원은 미토콘드리아 통합성을 유지한다. BH3-유일 분자 (BH3s)는 BAX-BAK를 활성화시키거나 항-아노이키스 구성원을 불활성화시킴에 의해 아노이키스를 촉진한다.

[0050] 2개 형태의 아노이키스 경로는 내인성 및 외인성으로 기재되었다 (문헌참조: 예를 들어, Fulda, S. and Debatin, K.M. (2006) *Oncogene* 7:4798-4811). 내인성 아노이키스 경로는 세포독성 자극에 응답하여 미토콘드리아 막 침투화, 시토크롬 c 방출 및 아포토시스 소체 형성을 특징으로 한다. 외인성 아노이키스 경로는 TNF-슈퍼패밀리의 사멸 수용체로의 리간드 결합에 응답하여 활성화된다. 예시적 리간드는 TNF α 및 FasL을 포함한다. 사멸 수용체 활성화는 미토콘드리아 막 침투화, 시토크롬 c 방출을 유도할 수 있고 카스파제 의존성 절단 및 아노이키스 촉진 단백질 Bid의 미토콘드리아로의 전위를 통해, 아노이키스 후기 단계로 진행한다. 내인성 및 외인성 경로 둘 다는 공유된 성분으로서 미토콘드리아 막 침투화, 시토크롬 C 방출 및 카스파제 활성화를 포함한다.

[0051] 본 발명에서 아노이키스의 억제는 억제 효능을 위해 조기 개시 아노이키스 반응의 예방 및 해결에 초점이 맞추어져 있다. 아노이키스 과정의 중단은 세포 사멸 전 이후 시점에 수행될 수 있고 또한 아노이키스의 후기 단계로 이미 진입한 세포 배양 샘플 소생시키는 것이 바람직할 수 있다. 환부 1차 세포의 pH 및 산화환원 전위 및 금속 이온 농도 (특히 칼슘의 방출)의 완충작용은 아노이키스를 예방하는 조기 시점에 바람직하다. 아노이키스 억제의 조기 시점은 바람직하게 미토콘드리아 침투성의 붕괴 및 시토크롬 c 방출의 억제를 포함한다. 아노이키스 과정에서 약간 이후의 중재 시점은 카스파제 활성화 캐스케이드의 붕괴 및 다른 프로테아제의 붕괴를 포함한다. Bcl-2 패밀리의 항-아노이키스 분자의 증가된 발현 또는 Bax, Apaf-1 또는 카스파제-8과 같은 아노이키스 촉진 분자의 감소와 함께 탈조절된 아노이키스는 아노이키스를 억제하는 것과 조합될 수 있는 추가의 구현예이다.

[0052] 따라서, 본 발명의 방법에서, 대상체로부터 수득된 생존 환부 세포의 샘플은 적어도 하나의 아노이키스 억제제

를 포함하는 배지에서 배양한다. 특정 구현예에서, 상기 배양 배지는 적어도 하나의 내인성 아노이키스 억제제 및 적어도 하나의 외인성 억제제를 포함한다. 또 다른 구현예에서, 상기 배지는 적어도 하나의 내인성 아노이키스 억제제 및 적어도 하나의 외인성 억제제를 포함한다. 다른 구현예에서, 아포토시스 억제제는 항-아노이키스 경로에 효능 작용하기 위해 선택된다.

[0053] 배양에 적합한 세포를 수득하기 위한 조직 표본에 대한 임의의 초기 제조 단계 후 (하기 추가로 논의됨), 표본으로부터 추출된 세포는 아노이키스 억제제 및 보다 바람직하게 아노이키스 억제제의 조합, 가장 바람직하게 내인성 및 또는 외인성 아노이키스 촉진 경로 억제제 및/또는 항-아노이키스 활성화제로부터 선택되는 조합을 포함하는 배지에서 배양한다.

[0054] 하기 표 1은 일반적인 유형의 아노이키스 억제제 및 상기 유형 내에 있는 예시적 부류의 억제제의 비제한적인 예 및 특정 시약의 예 및 억제제가 내인성 아노이키스 경로, 외인성 아노이키스 경로 또는 경로 둘 다에 공통된 성분 (본원에서 "공유된 경로" 아노이키스 억제제로서 언급됨)에 영향을 미치는 지의 비제한적인 예를 보여준다.

표 1:
예시적 아노이키스 억제제 분자

일반 억제제 유형	예시적 부류	특이적 시약예	경로
키나제 억제제	<ul style="list-style-type: none"> Rho-키나제 억제제 ALK5 억제제 	Y-27632 세리티닙, RepSox	공유됨 외인성
프로테아제 억제제	<ul style="list-style-type: none"> 카스파제 억제제 측정기준 스메탈로-프로테아제 억제제 	Z-VAD-FMK UK-356618	공유됨 공유됨
스트레스 억제제	<ul style="list-style-type: none"> 산화환원 완충작용 반응성 산소종 억제제 	니아신 글루타티온 에틸 에스테르	내인성 내인성
사멸 수용체 억제제	<ul style="list-style-type: none"> TNF 알파 TGF 베타 	인플릭시맵 프레솔루미맵	외인성 외인성
시토크롬 C 억제제	<ul style="list-style-type: none"> 방출 억제제 Ca²⁺채널 활성화가 없는 카보닉언하이드라제 길항제 	멜라토닌 메타졸라미드	공유됨 공유됨
접착-관련 아노이키스 억제제	<ul style="list-style-type: none"> 인테그린 안정화제 인테그린 리간드 	테트라 요오도티로닌 피브리노겐, 피브로넥틴	외인성 외인성

[0055]

[0056] 하나의 구현예에서, 적어도 하나의 아노이키스 억제제는 Rho-연합된 키나제 억제제이고 이의 비제한적인 예는 Y-27632, GSK429286A 및 RKI-1447을 포함한다. 하나의 구현예에서, 적어도 하나의 아노이키스 억제제는 카스파제 억제제, 예를 들어, 범 카스파제 억제제 (예를 들어, Z-VAD-FMK), 카스파제 3 억제제 (예를 들어, Z-DEVD-FMK, Q-VD-OPh), 카스파제 8 억제제 (예를 들어, Z-IETD-FMK, Ac-LETD-CHO, Q-VD-OPh) 및/또는 카스파제 9 억제제 (예를 들어, Z-LEHD-CHO, Ac-LETD-CHO, Q-VD-OPh)이다. 하나의 구현예에서, 적어도 하나의 아노이키스 억제제는 시토크롬 C 억제제이고, 이의 비제한적인 예는 멜라토닌 및 메타졸라미드를 포함한다. 하나의 구현예에서, 적어도 하나의 아노이키스 억제제는 매트릭스 메탈로프로테아제 (MMP3) 억제제이고, 이의 비제한적인 예는 UK-356618이다. 하나의 구현예에서, 적어도 하나의 아노이키스 억제제는 ALK5 억제제이고 이의 비제한적인 예는 세리티닙, RepSox, 알레크티닙, AP26113, GW788388, SD-208 및 갈루니세르틴 (LY2157299)을 포함한다. 하나의 구현예에서, 적어도 하나의 아노이키스 억제제는 TNF α 억제제이고, 이의 비제한적인 예는 R-7050, 인플릭시맵, 골리무맵, 아달리무맵, 세르톨리주맵 및 에타너셉트를 포함한다. 하나의 구현예에서, 적어도 하나의

아노이키스 억제제는 TGF β 억제제이고, 이의 비제한적인 예는 프레솔리무맙, 및 TGF β 경로 신호 전달의 억제제, 예를 들어, 세리티닙, RepSox, 알레크티닙, AP26113, GW788388, SD-208 및 갈루니세르틴 (LY2157299)을 포함한다. 하나의 구현예에서, 적어도 하나의 아노이키스 억제제는 산화 스트레스 감소제 (즉, 반응성 산소종 억제제)이고, 이의 비제한적인 예는 글루타티온, 글루타티온 에틸 에스테르, 메티오닌, 시스틴, 시스테인, 글루탐산 및 글라이신을 포함한다. 하나의 구현예에서, 적어도 하나의 아노이키스 억제제는 산화환원 완충제이고, 이의 비제한적인 예는 니아신, 니아신-관련 화합물, 칼시페롤스, 베타 카로틴 및 비타민 C를 포함한다. 하나의 구현예에서, 적어도 하나의 아노이키스 억제제는 접착-관련된 아노이키스 억제제이고, 이의 비제한적인 예는 피브리노겐, 피브로넥틴 및 테트라요오도티로닌을 포함한다. 하나의 구현예에서, 적어도 하나의 아노이키스 억제제는 Fas 및/또는 FasL 억제제이고, 이의 비제한적인 예는 트리요오도티로닌 및 테트라요오도티로닌을 포함한다. 하나의 구현예에서, 적어도 하나의 아노이키스 억제제는 Bax 억제제이고, 이의 비제한적인 예는 Bax 억제제-1 및 V5 펩타이드를 포함한다. 하나의 구현예에서, 적어도 하나의 아노이키스 억제제는 Apaf-1 억제제이고, 이의 비제한적인 예는 QM31 및 미노사이클린을 포함한다.

[0057] 다른 구현예에서, 세포는 2개 이상의 아노이키스 억제제와 함께, 예를 들어, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개 또는 10개의 아노이키스 억제제와 함께 배양한다. 임의의 상기 언급된 아노이키스 억제제는 조합하여 사용될 수 있다. 예를 들어, 하나의 구현예에서, 세포는 Rho-연합된 키나제 억제제 및 카스파제 억제제와 함께 배양한다. 또 다른 구현예에서, 세포는 Rho-연합된 키나제 억제제 및 MMP3 억제제와 함께 배양한다. 또 다른 구현예에서, 세포는 카스파제 억제제 및 MMP3 억제제와 함께 배양한다. 또 다른 구현예에서, 세포는 Rho-연합된 키나제 억제제, 카스파제 억제제 및 MMP3 억제제와 함께 배양한다. 또 다른 구현예에서, 세포는 Rho-연합된 키나제 억제제, 카스파제 억제제, MMP3 억제제 및 사멸 수용체 억제제 (예를 들어, TNF α 억제제, TNFR1 억제제, TGF β 억제제, ALK5/TGFBR1 억제제, Fas 억제제 또는 FasL 억제제)와 함께 배양한다. 또 다른 구현예에서, 세포는 키나제 억제제, 프로테아제 억제제, 스트레스 억제제, 사멸 수용체 억제제, 시토크롬 C 억제제 및 아노이키스 억제제 각각과 함께 배양하고, 이의 비제한적인 예는 표 1에 제시되고 상기 목록된 시약을 포함한다. 아노이키스 억제제의 다른 적합한 조합은 본원에 제공된 지침을 사용하여 결정될 수 있다 (예를 들어, 실시예 3-5를 참조한다).

[0058] 억제제는 전형적으로 환부 세포 샘플에서 세포의 양에 의존하여, 100,000 세포 당 0.001 내지 0.1 마이크로몰의 농도, 바람직하게 100,000 내지 10,000,000 세포 당 0.01 내지 0.1 마이크로몰의 농도로 배양 배지에 첨가한다.

[0059] 특정 구현예에서, 배양 배지에서 단일 아노이키스 억제제의 사용은 특정 세포 유형에 이득을 제공한다. 그러나, 특정 구현예에서, 임상 시험을 위해 샘플을 제조하기 위한 가장 최적의 조건을 제공하는 내인성, 외인성 및 아노이키스 억제 성분들을 조합하는 것이 이득이다. 항-아노이키스 성분들의 상기 조합이 상이한 환자 기원의 상당한 대다수의 표본으로부터 환부 세포의 이종성 집단이 생존 환부 세포의 임상 시험을 위해 적합하게 하는 것으로 관찰되었다. 각각의 환자 표본은 임의의 다수의 상이한 개체 또는 이전에 기재된 조합된 이유들 때문에 아노이키스를 진입할 수 있고, 각각은 신속하게 및 급작스럽게 표본이 임의의 종류의 생존 세포 시험에 대해 유용하지 않게 하는 능력을 갖는다. 아노이키스에 대한 이들 경로 조합의 유의적 약화를 통해서만이, 이종성 환부 세포의 샘플은 생존 세포 시험을 위해 조직으로부터의 제거시 안정해질 수 있다. 임상 시험은 시험을 위해 받은 대부분의 샘플이 신뢰할 수 있게 담당자에게 이들의 환자의 치료를 가이드하기 위한 시험 결과 정보를 제공할 것을 요구한다. 본 발명은 상기 요건을 성취하는 수단을 제공한다.

[0060] 항-아노이키스 대기 조건

[0061] 시험관내 배양된 1차 세포가 아노이키스에 진입할지에 영향을 주는 또 다른 인자는 세포가 배양되는 대기 조건인 것으로 밝혀졌다. 본 발명에 이르러, 2 % 초과 및 20 % 미만의 산소의 조건하에서 배양과 함께 배지에서 적어도 하나의 아노이키스 억제제 사용의 조합이 생존 환부 세포의 샘플에서 1차 세포의 아노이키스를 추가로 억제하는 작용을 하는 것으로 밝혀졌다. 특정 기작에 국한되는 것 없이, 2 % 초과 및 20 % 미만의 산소의 대기 조건에서 세포의 배양이 산화 스트레스와 연관된 아노이키스를 감소시키는 것으로 사료된다. 또 다른 구현예에서, 세포 샘플은 세포 증식에 도움이 되는 해당과정 및 미토콘드리아 기능을 허용하는 대기 조건에서 유지시킨다. 보다 바람직한 구현예에서, 세포 배양은 산화 스트레스와 연관된 아노이키스에서의 감소 및 세포 증식에 도움이 되는 산소에 대한 요구에 균형을 맞추는 대기 조건에서 유지시킨다. 가장 바람직한 구현예는 6 % - 17 % 산소를 포함하는 대기 조건에서 세포 샘플을 유지시키는 것이고, 범위 변화는 세포가 생체내 (1-5 % 산소) 경험하는 저산소 조건과 대기 (20 % 산소)에 노출되는 경우 세포가 경험하는 정상산소 조건 사이에 있다. 또 다른 구현예에서, 세포는 10 % 산소를 포함하는 조건하에서 배양한다. 또 다른 구현예에서, 세포는 6-9 % 산소, 9-11 % 산소, 8-12 % 산소, 7-13 % 산소, 6-14 % 산소, 11-13 % 산소, 13-15 % 산소, 15-17 %, 9-15 % 산소, 6

% 산소, 7 % 산소, 8 % 산소, 9 % 산소, 11 % 산소, 12 % 산소, 13 % 산소, 14 % 산소, 15 % 산소, 16 % 산소 또는 17 % 산소를 포함하는 조건하에서 배양한다. 또 다른 구현예에서, 세포는 1-5 % 산소를 포함하는 조건하에서 배양한다.

[0062] 특정 구현예에서, 세포는 상이한 기간 동안 2개 이상의 상이한 대기 조건하에서 배양한다. 예를 들어, 세포는 처음에 6-17 % 산소 (예를 들어, 10 % 산소)를 포함하는 조건하에서 배양될 수 있고 이어서 1-5 % 산소를 포함하거나 17-19 % 산소를 포함하거나 18-20 % 산소를 포함하거나 20 % 산소를 포함하는 조건하에서 배양될 수 있다.

[0063] 세포 배양을 위한 대기 조건 및 온도의 다른 양상은 전형적으로 포유동물 세포 (예를 들어, 인간 세포)의 배양을 위해 사용되는 것들이다. 예를 들어, 세포는 전형적으로 적어도 5 % 이산화탄소, 40 % - 100 %의 상대 습도 (RH) (예를 들어, 85 % RH)를 포함하는 대기 조건에서 및 37 °C의 온도에서 배양한다.

[0064] 아노이키스의 표면 부착 및 억제

[0065] 대부분의 비-형질전환된 및 많은 암 상피 세포 유형은 이들이 접착-관련된 아노이키스로 호칭되는 현상인 수화된 세포외 매트릭스 (ECM)와 접촉을 상실하는 경우 아노이키스를 진행한다. 상피 세포의 구조적 및 기능적 통합성의 유지는 표면 수용체의 상이한 유형을 포함하는 고도의 동력학적 세포-세포 및 세포-매트릭스 상호작용을 요구한다. 이들 수용체 중에는 카드헤린 및 인테그린과 같은 접착 분자가 있고, 이는 이웃하는 세포 상에 다른 세포 접착 수용체를 인지하고 이들과 상호작용하며 ECM의 성분에 결합함에 의해 주요 역할을 수행한다. 세포로의 기계적 앵커리지를 제공하는 것 뿐만 아니라, 이들 구조는 또한 기능적 중요성을 갖고; 이들은 생존 및 증식을 위해 중요한 ECM 및 이웃하는 세포로부터 신호를 전달한다. ECM의 조성, 패턴화 및 구조적 성질이 포유동물 세포의 생존력을 복구하고/하거나 확립하는데 중요한 것으로 입증되었다. 이들 접촉 또는 신호 또는 이들의 통합성의 감소 또는 상실은 흔하게 아노이키스를 개시한다.

[0066] 상피 세포의 아노이키스의 감소는, 특히 임상 시험 목적을 위해 생존 환부 세포의 균일한 샘플을 제조하는데 중요하다. 접착-관련된 아노이키스는 이웃하는 조직 세포와 매트릭스 (ECM)로부터 탈착하게 되는, 상피 세포와 같은 앵커리지-의존성 세포에 의해 생체내 개시되는 아노이키스 형태이다. 일반적으로, 세포는 세포와 ECM 간 뿐만 아니라 근접 세포 간 소통이 성장 또는 생존을 위한 필수 신호를 제공하기 때문에 이들이 속하는 조직에 밀접하게 유지된다. 세포가 ECM으로부터 탈착되는 경우, 정상 세포-매트릭스 상호작용이 상실되고 이는 내인성 및 외인성 아노이키스의 형성을 유도한다. 이들의 특성에 의해, 환부 세포는 흔히 이종성 부착 안정성을 갖는다. 암에서, 불량한 부착은 병리학적으로 고도의 치명적 형태의 질환인 전이로서 특징화된다. 필요한 임상 시험을 위해 환부 세포의 균일한 샘플의 제조는 이들의 천연 환경에서 이들의 ECM으로부터 이들의 제거를 포함하고, 이에 따라 아노이키스를 유도할 수 있다.

[0067] 따라서, 본 발명의 방법의 다양한 구현예는 세포가 제거되는 ECM을 세포-세포 및 세포-ECM 접촉을 복구하여 아노이키스를 억제하거나 감소시키는 시험관내 ECM으로 대체하였다. 추가로, 하나 이상의 성분은 배양 배지에 첨가되어 세포-세포 및/또는 세포-ECM 접착의 복구 및/또는 활성화를 촉진시키고 아노이키스를 차단한다.

[0068] 따라서, 본 발명의 방법의 특정 양태는 세포-세포 및 또는 세포-ECM 접착의 복구 및/또는 활성화를 촉진하고 아노이키스를 차단하는 적어도 하나의 성분을 포함하는 배양 배지의 사용을 포함한다. 상기 형태의 아노이키스 활성을 차단하는 접착 경로 활성화제는 제한되지 않지만 Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , 트리요오도티로닌, 테트라요오도티로닌, 페투인, 용액 형태 (예를 들어, 피브리노겐) 또는 세포외 매트릭스 성분의 코팅, 또는 피브로넥틴, 콜라겐, 라미닌, 비트로넥틴, 세포내 CAM, 혈관 CAMS, MAdCAMS, 글리코사아미노글리칸, 프로테오글리칸 또는 이의 유도체 또는 펩타이드와 같은 상기 성분들의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택될 수 있다. 인테그린 붕괴 후 병소 접착 키나제 활성을 증가시키고 PTEN 아노이키스 촉진에 대응하는 EGF와 같은 성장 인자들은 또한 본 발명에 포함된다.

[0069] 특정 구현예에서, 아노이키스를 억제하는 2개 이상의 상기 성분들은 배양 배지에 사용될 수 있다. 예를 들어, 하나의 구현예에서, 생존 환부 세포의 샘플은 적어도 하나의 내인성 아노이키스 억제제 및 적어도 하나의 외인성 아노이키스 억제제를 포함하는 배지에서 배양한다.

[0070] 추가의 구현예에서, 생존 세포 샘플은 배양 용기 (예를 들어, 웰로 나누어진 배양 플레이트, T25, T75, 및 T150 플라스크, 다중수준 배양 용기 등)와 같은 배양 표면 또는 세포외 매트릭스를 통한 시험 표면 (예를 들어, 바이오센서 표면)에 부착된다. 다른 구현예에서, 생존 세포 샘플은 수화된 ECM을 통해 세포 배양 용기 또는 시험 표면으로 부착되고, 여기서, ECM은 충분한 물을 유지하여 ECM이 완전히 습윤화되고 사용전 결코 탈수되지 않도록

록 한다. 추가의 구현예에서, 생존 세포 샘플은 수화되고 폴딩된 ECM을 통한 세포 배양 용기 또는 시험 표면에 부착되고, 이에 의해 ECM은 정돈되고, 구조화되고 재현가능한 정렬의 이의 단백질 성분(들)으로 구성된다. 구현예에서, 생존 세포의 세포 샘플은 특이적 인테그린에 의해 인지될 수 있고 있거나, 예를 들어, 카드헤린 또는 어드헤린을 통한 세포-세포 상호작용을 촉진할 수 있는 이들 단백질의 천연 생체내형 구조물을 유지하기 위해 제조된 원섬유 및 친수성 조합된 콜라겐 및 피브로넥틴 표면에 부착된다. 특정 구현예에서, 콜라겐 및 피브로넥틴은 친수성 원섬유로 형성되고 2개의 단백질 상호작용은 특이적 아미노산 서열 결합 부위로 구성된다. 구현예에서, 세포-ECM 부착은 콜라겐-라미닌 332 동시-구조물을 형성한다. 라미닌 332는 또한 라미닌 V로서 공지되어 있고 특정 구현예에서 배양 표면 상에 단일 ECM으로서 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, ECM으로 코팅될 표면은 플라스틱, 유리 또는 특히 골드 전극이 각인된 유리, 또는 티타늄 코팅된 플라스틱, 또는 광학 활성 금속 코팅된 유리 또는 웨이브-가이드로 형성된 플라스틱, 골드 코팅된 유리이다. 다른 바람직한 구현예에서, ECM으로 코팅될 표면은 임상 시험 목적을 위한 바이오센서이다.

[0071] 표면 부착을 포함하는 구현예 각각에서, 표면 코팅은 당업자에게 공지된 표준 방법을 사용하여 제조한다. 예를 들어, 수화된 ECM 또는 수화되고 폴딩된 ECM을 제조하는 방법은 당업계에 널리 확립되어 있다 (문헌참조: 예를 들어, Anderson, D.G. et al. (2004) *Nat. Biotechnol.* 22:863-866; Flaim, C.J. et al. (2005) *Nat. Methods* 2:119-125; Falsey, J.R. et al. (2001) *Bioconjug. Chem.* 12:346-353; Kuschel, C. et al. (2006) *Biotechniques* 40:523-531; Reticker-Flynn, N.E. et al. (2012) *Nat. Commun.* 3-1122)

[0072] 다른 구현예에서, 표면으로의 세포 부착은 세포 부착의 수준이 세포에 스트레스를 주는 조건 또는 세포가 신호 전달 활성을 방해하는 세포 부착을 초래할 수 있는 아노이키스를 증가시키는 조건에 의해 유도되지 않도록 보장하기 위해 최적화된다. 다른 구현예에서, 표면으로의 세포 부착은 세포의 코팅 및 부착 기작이 목적하는 신호 전달 경로와 일치하도록 보장하기 위해 최적화된다.

[0073] 따라서, 특정 구현예에서, 임상 시험을 수행하기 위한 1차 세포를 제조하기 위한 본 발명의 방법은 세포 샘플을 수화된 세포의 기질 (ECM)을 포함하는 표면에 부착시키는 단계를 포함한다. 하나의 구현예에서, ECM은 피브로넥틴 및 콜라겐으로 이루어진다. 하나의 구현예에서, 폴딩된 ECM이 사용된다. 또 다른 구현예에서, 피브로넥틴 및 콜라겐은 원섬유성 및 친수성 표면을 포함한다. 하나의 구현예에서, ECM은 원섬유성 및 친수성 콜라겐-라미닌 332 (라미닌 V) 공동-구조물로 이루어진다. 또 다른 구현예에서, ECM은 라미닌 332 (라미닌 V)로 이루어진다. 본 발명은 임상 시험을 수행하기 위해 1차 세포를 제조하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 다음을 포함한다:

[0074] 수화된 세포의 매트릭스 (ECM), 또는 수화되고 폴딩된 ECM을 포함하는 바이오센서 표면에 생존 환부 세포의 샘플을 부착시키는 단계 (상기 ECM은 (i) 피브로넥틴 및 콜라겐; (ii) 콜라겐 및 라미닌 332 (라미닌 V) 또는 (iii) 라미닌 332 (라미닌 V)를 포함한다); 및

[0075] 생존 환부 세포의 샘플에 대해 바이오센서를 사용하여 임상 시험을 수행하는 단계.

[0076] 특정 구현예에서, 생존 환부 세포의 샘플은 상이한 기간에서 2개 이상의 상이한 표면에 부착될 수 있다. 예를 들어, 세포는 배양 플레이트, 배양 플라스크 또는 상이한 항-아노이키스, 스트레스-감소 ECM을 포함하는 다른 배양 용기와 같은 세포 표면에 초기에 부착되어 일정 기간 동안 배양될 수 있다. 이어서, 세포는 이 표면으로부터 탈착될 수 있으며 (예를 들어, 하기에 추가로 기재됨) 이후 임상 시험을 위해 바이오센서 표면과 같은 또 다른 표면에 부착될 수 있다. 이 바이오센서 표면은 또한 상기된 바와 같은 항-아노이키스, 스트레스-감소 ECM을 포함할 수 있다.

[0077] 배합시 다수의 배양 조건의 사용

[0078] 생체내 세포 생존 및 기능의 조절은 매우 복잡한 것으로 공지되어 있으며 안정한 세포 과정을 유지하기 위한 다중 신호 입력 및 반응에 의존한다. 이것은 특히 세포 미세환경이 세포에 미치는 영향에 대해 사실이다.

[0079] 실험실 세팅에서 인간 1차 세포를 배양하는 것은 실패 및 특히 환부 세포에 대해서는 고도의 재현성 있는 1차 조직 배양이 가능하지 않다는 만연된 사고방식을 특징으로 한다. 이러한 사고방식은 또한 지금까지 임의의 생존 1차 세포 기능적 임상 시험의 개발을 막아 왔다. 이 실패 이력에 비중을 두는 것은 생체의 생존 배양을 확립하기 위해 1차 세포가 요구되는 다중 신호 입력 및 반응을 처리할 필요성에 대한 고려가 부족했다는 것이었다. 상이한 환부 세포가 생체외에서 배양될 때, 이들은 이들의 천연 조절 제어 신호 전달이 중단됨에 따라 아노이키스를 겪게될 것이다. 임상 시험을 위해 환부 세포를 제조하기 위한 이러한 조절 제어를 극복하기 위해, 방법의 조합이 조절 신호 유지 요건을 충족시키고 아노이키스를 방지하기 위해 필요하다. 1차 세포를 제

조하기 위한 본 발명의 방법은 다수의 상이한 배양 배지 및/또는 임상 시험을 위한 1차 세포를 제조하기 위한 조합에 사용되는 배양 조건의 사용을 포함한다. 상이한 배양 배지 및/또는 배양 조건의 조합 사용은 1차 세포의 제조를 추가로 향상시켜 충분한 기간 내에 충분한 수의 세포가 수득되도록 하면서 세포의 생리학적 및 계층 특징을 유지함으로써 임상 시험에서 신뢰할 수 있는 결과를 제공한다.

[0080] 특정 구현예에서, 세포 샘플은 먼저 아노이키스 억제제(들)를 포함하는 배지에서 배양한 다음 이후 노이키스 억제제(들)를 포함하지 않는 배지에서 배양한다. 특정 구현예에서, 세포 샘플은 먼저 2 % 초과 및 20 % 미만의 산소 (예를 들어, 3 % 초과 및 19 % 미만의 산소, 6-17 %의 산소, 10 % 산소 또는 2 % 초과 및 20 % 미만으로 본원에 기재된 임의의 다른 대기 조건)를 포함하는 대기에서 유지되고, 이후 20 % 산소를 포함하는 대기에서 유지된다. 특정 구현예에서, 세포 샘플의 기간은 아노이키스 억제제(들)를 포함하는 배지에서 1-10시간, 10-20시간, 20-30시간, 30-40시간, 40-50시간 또는 50시간 이상 동안 배양된다. 예를 들어, 세포 샘플은 아노이키스 억제제(들)를 또한 포함하는 배지에서 적어도 12시간, 적어도 24시간, 적어도 48시간, 적어도 96시간, 적어도 120시간, 24-48시간, 24-96시간, 또는 24-120시간 동안 배양될 수 있다. 특정 구현예에서, 세포 샘플의 기간은 2 % 초과 및 20 % 미만의 산소 범위를 갖는 대기에서 1-10시간, 10-20시간, 20-30시간, 30-40시간, 40-50시간, 또는 50시간 이상의 범위로 유지된다. 예를 들어, 세포 샘플은 2 % 초과 및 20 % 미만의 산소를 갖는 대기에서 적어도 12시간, 적어도 24시간, 적어도 48시간, 적어도 96시간, 적어도 120시간, 24-48시간, 24-96시간, 또는 24-120시간 동안 유지될 수 있다.

[0081] 다른 구현예에서, 세포 샘플은 하나의 배양 용기로부터 또 다른 용기로 세포를 전달한 후 일정 기간 동안 2 % 초과 및 20 % 미만의 산소를 포함하는 대기에서 유지시킨다. 특정 구현예에서, 세포 샘플의 특정 기간은 하나의 배양 용기로부터 또 다른 용기로 세포를 전달한 후 2 % 초과 및 20 % 미만의 산소를 포함하는 대기에서 1-10시간, 10-20시간, 20-30시간, 30-40시간, 40-50시간 또는 50시간 이상의 범위로 유지된다. 바람직한 구현예는 세포를 하나의 배양 용기로부터 또 다른 용기로의 전달 후 6 % - 17 %의 산소를 포함하는 대기 조건에서 세포 샘플을 배양하는 것이다. 특정 구체 예에서, 세포 샘플을 1-5 %, 6-9 %, 9-11 %, 8-12 %, 7-13 %, 6-14 %, 11-14 %, 14-17 % 또는 17 %-20 % 사이의 범위인 산소 또는 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 % 또는 17 % 산소의 조건을 포함하는 새로운 배양 용기로의 전달 후 유지된다. 구현예에서, 세포 샘플은 먼저 하나의 배양 용기로부터 또 다른 배양 용기로 세포를 전달한 후 2 % 초과 및 20 % 미만의 산소를 포함하는 대기에서 유지하고 이후 20 % 산소를 포함하는 대기에 위치시킨다.

[0082] 다른 구현예에서, 세포 샘플은 하나의 배양 용기로부터 또 다른 용기로의 세포의 전달 후 특정 기간 동안 아노이키스 억제제(들)를 포함하는 배지에서 배양한다. 특정 구현예에서, 세포 샘플의 특정 기간은 하나의 배양 용기로부터 또 다른 용기로 세포를 전달한 후 아노이키스 억제제를 포함하는 배지에서 1-10시간, 10-20시간, 20-30시간, 30-40시간, 40-50시간 또는 50시간 이상의 범위로 배양한다. 구현예에서, 세포 샘플은 먼저 하나의 배양 용기로부터 또 다른 배양 용기로 세포를 전달한 후 아노이키스 억제제(들)를 포함하는 배지에서 배양하고, 이후 아노이키스 억제제(들)를 포함하는 배양 배지에 위치시킨다.

[0083] 특정 구현예에서, 세포는 다양한 성분으로 보충된 기본 배지에서 배양한다. 하나의 구현예에서, 기본 배지는 무혈청 기본 배지이다. 또 다른 구현예에서, 기본 배지는 본원에 기재된 바와 같은 아노이키스 억제제(들)를 포함하고, 하기 기재된 바와 같은 부가적인 기능을 수행하는 추가 성분을 함유할 수 있다. 본원에 기재된 성분의 첨가에 의해 변형될 수 있는 무혈청 기본 배지의 비제한적인 예는 DMEM, F12, 50 % DMEM/50 % F12, MEGM, MCDB-170을 포함한다.

[0084] 또 다른 구현예에서, 세포는 성장, 분열 또는 세포 증식을 촉진하는 세포 순환을 촉진하는 적어도 하나의 성분을 포함하는 무혈청 배양 배지에서 배양한다. 이러한 유형의 성분을 함유하는 배지는 아노이키스 억제제(들)를 함유하는 동일한 배지이거나 세포를 전달한 상이한 배지일 수 있다. 성장, 분열 또는 세포 증식을 촉진하는 세포 순환을 촉진하는 이러한 성분의 비제한적인 예는 종양 미세환경과 관련된 성장 인자, HGF, FGF (유형 1-4), 엑소솜, miRNA, 다른 소형 비-단백질 암호화 RNA, 보다 긴 비-단백질 암호화 RNA, 호르몬, IGF, VEGF, EGF, 인터류킨, 사이토킨, 케모킨 및 예를 들어, 환부 세포에서 및 이의 주변에 의해 생성되는 자가분비 (autocrine) 또는 주변분비 인자 (paracrine factor)로 공지될 수 있는 다른 인자를 포함한다.

[0085] 또 다른 구현예에서, 배양 배지는 하나의 용기로부터 또 다른 용기로의 세포 배양물의 완전한 전달을 촉진시키기 위해 접착 활성의 일시적 역전을 촉진시키는 적어도 하나의 성분으로 구성된다. 이러한 유형의 성분을 함유하는 배지는 아노이키스 억제제(들)를 함유하는 동일한 배지이거나 세포를 전달한 상이한 배지일 수 있다. 하나의 용기로부터 또 다른 용기로 세포 배양물의 완전한 전달을 촉진시키기 위한 접착 활성의 일시적인 역전을

축진시키는 이러한 성분의 비제한적인 예는 비-효소 및 효소 처리, Ca^{2+} , Mg^{2+} 및/또는 Mn^{2+} 킬레이트화제, 예를 들어, EGTA, EDTA, 및 당업계에 실시된 것으로 공지된 다른 2가 금속 이온 킬레이트화제, 및 추가로 디스파제, TrypLE, 트립신, 아쿠타제, 아쿠맥스, 콜라겐아제, 하이알루로니다제, 엘라스타제, 트립신 억제제, STEMxyme, 프로나제, 데옥시리보뉴클레아제를 포함한다. 상이한 온도에서 상이한 시간 양 동안 적용된 상이한 농도에서 이 그룹의 구성원의 조합이 본 구현예에 포함된다.

[0086] 다른 구현예에서, 배양 배지는 환부 세포의 생리학적 또는 계능 특징을 보존하는 적어도 하나의 성분을 포함하는 무혈청 배양 기본 배지이다. 이러한 유형의 성분을 함유하는 배지는 아노이키스 억제제(들)를 함유하는 동일한 배지이거나 세포를 전달한 상이한 배지일 수 있다. 환부 세포의 생리학적 또는 계능 특징을 보존하는 상기 성분의 비제한적인 예는 필수 및 비필수 아미노산, 비타민, 특히 비타민 B, 희귀 필수 금속, pH 완충제(들) (예를 들어, HEPES, NaH_2PO_4 , NaH_2PO_4 로도 공지된 N-[2-하이드록시에틸] 피페라진-N'-(2-에탄설포산)), 염 (Na^+ , K^+ , Fe, Zn, Cu, Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Cl, CO_3 , SO_4), 셀레나이트, 실리카이크, 글루코스 또는 당 또는 다른 생물학적 실제 탄소원, 지질, 지방산, 예를 들어, 리포산, 피루베이트, BSA (예를 들어, Albumax 또는 기타 혈청 알부민과 같은 시약도 포함), 트랜스페린, 성장 인자, 케모킨, 사이토킨, 미토겐, 에탄올아민, 포스포에탄올아민, 알부민, 호르몬 (예를 들어, 프로게스테론, 테스토스테론, 에스트라디올, 특히 17β -에스트라디올, 하이드로코르티손, 인슐린), 푸트레신, 피루베이트, 티미딘, 리놀레산, 폴산, 폴린산, 콜린, 피리독살 하이드로클로라이드, 비오틴, 하이포크산틴, 퓨린 및 퓨린 유도체, 피리미딘 및 피리미딘 유도체, 항생제, 항균제, 항진균제를 포함한다. 질병 상피 세포 성장을 지지하기 위해 배지 성분을 선택할 수 있으며 상기 선택된 성분은 건강한 질병이 없는 상피 세포의 성장으로부터 분리를 유도할 수 있다. 성장 인자, 사이토킨 및 케모킨은 환부 세포 샘플에서 세포의 양에 따라, 100,000 세포 당 0.001-0.1 nmol, 바람직하게 100,000-1,000,000 세포 당 0.01-0.1 nmol로 첨가된다.

[0087] 임상 시험을 위해 인간 대상체로부터 수득한 생존 환부 세포의 샘플을 제조하기 위한 본 발명의 조합 방법의 하나의 구현예에서, 상기 방법은 다음을 포함한다:

[0088] 6-17 % 산소 (예를 들어, 10 % 산소)를 포함하는 조건하에서 내인성 아노이키스 경로의 적어도 하나의 억제제 및 외인성 아노이키스 경로의 적어도 하나의 억제제를 포함하는 배지에서 인간 대상체로부터 수득된 생존 환부 세포의 샘플을 배양하는 단계; 및

[0089] 생존 환부 세포의 샘플에 대해 임상 시험을 수행하는 단계.

[0090] 임상 시험을 위해 인간 대상체로부터 수득된 생존 환부 세포의 샘플을 제조하기 위한 본 발명의 조합 방법의 또 다른 구현예에서, 상기 방법은 다음을 포함한다:

[0091] 예를 들어, 적어도 1시간 (예를 들어, 1-3시간, 3시간 또는 3시간 이하) 동안 6-17 %의 산소 (예를 들어, 10 % 산소)를 포함하는 조건하에서 적어도 하나의 분해 효소 및 적어도 하나의 아노이키스 억제제를 포함하는 배지에서 인간 대상체로부터 수득된 생존 환부 세포의 샘플을 배양하는 단계;

[0092] 예를 들어, 적어도 10시간, 또는 적어도 24시간, 또는 적어도 48시간 또는 적어도 96시간, 또는 적어도 120시간, 또는 24-48시간, 또는 24-96시간 또는 24-120시간 동안 6-17 % 산소 (예를 들어, 10 % 산소)를 포함하는 조건하에서 적어도 하나의 아노이키스 억제제를 포함하고 분해 효소가 없는 배지에서 샘플을 배양하는 단계; 및

[0093] 20 % 산소를 포함하는 조건하에서 아노이키스 억제제가 없는 배지에서 샘플을 배양하여 임상 시험을 위한 샘플을 제조하는 단계.

[0094] 임상 시험을 위해 인간 대상체로부터 수득된 생존 환부 세포의 샘플을 제조하기 위한 본 발명의 조합 방법의 또 다른 구현예에서, 상기 방법은 다음을 포함한다:

[0095] 6-17 % 산소 (예를 들어, 10 % 산소)를 포함하는 조건하에서 내인성 아노이키스 경로의 적어도 하나의 억제제 및 외인성 아노이키스 경로의 적어도 하나의 억제제를 포함하는 배지에서 인간 대상체로부터 수득된 생존 환부 세포의 샘플을 배양하는 단계;

[0096] 생존 환부 세포의 샘플을 수화된 세포의 매트릭스 (ECM)를 포함하는 표면에 부착시키는 단계 (상기 ECM은 (i) 피브로넥틴 및 콜라겐; (ii) 콜라겐 및 라미닌 332 (라미닌 V) 또는 (iii) 라미닌 332 (라미닌 V)로

이루어진다).

- [0097] 하나의 구현예에서, 생존 환부 세포의 샘플이 부착된 표면은 바이오센서 표면이며, 상기 방법은 생존 환부 세포의 샘플에 대해 바이오센서를 사용하여 임상 시험을 수행하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0098] 임상 시험을 위해 인간 대상체로부터 수득된 생존 환부 세포의 샘플을 제조하기 위한 본 발명의 조합 방법의 또 다른 구현예에서, 상기 방법은 다음을 포함한다:
- [0099] 6-17 % 산소 (예를 들어, 10 % 산소)를 포함하는 조건하에서 적어도 하나의 아노이키스 억제제를 포함하는 배지에서 인간 대상체로부터 수득된 생존 환부 세포의 샘플을 배양하는 단계;
- [0100] 피브로넥틴 및 콜라겐으로 이루어진 수화된 세포외 매트릭스 (ECM)를 포함하는 표면으로 생존 환부 세포의 샘플을 부착시키는 단계; 및
- [0101] 6-17 % 산소 (예를 들어, 10 % 산소)를 포함하는 조건하에서 적어도 하나의 아노이키스 억제제를 포함하는 배지에서 표면에 부착된 샘플의 배양을 계속하는 단계.
- [0102] 하나의 구현예에서, 상기 샘플은 내인성 아노이키스 경로의 적어도 하나의 억제제 및 외인성 아노이키스 경로의 적어도 하나의 억제제로 배양된다. 하나의 구현예에서, 생존 환부 세포의 샘플이 부착된 표면은 바이오센서 표면이며, 상기 방법은 생존 환부 세포의 샘플에 대해 바이오센서를 사용하여 임상 시험을 수행하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0103] 임상 시험을 위해 인간 대상체로부터 수득된 생존 환부 세포의 샘플을 제조하기 위한 본 발명의 조합 방법의 또 다른 구현예에서, 상기 방법은 다음을 포함한다:
- [0104] 3시간 이하 동안 6-17 % 산소 (예를 들어, 10 % 산소)를 포함하는 조건하에서 적어도 하나의 분해 효소 (예를 들어, 콜라겐아제 및 하이알루로니다제) 및 적어도 하나의 아노이키스 억제제 (예를 들어, 내인성 아노이키스 억제제(들) 및/또는 외인성 아노이키스 억제제(들))를 포함하는 배지에서 인간 대상체로부터 수득된 생존 환부 세포의 샘플을 배양하는 단계;
- [0105] 인간 콜라겐 I 및 인간 피브로넥틴으로 이루어진 수화되고 폴딩된 세포외 매트릭스 (ECM)를 포함하는 세포 배양 용기 표면 상에 생존 환부 세포의 샘플을 분주하고, 6-17 % 산소 (예 : 10 % 산소)를 포함하는 조건하에서 적어도 하나의 아노이키스 억제제 (예를 들어, 내인성 아노이키스 억제제(들) 및/또는 외인성 아노이키스 억제제(들))를 포함하는 배지에서 배양하는 단계; 및
- [0106] 생존 환부 세포에 대해 임상 시험을 수행할 때까지 또는 생존 환부 세포의 50 %-80 %의 컨플루언시가 달성될 때까지 무혈청 기본 배지 중에서 샘플을 배양하는 단계.
- [0107] 이 조합 방법은 마지막 배양 단계 후에 추가 단계를 포함할 수 있다. 예를 들어, 하나의 구현예에서, 1차 세포는, 세포의 접착 성분을 손상시키지 않으면서 생존 환부 세포의 표면으로의 부착을 역전시키는 조건하에서 10분 이하 동안 접착 활성의 일시적인 역전을 촉진시키는 적어도 하나의 성분 (예를 들어, 최소 효소 및 2가 금속 이온 접합 배지)을 포함하는 배지에서 세포의 배양에 의해 수거된다. 또 다른 구현예에서, 조합 방법은 수화되고 폴딩된 세포외 매트릭스 (ECM) (예를 들어, 인간 콜라겐 I 및 인간 피브로넥틴으로 이루어진)를 포함하는 표면 (예를 들어, 제2 배양 용기 또는 바이오센서 표면)으로의 수거된 세포의 전달 및 적어도 1-8시간 동안, 예를 들어, 유의적 부착 및 스프레딩이 관찰될 때까지 6-17 % 산소 (예를 들어, 10 % 산소)를 포함하는 조건하에서 적어도 하나의 아노이키스 억제제를 포함하는 배지에서의 배양을 추가로 포함한다.
- [0108] 임상 시험을 위한 세포를 제조하기 위한 본 발명의 방법에 따라 1차 세포를 배양한 후, 상기 방법은 또한 환부 세포 집단의 동정 및 특성확인을 포함할 수 있다. 하나의 구현예에서, 예를 들어, FACS 또는 qPCR 방법에 의해 환부 세포 집단은 표 2에 열거된 것과 같은 특정 마커의 검출에 의해 동정 및/또는 특성확인된다. 추가적으로 또는 대안적으로, 환부 세포 집단은, 예를 들어, 바이오센서를 사용하여 접착 및/또는 세포 신호 전달 경로 활성을 시험하여 동정 및/또는 특성확인될 수 있다.
- [0109] 세포 샘플 및 이의 초기 제조
- [0110] 본 발명의 방법은 다양한 1차 세포, 특히 1차 인간 세포, 특히 인간 대상체로부터의 생존 환부 세포에 적용될 수 있다. 구현예에서, 세포는 종양 샘플로부터의 암 세포이다.
- [0111] 구현예에서, 세포 샘플은 코어 니들 생검, 미세 니들 흡인, 진공-보조 코어 생검, 이미지-안내된 코어 니들 생

검, 수술 생검, 외과 절제술 또는 임의의 기타 적합한 의료 절차로부터 얻은 새로운 고체 암 조직 표본으로부터 추출한다.

- [0112] 구현예에서, 세포 샘플은 환부의 또는 정상의 임의의 생물학적 조직 또는 유체 유형으로부터 얻어진다.
- [0113] 바람직한 구현예에서, 환부 상피 세포는 유방 조직, 위 조직, 결장/장 조직, 폐 조직, 머리 조직, 목 조직, 이 하선 조직, 난소 조직, 자궁 조직, 경부 조직, 전립선 조직, 췌장 조직, 신장/콩팥 조직, 또는 골 및/또는 골수로부터 유도될 수 있다. 특정 구현예에서, 조직은 정형 유방암 병리학 유형을 갖는 환자 - 예를 들어, 임상 병리학적 마커에 의해 기재된 환자 -로부터 유도된다: ER+/HER2-, ER+/HER2+, ER-/HER2+, ER-/HER2-
- [0114] 구현예에서, 상이한 성분 또는 상이한 농도의 성분으로 구성된 배양 배지가 세포 제조의 상이한 단계에서 사용된다. 구현예에서, 세포 샘플은 1개, 2개, 3개 또는 4개 또는 그 이상의 상이한 배양 배지를 사용하여 제조된다. 구현예에서, 세포 샘플은 세포 제조의 상이한 단계에서 상이한 농도의 산소로 구성된 대기 조건에서 유지된다. 구현예에서, 1개, 2개, 3개, 4개 또는 그 이상의 상이한 대기 조건이 세포 제조의 상이한 단계에서 사용된다. 다른 구현예에서, 상이한 배양 배지, 및 아노이키스 억제제, 및 대기 조건 및 부착 조건은 임의의 조합으로 함께 사용된다.
- [0115] 환부 세포 샘플을 제조하기 위해, 조직 표본은 전형적으로 먼저 작은 조각으로 기계적으로 나누고, 아노이키스를 유발하는 것 없이, 세포 표면 접촉 분자 손상 없이 또는 세포사의 다른 비-아노이키스 수단 없이 조직을 분해하는 것으로 알려진 효소 제제 (즉, 분해 효소)를 함유하는 분해 배지에 위치시킨다.
- [0116] 따라서, 특정 구현예에서, 대상체로부터 샘플을 수득한 후에, 생존 환부 세포의 샘플을 일정한 기간 동안 하나 이상의 효소 제제를 포함하는 분해 배지와 접촉시키고, 여기서, 상기 분해 배지는 아노이키스를 유발하는 것 없이, 세포 표면 접촉 분자 손상 없이 또는 세포사의 비-아노이키스 수단 없이 조직을 분해한다. 효소 제제는 다음의 비 한정적인 예로부터 선택될 수 있다: 임의의 공지된 유형의 콜라겐아제, 하이알루로니다제, 파파인, 디스파제, 엘라스타제, 트립신 및 이들의 임의의 조합. 한 구현예에서, 분해 배지는 콜라겐아제와 히알루로니다제의 혼합물을 포함한다. 조합으로 사용되는 경우, 효소 제제는 수율을 최적화하고 세포에 대한 손상을 감소시키기 위해 상이한 비율로 사용될 수 있다. 조직 표본은 몇분에서 며칠까지를 포함하여 상이한 기간 동안 상기 제제 중 어느 하나로 구성된 분해 배지에 위치할 수 있다. 가장 바람직한 구현예에서, 효소 제제는 효소에 대한 세포의 노출 시간을 제한하고 생존 세포의 이종성 집단의 수율을 최적화하도록 선택된다.
- [0117] 특정 구현예에서, 분해 배지는 적어도 하나의 아노이키스 억제제로 보충된다. 바람직한 구현예는 내인성 아노이키스 경로 유도를 지시하는 적어도 하나의 아노이키스 억제제 및 외인성 경로 유도를 지시하는 적어도 하나의 억제제로 분해 배지를 보충하는 것이다. 분해 배지는 적어도 하나의 아노이키스 억제제로 보충될 수도 있다. 추가의 구현예는 추출 공정 동안 연속적 또는 간헐적인 기반 상에 임의의 아노이키스 억제제 또는 아노이키스 억제제의 조합을 사용하는 것이다. 한 구현예에서, 대상체로부터 조직 샘플을 수득한 후, 세포는 바람직하게 2 % 초과 및 20 % 미만의 산소 (보다 바람직하게 6-17 % 산소, 더욱 바람직하게 10 % 산소)의 조건하에서 적어도 하나의 분해 효소 (예를 들어, 콜라겐아제 및 히알루로니다제) 및 적어도 하나의 아노이키스 억제제를 함유하는 배지에서 배양된다. 세포를 이 배지에서 특정 기간 동안 (예를 들어, 적어도 1시간, 적어도 2시간, 적어도 3시간 또는 1시간 내지 5시간 또는 3시간 동안) 배양한 다음 세포를 동일한 배지 (즉, 아노이키스 억제제(들)를 포함함)에서 그러나 분해 효소 없이 배양한다.
- [0118] 본 발명의 조성물 또는 방법을 실시할 때 목적하는 환부 세포가 존재하는지의 결정은 특정 세포 유형을 동정하는 마커의 발현을 조사함에 의해 이루어질 수 있다. 세포 유형 동정을 위한 마커의 비제한적인 예는 하기 표 2에 열거된 것들을 포함한다. 많은 경우에 샘플의 이질성이 존재함을 염두에 두면서 일반적인 세포 유형 또는 목적하는 질환에 특이적인 하나 이상의 마커를 사용하는 것이 가장 바람직하다. 마커 발현, 특성확인, 정량화 또는 존재여부는 예를 들어 FACS, 정량적 또는 다른 PCR 방법, 질량 분광분석법 또는 폴리아크릴아미드 겔에 의해 단백질, mRNA 수준, 다른 더 작은 RNA 수준 (예를 들어, siRNA, lncRNA, 마이크로RNA, 조절 RNA)을 조사함에 의해 이루어질 수 있다.

표 2:

1 차 세포 샘플에서 세포동정을 위한 예시적 마커

마커 명칭	세포 유형	마커 명칭	세포 유형
ESR1	질환	CD49F/ ITGA6	줄기, 상피
PGR	질환	클라우딘 4	줄기, 중간엽상피
HER2	질환	MME/CD10	내강상피
케라틴 8, 18, 19 베타-카테닌	내강 상피	CYP2b7P1, TFF1, AGR3, FOXA1	ER+ 유방질환상피, 질환
케라틴 5, 14	기저 상피	평활근액틴, CALLA	Myo-상피
E-카드헤린, EpCam	상피	A2ML, FABP7, ACE2, HORMAD1	3 중음성 암 또는 질환
ErbB 패밀리	질환	TFF1	질환
IGFr, c-myc, VEGFr	질환	K19, CD44	줄기, 질환

[0119]

[0120]

세포의 형질전환은 본 발명과 무관한 다른 연구 또는 상업적 목적을 충족시키기 위해 특정 1차 세포 물질로 작업하는 것이 바람직할 수 있다. 1차 세포의 형질전환은 잠재적으로 생체내 종양 기능 활성을 나타내지 않는 세포 상태를 생성할 수 있기 때문에, 본 발명은 생체내 상태가 존재하지 않도록 세포의 유전적, 후생적 또는 질환 기능을 변형시키는 세포 형질전환은 배제한다.

[0121]

또한, 마우스 모델에서의 종양원성은 단리된 세포 샘플에서 암세포의 존재를 결정하기 위한 표준이 되었다. 이러한 실험을 통해 얻은 상당한 노력과 지식에도 불구하고, 본 발명은 환자와 함께 임상적 치료에 유용하도록 내인성 종양 유형이 생체내 질환의 신뢰성 있는 반복 및 마우스에서의 성장의 일관성의 허용가능한 수준에 도달하지 않았음을 인식한다. 많은 종양 유형은 마우스에서 확실하게 성장하지 않고; 마우스는 세포 수준에서 기본적인 방식에서 인간과는 상이하고 (예를 들어, 중요한 단백질은 포유동물 둘 다에서 동일한 명칭을 가질 수 있지만 세포 경로의 기능을 변화시키고 영향을 주는 상이한 서열, 구조, 기능 및 위치를 갖는다); 충분한 마우스 이종 이식 물질을 수득하기 위해 충분한 시간은 유용한 임상 시험 결과에 대한 시간 요건을 충족하지 않는다. 이와 같이, 임상 시험을 위해 유용한 세포를 시험하거나 제공하기 위한 수단으로서 이종이식 모델은 본 발명의 범위 밖에 있다.

[0122]

하나의 구현예에서, 세포 샘플의 제조는 임상 시험이 수행되는 위치 (예를 들어, 실험실, 병원)에서 수행한다. 이와 같이, 세포는 대상체로부터 제거에서 본원에 기재된 세포 샘플 제조 방법의 개시까지 시간을 브릿지하는 널리 공지된 전달 배치에서 보존될 수 있다. 또 다른 구현예에서, 표본 수거 키트로 표본의 수송을 요구하는 세포 샘플의 제조는 표본이 환자로부터 제거되는 위치와는 상이한 위치에서 수행한다. 세포 샘플이 제조될 위치로 표본을 수송하기 위해 요구되는 시간은 1-36시간 및 36시간 초과 범위일 수 있다.

[0123]

배양 배지의 제조

[0124]

본 발명의 방법에 사용하기 위한 배양 배지는 성분들이 목적하는 농도로 기본 배지에 첨가되는 표준 방법에 의해 제조될 수 있다. 본 발명에 사용하기 위한 배양 배지의 제조는 수성 또는 유기 용액 중에서 액체 또는 고체 형태로 (바람직하게 0.3 % 이하의 최종 유기 용매 조성) 개별 성분들의 첨가에 의해 수행될 수 있다. 성분들은 제제의 저장 및 용이함 및 균일함을 위해 불렛 농축된 스톱 용액을 제조하기 위해 작동 배지의 최종 제조 전에 배합될 수 있다. 본 발명의 조성물 또는 방법의 실시를 위해 불렛 농축된 스톱 용액을 사용하는 경우에, 시약은 바람직하게 수성 용해도 수준에 의해 배합되고, 즉, 염 및 보다 수용성 성분들은 수성 불렛 유형으로서 저장되고 덜 수용성의 소수성 성분은 에탄올, 디메틸포름아미드, 및/또는 디메틸설폭사이드 스톱으로서 저장된다. 비-단백질성 성분들의 스톱 용액을 포함하는 조성물은 이들의 유용한 수명을 연장하기 위해 밀봉된 빛-차단 컨테이너에서 이상적으로 -30℃ 내지 -80℃에서 저장될 수 있다.

[0125]

하나 이상의 아노이키스 억제제를 포함하는 (임의로 상기된 바와 같은 다른 성분을 포함하는) 배양 배지는 세포

에 대한 잠재적 아노이키스 효과를 추가로 감소시키기 위해 10 % O_2 , 5 % CO_2 , 37 °C의 환경 조건하에서 위치시킴에 의해 생존 질환 세포의 샘플 상으로 적용하기에 앞서 추가로 조건화될 수 있다.

[0126] 모든 구현예에서, 배지는 멸균 또는 필수적으로 무균 형태로 사용된다. 상기 형태는 당업자에게 공지된 다양한 방법에 의해 생성될 수 있지만 바람직하게 조성물 및 또는 개별 성분들에게 비-파괴적인 방식으로 수행된다. 예를 들어, 바람직한 방법은 낮은 단백질-결합 막 필터 0.1-1.0 마이크로미터 공극 크기를 사용한 필터 멸균이다.

[0127] 당업자에게 자명한 구현예에서, 소정의 성분의 농도는 포함된 표에 열거된 범위를 넘어서 증가되거나 감소될 수 있고 상기 증가된 또는 감소된 농도의 효과는 통상의 경험적 실험을 사용하여 결정될 수 있다. 임의의 특정 환부 세포 또는 조직 유형에 대한 본 배지 제형의 최적화는, 예를 들어, 적정, 첨가, 결실 또는 실험의 디자인 (DOE) 또는 이들의 조합과 같은 경험적 접근법을 사용하여 수행될 수 있다.

[0128] 배양 조건의 최적화

[0129] 배지의 조성, 사용되는 배지 성분의 농도, 시간의 길이, 배양 배지 또는 대기 조건, 적용되는 조건을 프로세싱하는 스테이지/단계, 사용되는 상이한 유형의 배양 배지 또는 세포가 부착되는 표면의 유형을 포함하는 세포 제조 조건을 최적화하기 위해, 일련의 실험을 수행하여 세포 증식율, 세포 샘플 중 생존 세포의 유형, 세포 샘플 결과 중 세포 유형의 비율, 세포가 표면으로 부착되었는지의 여부, 세포의 생존율, 세포의 미토콘드리아 활성, 또는 이들 조건의 임의의 조합하에 세포 제조 결과의 임의의 다른 측정을 평가할 수 있다. 이들 실험으로부터의 결과는 특정 임상 시험 또는 질환 또는 세포 유형 또는 조직 유형의 요건을 위해 최적인 세포 제조 조건을 선택하기 위해 사용될 수 있다.

[0130] 다른 적합한 최적화 접근법 및 분석은 본원에 주어진 가이드에 의해 당업자에게 매우 자명하다.

[0131] 조성물 및 키트

[0132] 본 발명의 방법에 사용하기 위한 조성물, 및 본 발명의 방법의 수행을 위한 키트가 또한 포함된다.

[0133] 하나의 구현예에서, 본 발명은 생존 환부 세포의 단리 및 1차 세포를 제조하는 방법의 수행을 위해 적합한 키트를 제공한다. 상기 키트는 본원에 기재된 대기 조건을 위한 지침서 및 ECM 성분을 포함하는 배양 배지 및 부착 표면을 포함하는, 임의의 형태의 본 발명의 조성물을 제조하기 위한 지침서가 제공될 수 있다. 예를 들어, 상기 키트는 적합한 수용액 중에 배합되고 희석될 수 있는 분리된 스톡 성분을 제공할 수 있다. 특정 구현예에서, 키트의 성분의 적어도 일부는 상이한 온도에서 또는 액체로서 또는 분말로서 저장된다. 특정 구현예에서, 키트는 ECM 성분을 포함하는 본원에 기재된 표면과 같은 아노이키스-감소 표면 상에 환부 세포를 배양하기 위한 코팅된 표면을 포함한다.

[0134] 또 다른 양상에서, 본 발명은 2 % 초과 및 20 % 미만의 산소를 포함하는 조건하에서 적어도 하나의 아노이키스 억제제를 포함하는 배지에서 배양된 1차 인간 암 세포를 포함하는 세포 배양 조성물을 제공한다. 상기 세포 배양 조성물의 하나의 구현예에서, 배지는 내인성 아노이키스 경로의 적어도 하나의 억제제 및 외인성 아노이키스 경로의 적어도 하나의 억제제를 포함하고, 여기서, 상기 세포는 6-17 % 산소 (예를 들어, 10 % 산소)를 포함하는 조건하에서 배양한다. 상기 세포 배양 조성물의 또 다른 구현예에서, 배지는 내인성 아노이키스 경로의 적어도 하나의 억제제 및 외인성 아노이키스 경로의 적어도 하나의 억제제를 포함하고, 여기서, 상기 세포는 6-17 % 산소 (예를 들어, 10 % 산소)를 포함하는 조건하에서 배양한다. 또 다른 구현예에서, 상기 배지는 조합된 다수의 배양 배지의 사용에 관하여 상기 섹션에 기재된 바와 같은 하나 이상의 추가의 성분을 포함한다.

[0135] 또 다른 양상에서, 본 발명은 수화된 세포외 매트릭스 (ECM)를 통해 바이오센서 표면에 부착된 1차 인간 암 세포를 포함하는 바이오센서 표면을 제공하고, 상기 ECM은 하기로 이루어진다: (i) 피브로넥틴 및 콜라겐; (ii) 콜라겐 및 라미닌 332 (라미닌 V) 또는 (iii) 라미닌 332 (라미닌 V). 하나의 구현예에서, ECM은 바람직하게 원섬유 및 친수성 표면을 포함하는 피브로넥틴 및 콜라겐으로 이루어진다. 또 다른 구현예에서, ECM은 콜라겐 및 라미닌 332 (라미닌 V)로 이루어진다. 또 다른 구현예에서, ECM은 라미닌 332 (라미닌 V). 하나의 구현예에서, 수화된 ECM은 폴딩된다.

[0136] 또 다른 양상에서, 본 발명은 수화된 세포외 매트릭스 (ECM)를 통해 세포 배양 용기 표면에 부착된 1차 인간 암 세포를 포함하는 세포 배양 용기 표면을 제공하고, 여기서, 상기 ECM은 (i) 피브로넥틴 및 콜라겐; (ii) 콜라겐 및 라미닌 332 (라미닌 V) 또는 (iii) 라미닌 332 (라미닌 V)로 이루어진다. 하나의 구현예에서, ECM은 바람직하게 원섬유 및 친수성 표면을 포함하는 피브로넥틴 및 콜라겐으로 이루어진다. 또 다른 구현예에서, ECM은 콜

라겐 및 라미닌 332 (라미닌 V)로 이루어진다. 또 다른 구현예에서, ECM은 라미닌 332 (라미닌 V)로 이루어진다. 하나의 구현예에서, 수화된 ECM은 폴딩된다.

[0137] 임상 시험

[0138] 임상 시험을 위해 1차 세포를 제조하기 위한 본 발명의 방법은 임의로 배양 단계(들) 후 세포 샘플의 임상 시험을 수행하는 단계를 포함할 수 있다. 따라서, 시험전 적당한 시점에, 생존 환부 환자 세포 샘플은 샘플에 대한 하나 이상의 임상 시험을 수행하기 위해 상기된 항-아노이키스 제제로부터 제거될 수 있다. 임상 시험(들)은 진단학적 시험, 유전학적 시험 및 특정 치료 요법의 효능을 결정하기 위한 시험을 포함하지만 이에 제한되지 않는 임상적으로 관련되고/되거나 유용한 결과를 제공하도록 디자인된 1차 세포를 사용하는 임의의 임상 시험일 수 있다.

[0139] 하나의 구현예에서, 임상 시험은 바이오센서를 사용하여 수행된다. 따라서, 본 발명의 방법에서, 생존 환부 세포의 샘플은 임상 시험 전에 바이오센서 표면에 부착될 수 있다 (예를 들어, 본원에 기재된 항-아노이키스 부착 조건을 사용하여). 본 발명에 의해 제공된 배양된 1차 세포를 사용하여 수행될 수 있는 바이오센서-기반 검정의 비제한적인 예는 제제(들)가 세포 접착 및 생존 환부 세포의 신호 전달 경로 활성화에 변화를 유발하는지를 결정하기 위한 검정, 예를 들어, 이들 둘 다의 전체 내용이 본원에 구체적으로 참조로 인용된 라인 등 (Laing et al)에 의한 미국 특허 공보 제20130330761호 및 제20150125894호에 기재된 검정을 포함한다.

[0140] 하나의 구현예에서, 본원에 기재된 임의의 배양 방법에 따라 제조된 생존 환부 세포의 샘플은 제제의 첨가가 생존 환부 세포의 세포 접착 및 신호 전달 경로 활성화에서의 변화를 유발하는지를 결정하기 위해 평가한다. 특정 구현예에서, 이들 세포 제조 방법은 표적화된 치료제인 제1 제제가 이것이 설명하는 것으로 의도된 신호 전달 경로에 대해 효과를 갖는지를 평가하는 방법과 조합되어 상기 표적화된 치료제가 대상체의 암 세포에서 기능하는지를 결정한다. 상기 방법은 다음을 포함할 수 있다:

[0141] 본원에 기재된 임의의 항-아노이키스 성분 또는 조건을 추가로 함유할 수 있는 무혈청 배지에서 대상체로부터 소득된 생존 암 세포의 샘플을 배양하는 단계;

[0142] 상기 샘플을 제1 제제, 및 상기 제1 제제가 해결하는 것으로 의도된 동일한 신호 전달 경로에 선택적으로 영향을 주어 세포 접착 또는 부착에 대한 효과에 의해 측정된 바와 같은 신호 전달 경로를 상향조절하거나 하향조절하는 것으로 공지된 제2 제제와 접촉시켜 제1 제제와 제2 제제 둘 다와 접촉된 샘플을 생성하는 단계;

[0143] 단독의 제1 제제 또는 제2 제제와 접촉되는, 대상체로부터 수득된 생존 암 세포의 샘플에 상대적으로 제1 제제와 제2 제제 둘 다와 접촉되는 샘플에서 생존 세포의 세포 접착 또는 부착을 계속적으로 측정하는 단계;

[0144] 세포 접착 또는 부착에서의 변화가 단독의 제1 제제 또는 제2 제제와 접촉된 샘플과 비교하여 제1 제제와 제2 제제 둘 다와 접촉된 샘플에서 발생하는지를 수학적 연속 측정 분석에 의해 결정하는 단계; 및

[0145] 제2 제제와 조합된 제1 제제가 단독의 제1 또는 제2 제제와 비교하여 세포 접착 또는 부착에서의 변화를 유발하여 제1 제제가 대상체의 암 세포의 세포 신호 전달 경로에서 기능함을 지적하는, 대상체에서 치료학적 용도를 위해 제1 제제를 선택하는 단계.

[0146] 다른 구현예에서, 이들 세포 제조 방법은 HER 패밀리 수용체를 표적화하는 치료제가 대상체로부터 수득된 생존 암 세포의 샘플에서 기능하는지를 평가하는 방법과 조합된다. 상기 방법은 다음을 포함할 수 있다:

[0147] 무혈청 및 성장 인자 부재의 배지에서 대상체로부터 수득된 생존 암 세포의 샘플을 배양하는 단계;

[0148] (1) 샘플의 제1 부분을 HER 패밀리 수용체를 표적화하는 치료제와 뉴레굴린과 접촉시키고/시키거나 (2) 샘플의 제2 부분을 HER 패밀리 수용체를 표적화하는 치료제 및 상피 성장 인자와 접촉시키는 단계;

[0149] (1) 단독의 치료제 또는 뉴레굴린과 접촉된 대상체로부터 수득된 생존 암 세포의 샘플과 비교하여 치료제 및 뉴레굴린 둘 다와 접촉된 샘플의 제1 부분에서 및/또는 (2) 단독의 치료제 또는 상피 성장 인자와 접촉된 대상체로부터 수득된 생존 암 세포의 샘플과 비교하여 치료제 및 상피 성장 인자 둘 다와 접촉된 샘플의 제2 부분에서 생존 세포의 세포 접착 또는 부착을 연속으로 측정하는 단계;

[0150] (1) 단독의 치료제 또는 뉴레굴린과 접촉된 샘플과 비교하여 치료제 및 뉴레굴린 둘 다와 접촉된 제1 부분에서 및/또는 (2) 단독의 치료제 또는 상피 성장 인자와 접촉된 샘플과 비교하여 치료제 및 상피 성장 인자 둘 다와 접촉되는 제2 부분에서 세포 접착 또는 부착에서의 변화가 발생하는지를 연속 측정의 수학적 분석에 의해 결정하는 단계; 및

- [0151] (1) 단독의 치료제 또는 뉴레굴린과 비교하여 제1 부분에서 및/또는 (2) 단독의 치료제 또는 상피 성장 인자와 비교하여 제2 부분에서 치료제가 대상체의 암 세포에서 기능하는지를 지적하는, 세포 접촉 또는 부착에서의 변화가 발생하는 대상체를 치료하기 위한 치료제를 선택하는 단계.
- [0152] 하나의 구현예에서, 본원에 기재된 임의의 배양 방법에 따라 제조된 생존 환부 세포의 샘플은 제제(들)의 첨가가 생존 환부 세포의 세포 접촉 및 신호 전달 경로 활성화에서의 변화를 유발하는지를 결정하기 위해 평가한다. 특정 구현예에서, 이들 세포 제조 방법은 표적화된 치료제인 제1 제제가 이것이 설명하는 것으로 의도된 신호 전달 경로에 대해 효과를 갖는지를 평가하는 방법과 조합되어 상기 표적화된 치료제가 대상체의 암 세포에서 기능하는지를 결정한다. 상기 방법은 다음을 포함할 수 있다:
- [0153] 혈청이 없고, 표적화된 치료제 또는 제2 제제에 민감성 또는 내성을 유도할 수 있는 세포 신호 전달 기능에 영향을 주는 것으로 공지된 선택된 천연 제제 또는 인자들을 함유하는 배지에서 대상체로부터 수득된 생존 암 세포의 샘플을 배양하는 단계;
- [0154] 상기 샘플을 제1 제제, 및 상기 제1 제제가 해결하는 것으로 의도된 동일한 신호 전달 경로에 선택적으로 영향을 주어 세포 접촉 또는 부착에 대한 효과에 의해 측정된 바와 같은 신호 전달 경로를 상향조절하거나 하향조절하는 것으로 공지된 제2 제제와 접촉시켜 제1 제제와 제2 제제 둘 다와 접촉된 샘플을 생성하는 단계;
- [0155] 단독의 제1 제제 또는 제2 제제와 접촉되는, 대상체로부터 수득된 생존 암 세포의 샘플에 상대적으로 제1 제제와 제2 제제 둘 다와 접촉되는 샘플에서 생존 세포의 세포 접촉 또는 부착을 계속적으로 측정하는 단계;
- [0156] 세포 접촉 또는 부착에서의 변화가 단독의 제1 제제 또는 제2 제제와 접촉된 샘플과 비교하여 제1 제제와 제2 제제 둘 다와 접촉된 샘플에서 발생하는지를 수학적 연속 측정 분석에 의해 결정하는 단계; 및
- [0157] 제2 제제와 조합된 제1 제제가 단독의 제1 또는 제2 제제와 비교하여 세포 접촉 또는 부착에서의 변화를 유발하여 제1 제제가 저항성 또는 감수성 제제 또는 인자의 존재하에서 대상체의 암 세포의 세포 신호 전달 경로에서 기능함을 지적하는, 대상체에서 치료학적 용도를 위해 제1 제제를 선택하는 단계.
- [0158] 본원에 기재된 방법에 따라 제조된 1차 세포를 사용하고/하거나 본원에 기재된 조성물 (예를 들어, 1차 세포 배양물, 세포 배양 용기 표면, 바이오센서 표면)을 사용하여 수행된 임상 시험은 진단학적 목적, 예를 들어, 1차 세포 샘플이 수득된 대상체가 특정 질환 또는 장애 (예를 들어, 암, 자가면역 질환 등)를 갖는지를 진단하기 위해 사용될 수 있고, 여기서 임상 시험의 결과를 기준으로 하는 진단학적 기준이 결정되었다.
- [0159] 추가로, 1차 세포 샘플이 수득된 대상체는 임상 시험의 결과를 기준으로 치료될 수 있다 (예를 들어, 치료 용법은 임상 시험의 결과를 기준으로 선택될 수 있다). 예를 들어, 하나의 구현예에서, 본원에 기재된 세포 제조 방법 및 조성물은 암으로 진단된 인간 대상체를 치료하는 방법과 조합되고, 상기 선택된 치료 용법은 본원에 기재된 세포 제조 방법 및 조성물을 사용한 임상 시험의 결과를 기준으로 한다. 하나의 구현예에서, 암으로 진단된 인간 대상체를 치료하는 방법은:
- [0160] 이것이 해결하는 것으로 의도된 대상체의 암 세포에서 신호 전달 경로에서 치료학적 활성인 것으로 다음을 포함하는 방법에 의해 결정된 표적화된 치료학적 제제인 제1 제제를 대상체에게 투여하는 단계를 포함하고;
- [0161] 상기 방법은 대상체로부터 수득된 (예를 들어, 본원에 기재된 배양 방법에 따라) 생존 암 세포 (예를 들어, 1차 및/또는 전이 암 세포)로 이루어진 샘플을 배양하고;
- [0162] 상기 샘플을 제1 제제, 및 상기 제1 제제가 해결하는 것으로 의도된 동일한 신호 전달 경로에 선택적으로 영향을 주어 세포 접촉 또는 부착에 대한 효과에 의해 측정된 바와 같은 신호 전달 경로를 상향조절하거나 하향조절하는 것으로 공지된 제2 제제와 접촉시켜 제1 제제와 제2 제제 둘 다와 접촉된 샘플을 생성하고;
- [0163] 단독의 제1 제제 또는 제2 제제와 접촉되는 (예를 들어, 생존 세포가 본원에 기재된 방법에 따라 바이오센서 표면으로 부착되어 있는 바이오센서를 사용하여) 대상체로부터 수득된 생존 암 세포의 샘플에 상대적으로 제1 제제와 제2 제제 둘 다와 접촉되는 샘플에서 생존 1차 또는 전이 암 세포의 세포 접촉 또는 부착을 계속적으로 측정하고;
- [0164] 세포 접촉 또는 부착에서의 변화가 단독의 제1 제제 또는 제2 제제와 접촉된 샘플과 비교하여 제1 제제와 제2 제제 둘 다와 접촉된 샘플에서 발생하는지를 특징으로 하는 %로서 표현되는 산출 값을 수학적 연속 측정 분석에 의해 결정하고;
- [0165] 제1 제제를, 세포 접촉 또는 부착에서의 변화를 특징으로 하는 산출 값이 역치 값 (예를 들어, 50 %) 이상 또는

초과인 대상체에게 투여하여 제1 제제가 대상체의 암 세포의 세포 신호 전달 경로에서 치료학적 활성인지를 지적한다.

[0166] 정의

[0167] 달리 정의되지 않는 경우, 본원에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어는 본 발명이 속하는 기술 분야의 통상의 기술자에 의해 통상적으로 이해되는 바와 동일한 의미를 갖는다. 상기 섹션에 제시된 정의가 본원에 참조로 인용된 특허, 출원, 공개 출원 및 다른 공보에 제시된 정의와 반대이거나 일치하지 않는 경우, 상기 섹션에 제시된 정의는 본원에 참조로 인용된 정의보다 우선한다. 본원에 사용된 바와 같은 하기의 용어는 하기 정의를 갖는 것으로 의도된다.

[0168] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "약"은 거의 또는 주변의 영역에서 대략적으로를 의미한다. 용어 "약"이 수치 범위와 연계하여 사용되는 경우, 이것은 경계선을 제시된 수치 초과 및 미만으로 연장시킴에 의해 상기 범위를 변형시킨다. 일반적으로, 용어 "약"은 본원에서 10 %의 변화량에 의해 진술된 값 초과 및 미만으로 수치 값을 변형시키기 위해 사용된다. 하나의 양상에서, 용어 "약"은 이것이 사용된 숫자의 수치의 + 또는 - 20 %를 의미한다. 따라서, 약 50 %는 45 %-55 %의 범위를 의미한다. 중점에 의해 본원에 언급된 수치 범위는 상기 범위 내에 포함된 모든 숫자 및 분수를 포함한다 (예를 들어, 1 내지 5는 1, 1.5, 2, 2.75, 3, 3.90, 4, 및 5를 포함한다).

[0169] 세포와 관련된 것과 연계하여 용어 "활성화제", "활성화시킨다" 또는 "교란제", "교란시킨다", "교란"은 시약, 유기 분자, 신호 전달 인자, 생화학물질, 핵산, 또는 당업자에게 널리 공지된 세포에 대해 효과를 갖는 단백질을 사용한 세포의 생리학적 조작의 특이적 대상체 또는 활성을 언급한다. 상기 효과는 세포 생리학적 활성의 임의의 조절을 언급하고 상향 또는 하향조절을 포함할 수 있지만 이에 제한되지 않는다.

[0170] 용어 "아노이키스"는 정지, 노쇠를 유도하는 활성을 언급하고, 궁극적으로 이들이 주변 세포의 매트릭스 (ECM) 및 이웃하는 세포로부터 탈착하기 때문에 앵커리지-의존성 세포의 접착 분자의 신호 전달에 의해 유도되는 세포사를 유도할 수 있다. 일반적으로, 세포는 세포와 ECM 간 뿐만 아니라 근접 세포 간 소통이 성장과 생존을 위한 필수 신호를 제공하기 때문에 이들이 속하는 조직에 밀접하게 유지된다. 세포가 이들의 고유 ECM 또는 이들의 이웃으로부터 탈착되는 경우, 정상 세포-매트릭스 및 세포-세포 상호작용이 상실되고 세포는 아노이키스 신호 전달을 개시한다. 본 발명의 목적은 1차 세포의 아노이키스 신호 전달 및 1차 환자 환부 세포의 아노이키스-관련 활성을 예방하여 상기 세포가 접착-관련 매개된 신호 전달을 통해 교란제와의 반응을 측정하는데 의존할 수 있는 환자의 기능적 세포의 임상 시험에 사용될 수 있도록 하기 위한 것이다.

[0171] 용어 "항생제"는 비-포유동물 세포의 성장을 억제하는 상대적으로 저분자량의 천연 또는 합성 화학적 물질을 언급한다. 먼저 이들이 세균, 액티노마이세테스 및 진균류와 같은 미생물의 다양한 종에 의해 생성되는 경우 천연적으로 발견되고, 이들은 화학적으로 합성될 수 있거나 천연 화합물은 반합성 항생제를 제조하기 위해 화학적으로 변형될 수 있다. 항생제의 주요 부류는 다음과 같다: (1) 페니실린, 세팔로스포린 및 모노박탐을 포함하는 베타-락탐; (2) 아미노글리코사이드, 예를 들어, 젠타마이신, 토브라마이신, 네티마이신, 및 아미카신; (3) 테트라사이클린; (4) 설펜아미드 및 트리메토프림; (5) 플루오로퀴놀론, 예를 들어, 시프로플록사신, 노르플록사신, 및 오픈록사신; (6) 반코마이신; (7) 예를 들어, 에리트로마이신, 아지트로마이신 및 클라리트로마이신을 포함하는 마크롤리드 및 (8) 다른 항생제, 예를 들어, 폴리믹신, 클로람페니콜 및 린코사미드. 시판되는 혼합물이 포함된다 (예를 들어, 또한 항생제-항진균성 용액으로서 공지된 P/S/A-페니실린-스트렙토마이신-암포테리신 B).

[0172] 용어 "아포토시스"는 프로그램화된 세포사를 언급하고 생리학적 성장 제어 및 조직 항상성의 조절의 주요 조절 시스템이다. 아포토시스는 종양 형성의 조절에 중요한 역할을 수행한다. 많은 항암 치료요법은 암 세포에서 아포토시스 신호 전달 경로를 활성화시키도록 디자인되고 아포토시스는 일부 세포에서 아노이키스 후 단계일 수 있다.

[0173] 용어 "아노이키스 억제제"는 아노이키스 촉진 기능을 억제하거나 내인성 또는 외인성 신호 전달 경로의 항-아노이키스 활성화를 허용하여 아노이키스를 억제하는 분자 또는 조건을 언급한다. 본 발명에서 바람직한 억제제는 특정 기간 후 가역적일 수 있다. 상기 경우에 가역적 억제제는 아노이키스에 대한 이의 효과가 시약의 제거시 지속되지 않는 시약의 적용에 의해 유발된 억제를 포함한다. 가역적 억제제가 바람직하여 환자 샘플은 시험 전에 이들의 생체내 유사 상태로 복귀한다.

[0174] 용어 "검정" 또는 "검정하는"은 예를 들어, 외인성 자극 (예를 들어, 치료학적 제제)시 세포의 광학적 또는 생

체 임피던스 반응과 같은, 표적의 존재, 부재, 양, 정도, 동력학, 역학 또는 유형을 결정하기 위한 분석을 언급한다.

[0175] 용어 "부착하다" 또는 "부착"은, 예를 들어, 표면 개질 물질, 세포, 리간드 후보 화합물 및 본원의 유사 실체가 예를 들어, 물리적 흡착, 화학적 결합, 화학적 유인 및 유사 공정 또는 이의 조합에 의해 표면으로 연결됨을 언급한다. 특히, "세포 부착", "세포 접착" 또는 "세포 샘플 부착"은 배양하거나 세포 앵커링 물질과의 상호작용 등에 의해 세포가 함께 결합하거나 표면과 상호작용함을 언급한다.

[0176] 용어 "부착 패턴"은 표면으로 세포 또는 세포 샘플의 연결의 관찰가능한 특성 또는 특징을 언급한다. 부착 패턴은 정량적, 예를 들어, 부착 부위의 수일 수 있다. 부착 패턴은 또한 정량적, 예를 들어, 수화된 세포의 매트릭스로의 바람직한 부착 분자 부위일 수 있다.

[0177] 용어 "기본 형태"는 제제 또는 자극의 도입 전 세포 또는 세포 샘플의 형태 및 구조를 언급한다.

[0178] 용어 "기준선 측정"은 세포 세트가 시험될 생리학적 개시점을 언급하고 약물이 첨가되기 전 일정 기간 동안 측정의 평가를 기준으로 한다.

[0179] 용어 "바이오센서"는 분석물 또는 세포의 분석물 또는 생리학적 조건에서의 변화를 측정하는 장치를 언급한다. 구현예에서, 바이오센서는 전형적으로 3개의 파트를 함유한다: 분석물 (세포의 매트릭스, 세포 신호 전달 분자, 또는 세포 증식, 조직, 세포, 대사물, 이화물, 생분자, 이온, 산소, 이산화탄소, 탄수화물, 단백질 등과 같은 비제한적 예를 포함하는)과 결합하거나 인지하는 생물학적 성분 또는 요소, 검출기 요소 (광학적, 압전기, 전기 화학적, 온도 측정 또는 자기와 같은 물리화학적 방식으로 작동하는), 및 성분 둘 다와 연합된 변환기. 용어 "바이오센서"는 광학적 바이오센서 및 임피던스 바이오센서를 포함한다. 용어 "광학적 바이오센서"는 형광성, 흡수, 투과율, 밀도, 굴절 지수 및 광 반사를 측정하는 장치를 언급한다. 구현예에서, 광학적 바이오센서는 병원체인 생존 세포에서 분자 인지 또는 분자 자극 반응, 또는 이의 조합을 정량가능한 신호로 전환시키기 위한 광학 변환기를 포함할 수 있다. 추가로, 구현예는 광결정 장치, 광학적 파장 장치 및 표면 플라스몬 공명 장치를 포함할 수 있다. 용어 "임피던스 바이오센서"는 간 환자 세포의 복합 임피던스 변화 (델타 Z 또는 dZ)를 측정하는 장치를 언급하고, 여기서, 임피던스 (Z)는 옴 법칙 (Ohm's law)에 의해 기재된 바와 같은 전압 대 전류의 비율 ($Z=V/I$)과 관련된다. 세포와의 전극 계면에서 국소 이온 환경에 민감하고 전압 및 전류 변동의 함수로서 이들 변화를 검출한다. 정상 기능 또는 이의 교란의 결과로서 세포의 생리학적 변화는 전극 주변의 전류 흐름으로의 정량가능한 변화를 유도하고 측정된 신호의 정도 및 특징에 영향을 준다. 구현예에서, 임피던스 바이오센서는 병원체인 생존 세포에서 분자 인지 또는 분자 자극 반응 또는 이의 조합을 정량가능한 신호로 전환시키기 위한 전극 또는 전기 회로를 포함할 수 있다. 구현예에서, ISFET 바이오센서는 병원체인 생존 세포에서 분석물 인지 또는 세포 자극 반응 또는 이의 조합을 정량가능한 신호로 전환시키기 위한 이온 선택적 필드 효과 전기 변환기를 포함할 수 있다. ISFET 바이오센서에서 분석물 농도가 변화하는 경우, 트랜지스터 변화에서의 전류는 변화하고 이는 정량 신호를 생성한다.

[0180] 용어 "세포 접착"은 세포의 또 다른 세포로, 세포의 매트릭스 성분으로 또는 표면 (예를 들어, 미세역가 플레이트)으로의 결합을 언급한다.

[0181] 용어 "세포 증식"은 세포 성장 및 세포 분열의 결과로서 세포 수에서의 증가를 언급한다.

[0182] 용어 "세포 샘플"은 특정 대상체로부터 단리된 세포를 언급하고, 여기서, 상기 세포는 대상체의 생물학적 유체, 배설물 또는 조직으로부터 단리된다. 조직으로부터 단리된 세포는 중앙 세포를 포함할 수 있다. 조직으로부터 단리된 세포는 균일화된 조직, 및 세포 추출물 및 이의 조합을 포함한다. 세포 샘플은 유방 조직, 위 조직, 결장/장 조직, 폐 조직, 머리 조직, 목 조직, 이하선 조직, 난소 조직, 자궁 조직, 경부 조직, 전립선 조직, 췌장 조직, 신장/콩팥 조직, 또는 골 및/또는 골수, 혈액, 혈액 혈청, 혈액 혈장, 뇨, 정액, 정액성 유체, 정액성 혈장, 전립선 유체 (prostatic fluid), 사정전 유체 (pre-ejaculatory fluid) (쿠퍼 유체 (Cowper's fluid)), 배설물, 눈물, 침샘, 땀, 임의의 실제 형태의 생검, 복수, 수술 절개, 뇌척수액, 림프, 골수, 또는 모발로부터의 단리를 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0183] 용어 "세포 신호 전달"은 정보의 세포내 또는 세포간 전달을 언급한다. 세포 신호 전달은 세포 간, 세포와 ECM 간의 직접적인 접촉 또는 또 다른 세포에 의해 흡수되는 하나의 세포로부터의 물질의 방출에 의해 성취될 수 있다. 세포내 신호 전달은 2개의 분자 (예를 들어, 리간드 및 수용체) 간 상호작용을 통해 일어날 수 있다. 수용체 결합은 세포내 신호 전달의 캐스케이드 (예를 들어, 세포내 생화학적 변화의 개시 또는 막 전위의 변형)를 유발할 수 있다.

- [0184] 용어 "세포 생존"은 대사, 성장, 이동, 재생, 반응성의 일부 형태 및 적응성과 같은 특정 기능을 수행하는 능력을 특징으로 하는 세포의 생존능을 언급한다.
- [0185] 용어 "화학적으로 정의된"은 공지되거나 정의될 수 있는 구조, 화학식 및 조성, 및 화학적 조성 내 다양한 개별 성분의 %를 의미한다. 이를 위해, 본 발명에서, 배지는 조직 배양 목적을 위해 전형적으로 제조된 임의의 동물 혈청을 함유하지 않는다. 이것은 미지의/정의되지 않은 화학적 성분들과 함께 임의의 조직 추출물을 함유하지 않는다. 개별 환자로부터 환부 세포 유형의 이종성 집단의 목적하는 성장/증식을 지지하기 위해 필요한 모든 필수 성분은 화학적으로 정의된다.
- [0186] 용어 "세포골격 구조화"는 세포의 내부 스캐폴드의 정렬을 언급한다. 세포의 세포골격은 세포질 또는 막 요소 및/또는 세포내 기관을 지지하는 작용을 하는 필라멘트를 포함한다. 세포골격은 또한 세포의 형태를 유지시키는 것을 도와준다.
- [0187] 용어 "환부 세포 샘플" 또는 "환부 세포 집단" 또는 "환부 세포"는 환부 세포, 특히 개별 환자의 종양 또는 종양들 또는 환부 조직 또는 유체로부터 추출된 상피 세포의 혼합물을 언급한다. 환부 세포 샘플은 비정상적 증식을 특징으로 하는 조직 또는 유체로부터 기원할 수 있다. 세포의 샘플은 특정 서브-타입의 조성에서 이종성이고, 예를 들어, 내강, 근육, 기저, 줄기, 분화되거나 미분화된 상피 중간엽 연속체 상의 세포, 또는 특히 이들이 환자의 종양의 생체내 조건을 나타내는 경우 상기 모두의 혼합물로 이루어질 수 있다. 특정 암 고유 서브타입은 환부 세포 (예를 들어, 내강 상피 암으로서 공지된 ER+ 유방암)의 특정 유형의 차등적 %를 가질 수 있고 따라서 고비율의 내강 리니지 (lineage)의 추출된 세포 및 보다 적은 %의 다른 상피 유형을 가질 수 있다. 또 다른 예 - 3중 음성 유방암은 기저 상피 암으로서 공지되어 있고 따라서 기저 리니지의 높은 비율의 추출된 환부 세포 및 보다 적은 %의 기타 상피 유형을 가질 수 있다. 샘플은 특히, 생존 또는 복제 컴퍼티트 또는 분열 또는 비-분열, 또는 임의의 시점 또는 세포 사이클에서 조합 시점에 있는 것으로 이루어질 수 있다. 세포는 아노이키스에 진입하거나 진입하지 않을 수 있거나 완전히 아노이키스에서 임의의 수준에 개입될 수 있다. 세포의 샘플은 이들의 환부 경로 활성을 기준으로 선택될 수 있다.
- [0188] 용어 "세포의 매트릭스 성분" 또는 "ECM 성분"은 동물의 세포의 매트릭스에 존재하는 분자를 언급한다. 상기 분자는 임의의 종 및 임의의 조직 유형으로부터 기원하는 세포외 매트릭스의 성분일 수 있다. 세포외 매트릭스 성분의 비-제한적 예는 라미닌, 콜라겐, 피브로넥틴, 다른 당단백질, 펩타이드, 글리코사미노글리칸, 프로테오글리칸 등을 포함한다. 세포외 매트릭스 성분은 또한 성장 인자를 포함할 수 있다.
- [0189] 용어 "세포의 매트릭스 코팅"은 천연의 생분자 또는 생화학물질, 또는 세포외 매트릭스에서 발견될 수 있는 하나 이상의 천연의 생분자 또는 생화학물질로부터 유래되거나 이들을 기본으로 하는 생화학물질인 하나 이상의 분자를 포함하는 세포 배양 표면 상의 코팅을 언급한다. 예를 들어, 세포외 매트릭스 코팅은 예를 들어, 피브로넥틴, 콜라겐, 라미닌, 다른 당단백질, 펩타이드, 글리코사미노글리칸, 프로테오글리칸, 비트로넥틴, 세포내 CAM, 혈관 CAM, MadCAMs, 또는 이의 유도체를 포함할 수 있거나, 천연의 생화학물질 라이신 및 오르니틴을 기본으로 하는 중합체 분자인, 폴리라이신 또는 폴리오르니틴과 같은 생화학물질을 포함할 수 있다. 아미노산과 같은 천연의 생화학물질을 기본으로 하는 중합체성 분자는 천연의 생화학물질의 이성체 또는 에난티오머를 사용할 수 있다. 코팅은 또한 세포 표면 수용체 또는 세포 표면 동족 결합 단백질 또는 상기 세포 표면 단백질에 대해 친화성을 갖는 단백질을 포함할 수 있다. 이상적으로 코팅을 위해 사용되는 세포외 매트릭스는 ECM 분자를 특정 세포 유형 및 신호 전달 경로와 일치시킴에 의해 가용한 속 및 종으로부터 선택된다.
- [0190] 용어 "외인성 아노이키스"는 생존 세포의 외인성 신호 전달 경로와 연관된 활성을 언급한다. 외인성 경로는 예를 들어, 종양 괴사 인자 수용체 1 (TNFR1) 및 Fas/CD95와 같은 세포질막 상의 사멸 수용체에 의해 활성화될 수 있다. 리간드가 이들 수용체에 결합함으로써 사멸 유도 신호 전달 복합체 (DISC)가 형성되어 카스파제 캐스케이드가 구성원이고 추가로 다운스트림 아노이키스 반응인 효소 캐스케이드의 개시를 유도한다.
- [0191] 용어 "외인성 아노이키스 억제제"는 외인성 아노이키스 경로에 영향을 미침에 의해 (예를 들어, 이를 방해함에 의해) 아노이키스를 억제하는 제제, 예를 들어, 세포질막 상에 사멸 수용체 (예를 들어, TNFR1, ALK5/TGFBR1, Fas/CD95)의 활성을 억제하는 제제를 언급한다. 외인성 아노이키스 억제제의 비제한적인 예는 사멸 수용체에 결합하거나 이의 활성을 억제하는 제제, 예를 들어, 항체 및 Ig 융합 단백질(예를 들어, TNFR1, ALK5/TGFBR1 또는 Fas/CD95에 지시된), 및 사멸 수용체에 대한 리간드에 결합하거나 이의 활성을 억제하는 제제, 예를 들어, 항체 및 Ig 융합 단백질 (예를 들어, TFN α , TGF β 또는 FasL에 지시된)을 포함한다. 외인성 아노이키스 억제제의 다른 비제한적인 예는 사멸 수용체를 통해 신호 전달을 억제하는 (예를 들어, TNFR1, ALK5/TGFBR1 또는 Fas/CD95를 통해 신호 전달을 억제하는) 소분자 제제, WNT 신호 전달 효능제를 포함한다. 외인성 아노이키스

억제제의 다른 비제한적인 예는 인테그린 안정화제, 및 아노이키스를 억제하는 인테그린 리간드를 포함한다.

- [0192] 용어 "폴딩된 세포외 매트릭스"는 ECM을 포함하는 이들의 천연 또는 고유 상태의 단백질 성분(들)의 재생가능한 정돈되고 구조화된 정렬인 ECM을 언급한다.
- [0193] 용어 "건강한 세포 샘플"은 세포 샘플을 언급하고, 여기서, 상기 세포는 시험되는 질환을 갖지 않는 조직으로부터 추출되지 않았거나 추출된다. 예를 들어, 특정 대상체가 대상체의 유방암에 대한 치료학적 제제의 효과에 대해 시험되는 경우, 비-암성 세포 또는 비-유방 조직으로부터의 세포는 "건강한"것으로 고려된다. 용어 "건강한 세포 샘플"은 대상체의 전체 건강 상태를 결정하거나 반영하지 못한다.
- [0194] 용어 "수화된 세포외 매트릭스"는 인간 세포가 부착할 것으로 의도된 표면에 적용되고 표면으로 적용 후 충분한 물을 보유하여 ECM이 완전히 습화되고 결코 사용전에 탈수되지 않는 세포외 매트릭스 성분으로부터 제조되는 세포외 매트릭스를 언급한다.
- [0195] 용어 "저산소증"은 20.094 %의 산소 분압 (소위 정상 산소증으로 불리우는) 미만인 세포 샘플 조건을 언급한다. 대기에서 산소의 분압은 해수면 기준으로 20.094 %이고 대부분의 암 세포는 생체내에서 2 % 미만의 산소 분압을 경험하는 것으로 보고된다. 매우 낮은 산소 수준 및 높은 산소 수준, 예를 들어, 정상 산소중인 20 % 산소는 보고에 따르면 대부분의 세포 및 특히 1차 세포가 아노이키스에 진입하도록 한다.
- [0196] 용어 "내인성 아노이키스"는 생존 세포의 내인성 신호 전달 경로와 연관된 활성을 언급한다. 내인성 아노이키스 경로는 미토콘드리아 막의 침투화 및 시토크롬 c의 세포질로의 방출을 특징으로 한다. 시토크롬 c는 이어서 다중-단백질 복합체를 형성할 수 있고 카스파제 캐스케이드 및 추가의 다운스트림 아노이키스 반응의 활성화를 개시한다.
- [0197] 용어 "내인성 아노이키스 억제제"는 내인성 경로에 영향을 미침에 의해 (예를 들어, 이를 방해함에 의해) 아노이키스를 억제하는 제제, 예를 들어, 미토콘드리아 막의 침투화 및/또는 시토크롬 C의 세포질로의 방출을 억제하는 제제를 언급한다. 내인성 아노이키스 억제제의 비제한적 예는 스트레스 억제제, 예를 들어, 산화항원 완충제 및 반응성 산소 종 억제제를 포함한다.
- [0198] 용어 "샘플"은 본원에 기재된 장치, 미세플레이트 또는 방법을 사용하여 단리되거나, 조작되거나, 측정되거나, 정량되거나, 검출되거나 분석되는 모이어티를 함유할 수 있는 모든 것을 언급한다. 샘플은 생물학적 샘플, 예를 들어, 생물학적 유체 또는 생물학적 조직일 수 있다. 생물학적 유체의 예는 세포 배양 배지, 뇨, 혈액, 혈장, 혈청, 침, 정액, 대변, 객담, 뇌척수액, 눈물, 점액, 양수 등과 같은 매질에서 세포의 현탁액을 포함한다. 생물학적 조직은 일반적으로 연결 조직, 상피 조직, 근육 조직 및 신경 조직을 포함하는, 인간, 동물, 식물, 세균, 진균류 또는 바이러스 구조의 구조적 물질 중 하나를 형성하는 이들의 세포간 물질과 함께 특정 종류의 세포의 응집체이다. 생물학적 조직의 예는 또한 기관, 종양, 림프절, 동맥 및 개별 세포(들)를 포함한다. 생물학적 샘플은 추가로 세포 현탁액, 생물학적 분자 (예를 들어, 단백질, 효소, 핵산, 탄수화물, 생물학적 분자에 결합하는 화학적 분자)를 함유하는 용액을 포함할 수 있다.
- [0199] 용어 "무혈청" 또는 "무혈청 배지"는 필수적으로 혈청 또는 조직 추출물을 함유하지 않는 세포 배양 배지를 언급한다. 특정 구현예에서, 배지에 0 % (완전히 없음), 또는 약 0.001 %, 0.005 %, 0.01 %, 0.10 %, 또는 1.0 % 미만의 총 혈청이 있다. 혈청 유형의 예는 다음을 포함한다: 다양한 형태의 소 혈청 (송아지 혈청, 태아 소 혈청, 소 송아지 혈청, 공여자 소 송아지 혈청, 한정된 태아 소 혈청, 신생아 소 송아지 혈청, 등), 말 혈청 및 인간 혈청, 텍스트란 추출된 혈청, 열 불활성화된 혈청, 감마-조사된 혈청, 열-불활성화된-텍스트란-추출된 혈청.
- [0200] 용어 "공유된 경로 아노이키스 억제제"는 내인성 및 외인성 아노이키스 경로에 의해 공유되어 공유된 억제제가 외인성 아노이키스와 내인성 아노이키스 둘 다를 억제하는데 효과적일 수 있는, 세포 신호 전달 경로 또는 성분에 영향을 미침에 의해 (예를 들어, 이를 방해하여) 아노이키스를 억제하는 제제를 언급한다. 공유된 경로 아노이키스 억제제의 비제한적인 예는 Rho-연합된 키나제 억제제, 카스파제 억제제, 매트릭스 메탈로프로테아제 억제제, WNT 신호 전달 효능제, 및 시토크롬 C 억제제를 포함한다.
- [0201] 용어 "실질적으로 없는"은 다른 성분으로부터 단리된, 적어도 약 90 %, 바람직하게 95 %, 99 % 이상의 백분율을 언급한다. 성분은 예를 들어, 본원에 기재된 다른 세포, 시약, 단백질, 펩타이드, 화합물 또는 조성물일 수 있다.
- [0202] 용어 "상승 효과" 또는 "상승작용 효과"는 2개 이상의 제제의 조합 효과가 각각의 제제의 별도의 (개별) 효과의

합 보다 큰 2개 이상의 제제의 상호작용을 언급한다.

- [0203] 용어 "표적화된 경로 약물", "경로 약물" 또는 "표적화된 약물"은 질환 과정에 관여하는 특이적 생분자 (예를 들어, 단백질)에 결합하도록 디자인되어 이의 활성을 조절하는 치료학적 능력을 갖는 임의의 분자 또는 항체를 언급한다.
- [0204] 용어 "치료학적 제제"는 유기체 (인간 또는 비인간 동물)에 투여되는 경우, 국소 및/또는 전신 작용에 의한 목적하는 약리학적, 면역원성 및/또는 생리학적 효과를 유도하는 것과 관련된 임의의 합성 또는 천연의 생물학적 활성 화합물 또는 조성물을 언급한다. 상기 용어는 약물, 백신, 및 단백질, 펩타이드, 호르몬, 핵산, 유전자 작제물 등과 같은 분자를 포함하는 생물약제로서 통상적으로 간주되는 화합물 또는 화학물질을 포함한다. 제제는, 예를 들어, 식물, 및 다른 영역과 같은 수의학 적용을 포함하는 의학 및 농업에 사용되는 생물학적 활성제일 수 있다. 용어 치료학적 제제는 또한 제한 없이 약물; 비타민; 미네랄 보충물; 질환 또는 병의 치료, 예방, 진단, 치유 또는 완화를 위해 사용되는 물질; 또는 신체의 구조 또는 기능에 영향을 주는 물질; 또는 이들이 생물학적으로 활성이 되거나 소정의 생리학적 환경에 위치된 후 생물학적으로 보다 활성이 되는 프로드럭을 포함한다. 치료학적 제제는 항암 치료제, 항정신병약, 소염제 및 항생제를 포함하지만 이에 제한되지 않는다.
- [0205] 범위가 주어지는 경우 종점이 포함된다. 추가로, 달리 지적되지 않거나 기재된 내용 및 당업자의 이해로부터 달리 자명하지 않는 경우, 범위로서 표현되는 값이 본 발명의 상이한 구현예에서 진술된 범위내 임의의 특정 값 또는 서브범위를 추정할 수 있는 것으로 이해되어야 하고, 이의 기재내용이 달리 지적되지 않는 경우 상기 범위의 하한치의 10분 1의 유니트까지 추정되는 것으로 이해되어야만 한다.
- [0206] 모든 인용된 공급원, 예를 들어, 본원에 인용된 특허, 특허 공보, 문헌, 공보, 데이터베이스, 데이터베이스 엔트리 및 문헌은 인용시 달리 명백하게 진술되지 않는 경우라도 이들의 전문이 참조로 본원에 인용된다. 인용된 소스와 본원의 진술이 다름이 있는 경우, 본원의 진술이 제어할 것이다.
- [0207] **실시예**
- [0208] 본 발명은 하기의 실시예를 참조로 보다 완전하게 이해된다. 이들은 그러나 본 발명의 범위를 제한하는 것으로서 해석되지 말아야 한다. 본원에 기재된 실시예 및 구현예가 단지 설명을 목적으로 하는 것이고 이의 관점에서 다양한 변형 또는 변화가 당업자에게 제안되고 본원의 취지 및 이해의 범위 내에 및 첨부된 청구범위의 범주 내에 포함되어야 하는 것으로 이해된다.
- [0209] 실험 디자인의 논의
- [0210] 본 발명에 기재된 바와 같은 1차 환부 세포를 획득하고 배양하기 위한 방법은 임상 시험을 위한 환부 세포를 제조하기 위해 사용된다.
- [0211] 단백질 결합 및 아노이키스의 생화학적 원리는 통상적으로 이들의 조직 기원과는 상관없이 ECM에 부착된 상이한 세포 유형에 걸쳐 적용되는 것으로 이해된다. 본원에 기재된 방법은 따라서 이들의 조직 기원과는 상관 없이 ECM에 부착될 수 있는 모든 세포 유형에 광범위하게 적용될 수 있다.
- [0212] 하기에 제공된 3개의 예는 본원에 기재된 임상 시험을 위해 1차 세포를 제조하기 위한 방법의 다양한 구현예를 입증한다. 특히, 실시예는 다음의 경우에 이점을 입증한다: 1) 10 % 산소 조건, 또는 2) 하나 이상의 아노이키스 억제제, 또는 3) 수화되고 폴딩된 ECM은 세포 샘플을 배양하는 경우 사용된다. 이들 3개의 변수 각각은 "한 시점에 하나의 변수" 방법을 사용하는 통상의 조건에 상대적으로 단리된 상태로 평가된다. 이들 변수가 3개의 실시예에서 단리되는 경우, 이들은 "개선된" 조건으로서 논의 목적을 위해 표지화되고 이들이 비교되는 조건은 "통상"의 조건으로서 표지화된다.
- [0213] 실시예 1 - 상이한 산소 조건하에서 배양 방법의 비교
- [0214] 실시예 2 - 하나 이상의 아노이키스 억제 분자의 존재 및 부재하에 배양 방법의 비교
- [0215] 실시예 3 - 수화된 폴딩된 ECM의 존재 및 부재하에 배양 방법의 비교
- [0216] 실시예에 사용되는 요소
- [0217] 조직: 2개의 상이한 환자 표본으로부터 획득된 환부 유방 조직 (C54, C517A)이 이들 실험에 사용되었다. 비대성 및 유방암 조직은 아노이키스 및 아노이키스 조절의 이들의 기작이 다른 환부 조직 유형을 대표하기 때문에 예시적 조직 모델을 제공한다. 추가로, 유방암은 미국에서 연간 진단되는 모든 암의 20 % 초과를 차지하

고 여성에서 가장 통상적인 형태의 암이다. 환자로부터의 조직은 본원에 기재된 바와 같은 조직 표본 수거 기술을 사용하여 수득하였다. 시험된 각각의 세포 샘플은 환부 유방 조직의 별도의 분취량으로부터 추출되었다. 각각의 표본 분취량은 30 밀리그램의 조직으로 이루어져 있다.

[0218] 세포: 환자 유방 조직 표본으로부터 추출된 환부 상피 세포는 시험을 위해 선택되었다. 상피 세포는 이들에서 발견되는 아노이키스 및 아노이키스 조절의 기작이 다른 종양 세포 유형을 대표하기 때문에 예시적 세포 모델이다.

[0219] 아노이키스 억제제. 3개의 아노이키스 억제제 분자가 이들 실험에 사용되었다 - Rho-키나제 억제제, 카스제 억제제, 및 MMP3 억제제 - 단독으로 및 조합으로. 이들 각각은 상이한 아노이키스 조절 경로에 영향을 미치고, 이들이 광범위하게 어떻게 상호 연결되고 결합을 통해 어떻게 조절되는지를 포함하는 이들의 연합된 기능은 단백질 절단, 인산화 및 탈-인산화와 같은 효소적 활성을 포함하고 중요한 세포 기능을 제어한다.

[0220] 세포외 매트릭스 (ECM) 코팅. 2개 유형의 ECM 코팅을 평가하였다: 1) 수화되고 폴딩된; 2) 비-수화되고 비-폴딩된. 각각의 코팅은 인간 콜라겐 I 및 인간 피브로넥틴으로 이루어져 있다.

[0221] 산소. 3개의 상이한 산소 농도를 갖는 대기 조건을 평가하였다: 1) 2 % 산소; 2) 10 % 산소; 3) 20 % 산소.

[0222] 배양 조건의 평가

[0223] 환부 세포 샘플을 배양하는 경우 2개의 주요 목표는 시험을 위해 가용한 세포 콜로니의 크기 및 세포의 수를 증대시키는 것이다. 상이한 세트의 조건으로부터의 결과와 비교하여 보다 높은 세포 계수 및 세포 콜로니 크기를 유도하는 배양 조건 세트가 유효하다.

[0224] 3개의 하기 실시예 각각에서, 세포 샘플은 가변적인 것을 제외하고는 동일한 조건하에서 배양하고 이어서 비교하였다. 효과를 비교하기 위해, 특이적 가변 배양 조건은 동일한 환자로부터 수득된 세포 샘플에 대해서 갖고 2개의 상이한 측정기준 (metrics)을 사용하였다 - 세포 계수 및 세포 콜로니 크기 변화. 세포 계수는 상이한 배양 조건하에서 생성된 세포 수에서의 증가에 대한 병행 비교를 가능하게 한다. 세포 콜로니 크기는 상이한 배양 조건하에서 생성된 세포 콜로니의 크기 변화의 비교를 가능하게 한다. 각각의 측정기준은 배양된 후 세포 샘플의 상태로의 상이한 통찰을 제공한다. 세포 계수는 배양 조건의 단기 평가를 제공하는 반면 세포 콜로니 크기 변화는 세포 샘플의 전체 장기 강성에 대한 지적을 제공한다.

[0225] 3개의 상이한 샘플 각각은 3개의 주요 변수 - 대기 산소 농도, 아노이키스 억제제의 존재 또는 부재 및 ECM 코팅의 유형 중 하나가 세포 샘플에 대해 갖는 효과를 단리하도록 디자인한다. 각각의 실시예에서, "개선된" 조건은 "통상적인" 조건에 상대적으로 시험한다. 개선된 조건은 세포 샘플에 대한 아노이키스의 해로운 효과를 감소시킴에 의해 세포 배양의 결과를 개선시키기 위해 의도된다. 각각의 실시예에서, 세포 계수 및 세포 콜로니 크기는 세포 샘플 내 아노이키스를 개선시키는 효과를 측정하기 위해 세포 샘플을 수일 동안 배양한 후 측정한다. 조건들 중 하나의 세트가 세포 계수 및 세포 콜로니 크기 둘 다를 보다 높게 유도하는 경우, 이들 조건은 이의 경쟁자에 비해 유효한 것으로 간주한다.

[0226] 세포 계수. 전기 세포 계수 기구인 Countess (Life Technologies)를 사용하여 각각의 실험 종료시 세포 샘플내 세포의 수를 계수하였다. 각각의 실험에서, 동일한 환자 기원의 2개의 별도의 조직 분취량으로부터 유래된 2개의 세포 샘플은 2개의 상이한 조건하에서 병행하여 시험한다. 계수 전에, 세포 샘플은 트립판 블루로 처리하여 생존 및 죽은 세포를 구분시킬 수 있다. 생존 세포 (트립판 블루에 의해 염색되지 않은 것들)만이 계수되었다. 모든 세포 샘플은 배양 및 세포 계수 5일 후 2회 계수하고 보고한다. 병행하여 배양된 각각의 세포 샘플로부터의 세포 계수는 "개선된" 세포 배양과 "통상적인" 세포 배양 간의 상대적 % 차이를 계산함에 의해 비교한다. 이의 비교대상에 상대적으로 5일 후 보다 높은 세포 수 계수를 산출하는 세포 배양 조건은 유효한 것으로 간주되었다.

[0227] 세포 콜로니 크기. 세포 샘플 중 세포 콜로니의 크기 변화를 정량하기 위해, 4개의 세포 콜로니의 크기의 평가는 배양 개시 후 제1 (조기) 일자에 수행하고 제2 이후 일자에 상기 4개의 콜로니의 크기와 비교하였다. 제1 이미지는 배양 개시 48시간 후 취하고 제2 이미지는 48 내지 96시간 이후에 취한다. 콜로니 크기를 측정하기 위해, 콜로니의 이미지는 40x 역위 현미경을 사용하여 만들었고 이어서 세포 콜로니의 면적은 각각의 콜로니 커버의 픽셀의 수를 결정함에 의해 정량화한다. 제1 이미지와 제2 이미지 간의 4개의 콜로니의 총 크기에서 절대 변화는 2개의 상이한 조건하에서 각각의 세포 샘플에 대해 계산하고 보고한다. 이어서 콜로니 크기에서의 이러한 변화는 "개선된" 세포 배양과 "통상적인" 세포 배양 간의 상대적 % 차이를 계산함에 의해 비교한다. 이의

비교대상에 상대적으로 세포 콜로니 크기에서 보다 큰 변화를 산출하는 세포 배양 조건은 월등한 것으로 간주되었다.

[0228] 실시예 1: 3개의 상이한 산소 조건하에서 배양 방법의 비교

[0229] 본 실시예에서, 환자 C517로부터 1차 세포 샘플을 3개의 상이한 산소 조건하에서 수화되고 폴딩된 ECM 코팅으로 이루어진 세포 배양 표면 상에 적어도 하나의 아노이키스 억제제를 함유하는 추출 배양 배지 및 초기 배양 배지에서 제조하였다: 1) 10 % 산소 조건 ("개선된" 조건); 2) 저산소 (2 %) 산소 조건; 3) 정상산소 (20 %) 조건. 2 % 및 20 % 산소 조건은 "통상적" 조건을 나타낸다.

[0230] 본 실시예를 위한 세포 샘플은 다음과 같이 제조하였다:

[0231] 인간 환부 조직 표본을 수득하였고 처음에 명백한 지방 부분을 제거하고 표본을 1-4 mm 크기 조각으로 절단하여 제조하였다. 절단된 표본은 이어서 크기가 각각 30 밀리그램인 분취량으로 분리하였다.

[0232] 환부 세포는 무혈청이고 DMEM/F12 배지, 콜라겐아제 및 하이알루로니다제 (분해 효소)의 혼합물, 및 적어도 하나의 아노이키스 억제제 분자를 함유하는 적어도 3시간 ("추출 기간") 동안 추출 배지에서 샘플을 텀블링시킴에 의해 절단된 표본 샘플 분취량으로부터 추출하였다. 추가로, 상기 배지는 다음을 포함하는 추가의 성분을 포함하였다: 상피 성장 인자, 에스트라디올, Ca^{2+} , Mg^{2+} , 트리-요오도티로닌, 테트라-요오도티로닌, 글루타티온, 아데닌.

[0233] 조직 샘플로부터 추출된 세포는 추출 배지로부터 회수하였고 콜라겐과 피브리노겐의 조합물로 이루어진 수화되고 폴딩된 세포의 매트릭스를 포함하는 표면 상에 분주하였다.

[0234] 이어서 세포 샘플은 추출을 위해 사용된 (상기된) 배지에서 배양하였고 분해 효소 (콜라겐아제 및 하이알루로니다제)를 제거하였다.

[0235] 모든 조직 샘플은 37 °C, 5 % CO_2 , 85 % 상대 습도 및 2 %, 10 %, 또는 20 % 산소 (가변 조건을 평가하였다)에서 배양하였다.

[0236] 세포는 이어서 약한 효소 제거 공정을 사용한 치료에 이어서 세척하고 시험 용기로 전달함에 의해 배양 용기로부터 제거하였다.

[0237] 배양된 3개의 샘플에 대한 결과는 표 3 및 4에 나타낸다. 각각의 표에서, "개선된" 조건 (10 % 산소)은 통상의 조건 (2 % 또는 20 % 산소)과 비교한다. 세포 계수 및 세포 콜로니 크기 변화 및 최적화된 조건과 통상의 조건 간의 % 차이를 보고한다. 세포 콜로니 크기 변화는 픽셀로 보고한다.

표 3
10% vs. 2% 산소

측정 기준	10% O_2 (개선된)	2% O_2 (통상적인)	차이 (개선된 것 대 통상적인 것)
세포 계수 (생존하는 것만)	141,225	6,818	1971%
세포 콜로니 크기 변화 (픽셀)	552,025	62,442	784%

[0238]

[0239] 세포 계수 및 세포 콜로니 크기 둘 다는 2 % 조건과 비교하여 10 % 산소 조건하에서 급격히 높았다. 이들은 생존 세포 샘플을 배양하는 경우 10 % 산소 대 2 % 산소 (저산소) 조건을 사용하는 우월성을 입증한다.

표 4
10% vs. 20% 산소

측정 기준	10% O ₂ (개선된)	20% O ₂ (통상적인)	차이 (개선된 것 대 통상적인 것)
세포 계수(생존하는 것만)	141,225	19,988	606%
세포 콜로니 크기 변화(픽셀)	552,025	75,087	635%

[0240]

[0241]

세포 계수 및 세포 콜로니 크기 둘 다는 20 % 조건과 비교하여 10 % 산소 조건하에서 급격히 높았다. 이들 결과는 따라서 생존 세포 샘플을 배양하는 경우 10 % 산소 대 20 % 산소 (정상산소) 조건을 사용하는 우월성을 입증한다.

[0242]

요약하면, 이들 실시예는 정상산소 조건 (20 %) 미만 및 상기 저산소 조건(2 %) 초과인 대기 조건에서 세포를 배양하는 우월성을 입증한다. 2 % 및 20 % 조건에 대한 결과는 상응하였고, 이는 세포 샘플 결과가 산소 농도가 10 %로 함유하여 개선시킴을 시사한다. 따라서, 통상의 기술자는 2 % 보다 높고 20 % 보다 낮은 임의의 산소 농도가 세포를 배양하기 위해 전형적으로 사용되는 저산소 (2 %) 또는 정상산소 (20 %) 산소 농도 보다 월등하다는 본원에 제공된 결과를 용이하게 인지할 것이다.

[0243]

실시예 2: 실시예 2 - 하나 이상의 아노이키스 억제 분자의 존재 및 부재하에 배양 방법의 비교

[0244]

본 실시예에서, 2명의 환자 C54 및 C517로부터의 1차 세포 샘플을 시험하여 아노이키스 억제제 분자가 세포 계수 및 세포 콜로니 크기에 대해 갖는 효과를 단리하기 위해 시험하였다. 각각의 세포 샘플은 수화되고 폴딩된 ECM 코팅으로 이루어진 세포 배양 표면 및 10 % 산소 조건하에서 배양하였다. 샘플은 임의의 아노이키스 억제제 분자의 부재 또는 단독으로 또는 다음과 같이 조합적으로 3개의 상이한 아노이키스 억제제 분자의 존재에 의해서만 분화되는 5개의 상이한 배양 배지 중 하나에서 배양하였다: 1) 아노이키스 억제제 분자 부재; 2) 카스파제 억제제; 3) MMP3 억제제; 4) Rho-연합된 키나제 억제제; 5) 카스파제, MMP3 및 Rho-연합된 키나제 억제제의 조합.

[0245]

본 실시예를 위한 세포 샘플은 다음과 같이 제조하였다:

[0246]

인간 환부 조직 표본을 수득하였고 처음에 명백한 지방 부분을 제거하고 표본을 1-4 mm 크기 조각으로 절단하여 제조하였다. 절단된 표본은 이어서 크기가 각각 30 밀리그램인 분취량으로 분리하였다.

[0247]

환부 세포는 무혈청이고 DMEM/F12 배지, 콜라겐아제와 하이알루로니다제 (분해 효소)의 혼합물, 및 다음 중 하나를 함유하는 적어도 3시간 ("추출 기간") 동안 추출 배지에서 샘플을 덤블링시킴에 의해 절단된 표본 샘플 분취량으로부터 추출하였다: 1) 아노이키스 억제제 부재; 2) 카스파제 억제제; 3) MMP3 억제제; 4) Rho-연합된 키나제 억제제; 또는 5) 카스파제, MMP3 및 Rho-연합된 키나제 억제제 (가변 조건이 평가됨)의 조합. 추가로, 5개의 평가된 상이한 대안적 배지 각각에서 배지는 상피 성장 인자, 에스트라디올, Ca²⁺, Mg²⁺, 트리-요오도티로닌, 테트라-요오도티로닌, 글루타티온, 아데닌을 포함하는, 추가의 성분을 포함하였다.

[0248]

조직 샘플로부터 추출된 세포는 추출 배지로부터 회수하였고 콜라겐과 피브리노겐의 조합물로 이루어진 수화되고 폴딩된 세포의 매트릭스를 포함하는 표면 상에 분주하였다.

[0249]

이어서 세포 샘플은 추출을 위해 사용된 (상기된) 배지에서 배양하였고 분해 효소 (콜라겐아제 및 하이알루로니다제)를 제거하였다.

[0250]

모든 조직 샘플은 37 °C, 5 % CO₂, 85 % 및 10 % 산소에서 배양하였다.

[0251]

세포는 이어서 약한 효소 제거 공정을 사용한 치료에 이어서 세척하고 시험 용기로 전달함에 의해 배양 용기로부터 제거하였다.

[0252]

배양된 3개의 샘플에 대한 결과는 표 5 내지 8에 나타난다. 각각의 표에서, "개선된" 조건 (하나 이상의 아노이키스 억제제)는 통상의 조건 (아노이키스 억제제의 부재)과 비교한다. 세포 계수 및 세포 콜로니 크기 변화 및 최적화된 조건과 통상의 조건 간의 % 차이를 보고한다. 세포 콜로니 크기 변화는 픽셀로 보고한다.

표 5

Rho-키나제 아노이키스 억제제 대 아노이키스 억제제 분자 부재 (환자 C517)

측정 기준	Rho 키나제 억제제 (개선된)	억제제 부재 (통상적인)	차이 (개선된 것 대 통상적인 것)
세포 계수(생존하는 것만)	78,750	51,450	53%
세포 콜로니 크기 변화(픽셀)	502,999	149,309	237%

표 6

카스파제 아노이키스 억제제 대 억제제 부재 (환자 C54)

측정기준	카스파제 억제제 (개선된)	억제제 부재 (통상적인)	차이 (개선된 것 대 통상적인 것)
세포 계수(생존하는 것만)	69,975	63,750	10%
세포 콜로니 크기 변화(픽셀)	194,095	118,754	63%

표 7

MMP3 아노이키스 억제제 대 억제제 부재 (환자 C54)

측정 기준	MMP3 억제제 (개선된)	억제제 부재 (통상적인)	차이 (개선된 것 대 통상적인 것)
세포 계수(생존하는 것만)	137,700	63,750	116%
세포 콜로니 크기 변화(픽셀)	336,700	118,754	184%

표 8

3 개의 아노이키스 억제제 대 억제제 분자 부재 (환자 C517)

측정 기준	3 아노이키스 억제제 (개선된)	억제제 부재 (통상적인)	차이 (개선된 것 대 통상적인 것)
세포 계수(생존하는 것만)	177,750	51,450	245%
세포 콜로니 크기 변화(픽셀)	552,025	149,309	270%

[0253]

[0254]

세포 계수와 세포 콜로니 크기 둘 다는 아노이키스 억제제 부재하에 배양된 세포 샘플 비교대상과 비교하여 하나 이상의 아노이키스 억제제 분자를 함유하는 배양 배지에서 제조한 각각의 세포 샘플에서 보다 높았다. 이들 결과는 따라서 생존 세포 샘플을 배양하는 경우 배양 배지에서 하나 이상의 아노이키스 억제제를 사용하는 우월성을 입증한다. 추가로, 3개의 상이한 아노이키스 관련 경로에 영향을 주는 3개의 상이한 아노이키스 억제제 분자를 평가하고 각각은 일정한 결과를 나타내는 것으로 밝혀졌기 때문에, 본 실시예는 아노이키스 억제제 분자를 사용하는 이점이 본래 일반적이고 아노이키스 억제제의 하나의 특이적 분자 또는 부류로 제한되지 않음을 입증한다.

[0255]

실시예 3: 수화된 폴딩된 ECM의 존재 및 부재하에 배양 방법의 비교

[0256]

본 실시예에서, 환자 C54로부터의 1차 세포 샘플을 시험하여 세포 배양 표면의 수화되고 폴딩된 ECM으로의 코팅이 세포 계수 및 세포 콜로니 크기에 대해 갖는 효과를 단리하였다. 각각의 세포 샘플은 하기로 코팅된 세포 배양 용기에서 적어도 하나의 아노이키스 억제제를 함유하는 배양 배지에서 10 % 산소 조건하에서 배양하였다:

1) 수화되고 폴딩된 ECM; 또는 2) 비-수화되고 비폴딩된 ECM.

[0257]

본 실시예를 위한 세포 샘플은 다음과 같이 제조하였다:

[0258]

인간 종양 조직 표본을 수득하였고 처음에 명백한 지방 부분을 제거하고 표본을 1-4 mm 크기 조각으로 절단하여 제조하였다. 절단된 표본은 이어서 크기가 각각 30 밀리그램인 분취량으로 분리하였다.

[0259]

종양 세포는 무혈청이고 DMEM/F12 배지, 콜라겐아제와 하이알루로니다제 (분해 효소)의 혼합물, 및 적어도 하나의 아노이키스 억제제 분자를 함유하는 적어도 3시간 ("추출 기간") 동안 추출 배지에서 샘플을 텀블링시킴에 의해 절단된 표본 샘플로부터 추출하였다. 추가로, 상기 배지는 다음을 포함하는 추가의 성분을 포함하였다: 상피 성장 인자, 에스트라디올, Ca^{2+} , Mg^{2+} , 트리-요오도티로닌, 테트라-요오도티로닌, 글루타티온, 아데닌.

[0260]

조직 샘플로부터 추출된 세포는 추출 배지로부터 회수하고 다음 중 하나를 포함하는 표면 상에 분주하였다: 1) 콜라겐 및 피브로넥틴으로 이루어진 수화되고 폴딩된 세포의 매트릭스; 또는 2) 비-수화되고 비폴딩된 세포의 매트릭스 (가변 조건이 평가됨).

[0261]

이어서 세포 샘플은 추출을 위해 사용된 (상기된) 배지에서 배양하였고 분해 효소 (콜라겐아제 및 하이알루로니다제)를 제거하였다.

[0262]

모든 조직 샘플은 37 °C, 5 % CO_2 , 85 % 상대 습도 및 10 % 산소에서 배양하였다.

[0263]

세포는 이어서 약한 효소 제거 공정을 사용한 치료에 이어서 세척하고 시험 용기로 전달함에 의해 배양 용기로부터 제거하였다.

[0264]

배양된 2개의 샘플에 대한 결과는 하기 표 9에 나타낸다. 상기 표에서, "개선된" 조건 (수화되고 폴딩된 ECM)은 통상의 조건 (비-수화되고 비폴딩된 ECM)과 비교한다. 세포 계수 및 세포 콜로니 크기 변화 및 최적화된 조건과 통상의 조건 간의 % 차이를 보고한다. 세포 콜로니 크기 변화는 픽셀로 보고한다.

표 9
수화된/폴딩된 ECM 대비-수화된/비폴딩된 ECM

측정 기준	수화된 및 폴딩된 (개선된)	비-수화된 대 비폴딩된 (통상적인)	차이 (개선된 것 대 통상적인 것)
세포 계수(생존하는 것만)	69,975	39,150	79%
세포 콜로니 크기 변화(픽셀)	194,095	50,103	287%

[0265]

[0266]

세포 계수와 세포 콜로니 크기 둘 다는 비-수화되고 비폴딩된 ECM으로 제조된 것과 비교하여, 수화되고 폴딩된 ECM을 사용하여 제조되었던 각각의 세포 샘플에서 보다 높다. 이들 결과는 따라서 생존 세포 샘플을 배양하는 경우 수화되고 폴딩된 ECM으로 코팅된 세포 배양 용기를 사용하는 우월성을 입증한다.