

一种药物筛选方法及其装置

- 5 本申请要求 2016 年 10 月 21 日提交的中国专利申请第 201610918458.4 号的优先权，通过援引将其全文内容并入本申请。

技术领域

- 10 本发明涉及离体药物筛选领域，尤其涉及一种抗肿瘤药物快速药敏检测方法及其装置。

背景技术

- 15 目前，个体化精准医疗被越来越多的应用在临床上，尤其是肿瘤治疗领域。化疗是目前对晚期转移性癌症患者的一种主要治疗方式，但化疗药物均缺乏肿瘤细胞特异性，在杀伤肿瘤细胞的同时，也杀伤大量骨髓及其他增殖旺盛正常细胞，有较严重的不良反应。同时传统的化疗方法在进行多次化疗后容易产生耐药性，这会影响化疗效果。由此针对患者个体化精准医疗需求越来越迫切。个体化精准医疗一方面提高治疗的精确性，另一方面也可以有效地降低患者用药的随机性和盲目性，从而减轻患者用药的伤害。近年来，一种患者来源的异种移植物模型（patient-derived xenograft model, PDX 模型）广泛应用于精准医疗中。北美已有多家大型临床医疗中心通过建立 PDX 模型来进行临床前药物研发和药物筛选以及指导癌症患者的个性化精准用药。
- 20 PDX 模型较好地保持了患者原发肿瘤的生物学特性。该模型是将患者新鲜的肿瘤组织直接移植到免疫缺陷小鼠（常用裸鼠或 SCID 小鼠）体内而建立的肿瘤模型，此类模型保持了与患者相似的遗传特性和肿瘤异质性。目前，运用 PDX 模型进行个体化精准医疗的主要难点在于模型建成周期与药敏测试花费时间长以及 PDX 模型的移植成瘤率较
- 25

低。例如原代细胞移植就需要 2~3 个月，而随后药物敏感性测试时间也需要 3~4 个月。另外，PDX 模型的操作技术要求很高，标本从手术室获得后需要外科医生、组织学家和研究者密切配合。因此，对 PDX 模型的抗肿瘤药物药敏检测方法进行改进是精准医疗领域中亟需解决的问题。

发明内容

为了克服以上传统 PDX 模型药敏测试存在的技术问题，发明人开发了一种快速精准检测抗肿瘤药物的药物敏感性的方法。

10 在本发明的一个方面提供了一种检测原代肿瘤细胞对抗肿瘤药物的药物敏感性的方法，包括以下步骤：

(1) 将原代肿瘤细胞置于植入装置中；

(2) 将包含所述原代肿瘤细胞的植入装置植入受试动物体内；

15 (3) 将待测药物施用于所述受试动物；

(4) 检测肿瘤细胞对待测药物的敏感性。

在一个实施方案中，所述原代肿瘤细胞来自离体肿瘤组织样品。所述的离体肿瘤样品可以获得自肿瘤患者，或者获得自利用肿瘤患者的肿瘤细胞构建的 PDX 模型。

20 在一个实施方案中，所述的受试动物为小鼠，优选裸小鼠。

在一个实施方案中，所述检测肿瘤细胞对待测药物的敏感性在体外进行。

在一个实施方案中，所述待测药物通过口服或胃肠外途径施用于所述受试动物。

25 在一个实施方案中，所述原代肿瘤细胞是经过消化和分选的分离的肿瘤细胞。

在一个实施方案中，所述检测肿瘤细胞对待测药物的敏感性在将待测药物施用于受试动物后 5-14 天，优选 5-7 天进行。

在一个实施方案中，所述植入装置优选是截留分子量约为 500,000

道尔顿的分子的管状装置，优选改良聚偏氟乙烯管，其内径优选约为1-2 mm。

本发明的另一方面提供了一种用于检测原代肿瘤细胞对抗肿瘤药物的药物敏感性的试剂盒，其包含一种植入装置，所述植入装置是截
5 留分子量约为 500,000 道尔顿的分子的管状装置，优选改良聚偏氟乙烯管，其内径优选约为 1-2 mm。在一个实施方案中，所述试剂盒用于实施本发明所述检测原代肿瘤细胞对抗肿瘤药物的药物敏感性的方法。

本发明的又一方面提供了本发明的试剂盒在检测原代肿瘤细胞对
10 于抗肿瘤药物的药物敏感性以及快速筛选抗肿瘤药物中的用途。

附图说明

图 1 为本发明方法的流程示意图。

图 2 为在小鼠传统 PDX 模型 GAPF155 中，给予抗肿瘤药物替吉奥
15 (S-1) 后患者来源的原代胃癌肿瘤细胞的生长曲线图。

图 3 为根据本发明的药敏检测方法，抗肿瘤药物替吉奥 (S-1) 对于来自小鼠 PDX 模型 GAPF155 的离体肿瘤组织中的胃癌肿瘤细胞的药效数据图。

图 4 为小鼠 PDX 模型 GAPF157 中，给予抗肿瘤药物替吉奥 (S-1)
20 后患者来源的原代胃癌肿瘤细胞的生长曲线图。

图 5 为根据本发明的药敏检测方法，抗肿瘤药物替吉奥 (S-1) 对于来自小鼠 PDX 模型 GAPF157 的离体肿瘤组织中的胃癌肿瘤细胞的药效数据图。

图 6 为小鼠 PDX 模型 GAPF161 中，给予抗肿瘤药物替吉奥 (S-1)
25 后患者来源的原代胃癌肿瘤细胞的生长曲线图。

图 7 为根据本发明的药敏检测方法，抗肿瘤药物替吉奥 (S-1) 对于来自小鼠 PDX 模型 GAPF161 的离体肿瘤组织中的胃癌肿瘤细胞的药效数据图。

图 8 为通过本发明的方法和试剂盒对来自患者的肺腺癌原代肿瘤

细胞进行药物敏感性检测的结果。

图 9 为通过本发明的方法和试剂盒对来自患者的十二指肠癌原代肿瘤细胞进行药物敏感性检测的结果。

5 发明详述

本发明涉及检测原代肿瘤细胞对抗肿瘤药物的药物敏感性的方法，其包括以下步骤：

- (1) 将原代肿瘤细胞置于植入装置中；
- (2) 将包含所述原代肿瘤细胞的植入装置植入受试动物体内；
- (3) 将待测药物施用于所述受试动物；
- (4) 检测肿瘤细胞对待测药物的敏感性。

原代肿瘤细胞在本文中指分离自离体肿瘤组织的肿瘤细胞。根据一个实施方案，所述的原代肿瘤细胞分离自肿瘤患者的肿瘤组织样品，包括但不限于临床切除的肿瘤组织，肿瘤组织活检样品等。根据另一个实施方案，所述的原代肿瘤细胞分离自 PDX 小鼠模型，所述 PDX 小鼠模型包含来自患者肿瘤组织的肿瘤细胞。

所述的肿瘤细胞可以来源于多种肿瘤类型的肿瘤组织，包括但不限于位于以下部位的肿瘤：消化道系统（例如胃，肠，十二指肠，结肠，胰腺，胆管，胆管等）、乳腺，肺，肝，内分泌腺（例如肾上腺、甲状旁腺、脑垂体、睾丸、卵巢、胸腺、甲状腺），泌尿和生殖系统（例如肾，膀胱，卵巢，睾丸，前列腺等），骨骼肌肉系统（例如骨，平滑肌，横纹肌等），神经系统（例如脑），皮肤，头颈部，血液系统等。例如所述的肿瘤细胞可为来源于胃癌，十二指肠癌，肺癌的肿瘤细胞。所述的肿瘤细胞可以是该部位肿瘤的任何类型的肿瘤细胞。

在一个实施方案中，本发明的原代肿瘤细胞是经过消化和分选分离的肿瘤细胞。在一个实施方案中，所述的消化通过如下方法进行：除去非肿瘤组织和坏死组织，将肿瘤样品切成小块，用 HBSS 冲洗并收集组织块，使用 1X 胶原酶 37℃ 消化肿瘤块 1-2 小时。在一个实施方

案中，所述的分选通过如下方法进行：用血清培养基 1:1 稀释终止消化，过 70 μm 筛网收集细胞悬液；1000rpm 离心 3 分钟去除上清，使用 10ml 含 1%FBS 的 PBS 重悬细胞，清洗，并调整细胞密度至 $1 \times 10^8/\text{ml}$ ；以 $20 \mu\text{l}/10^7$ 细胞的浓度加入 CD45 细胞分选磁珠和成纤维细胞分选磁珠，室温孵育 30min；加入含 1%FBS 的 PBS 清洗细胞，并用 2ml 1%FBS 的 PBS 重悬。将磁珠装在磁铁上，用含 1%FBS 的 PBS 对磁珠进行润洗；将细胞加入润洗过的磁柱中，待液体流尽，用 3ml 含 1%FBS 的 PBS 清洗两次柱子，收集流下的液体；收集的液体 1000rpm 离心 3 分钟去除上清，细胞培养液重悬，计数，调整细胞密度至 $1-10 \times 10^5/\text{ml}$ 。

10 构建 PDX 小鼠模型的方法是本领域已知的。例如参见 “Melanoma patient-derived xenografts accurately model the disease and develop fast enough to guide treatment decisions (黑素瘤患者来源的异种移植物精确模拟疾病并足够快地进展从而指导治疗决定)”，Oncotarget, Vol. 5, No. 20, Berglind O. Einarsdottir
15 等人，2014 年 9 月 8 日公开以及 “Personalizing Cancer Treatment in the Age of Global Genomic Analyses: PALB2 Gene Mutations and the Response to DNA Damaging Agents in Pancreatic Cancer (全球基因组分析时代的个性化癌症治疗：胰腺癌中的 PALB2 基因突变以及对 DNA 破坏剂的反应)”，Molecular Cancer Therapies, 首次公
20 开日 2010 年 12 月 6 日；DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-10-0893, Maria C. Villarroel 等人等文献。

本发明所述的待测药物可以是已知的抗肿瘤药物或其组合，新的抗肿瘤物或其组合，或者已知抗肿瘤药物的新组合。在本发明的方法中，所述的待测药物可以以固体、半固体或液体的形式使用，并可根
25 据需要以合意的施用频率施用所述待测药物。

本发明方法中将待测药物给药受试动物可通过口服给药、胃肠外给药(如通过静脉内、肌肉内、皮下注射或静脉内输注)、局部给药、吸入给药，透皮给药例如通过皮肤贴片、植入体、栓剂等进行。本领域技术人员将根据需要选择合意的给药途径。

本发明的一个实施方案中，检测肿瘤细胞对待测药物的敏感性在将待测药物施用于受试动物后 5-14 天，优选 5-7 天进行。本发明中检测肿瘤细胞对待测药物的敏感性可通过在体外进行药敏检测的方法进行，包括但不限于 ATP 检测法，MTT 法，BrdU 标记法，Ki67 染色法等。

5 本发明另一方面涉及一种用于本发明的方法中的植入装置。在一个实施方案中，所述植入装置是一种管状植入装置，优选其截留分子量约 500,000 道尔顿的分子。在一个优选实施方案中，所述管状植入装置是改良聚偏氟乙烯管，其截留分子量约 500,000 道尔顿的分子，
10 优选地所述改良聚偏氟乙烯管的内径约 1-2 mm。本发明的一个优选实施方案中，所述植入装置可植入受试动物的皮下。本领域技术人员将理解，可根据需要选择本领域已知的适宜植入方式。

 本发明另一方面还提供了一种试剂盒，其包含本发明所述的植入装置。在一个实施方案中，所述试剂盒包含内径为 1-2mm 的改良聚偏氟乙烯管，其截留分子量为 500,000 道尔顿的分子。在一个优选实施方案中，所述试剂盒还包含插入页，所述插入页包含使用该试剂盒的
15 使用方法说明。

 本发明的方法能够使得原代肿瘤细胞，尤其是经过消化和/或分选的分选的肿瘤细胞，在植入实验动物(例如小鼠)体内的植入装置中持续存活，并借助动物作为营养提供者，使得原代肿瘤细胞能够在受试
20 动物的体内环境中生长，并可在施用待测药物后根据需要通过在体外检测细胞的生长状态、凋亡状态和分化程度等，快速高效地获得药敏检测结果。经过验证，该方法与传统 PDX 所得到的药敏结果有极高的相关性。本发明可以结合体内和体外实验技术进行快速高效的抗肿瘤药物评价，极大地缩短了传统 PDX 模型的药效实验所需的时间，节约
25 了临床实验的成本。总之，本发明具有快速，操作便捷，费用低，可重复性强，易于推广的优点，尤其是实现了肿瘤细胞对于抗肿瘤药物的敏感性的快速且精准的检测。

具体实施方式

为了更好地说明本发明，下面参照附图予以说明。

实验动物

从供应商订购 4-5 周龄的雌性 Nu/Nu 小鼠（购自北京维通利华实验动物技术有限公司），饲养于 SPF 级别动物房，实验开始前动物至少适应性饲养三天。

样本的采集

取新鲜收集的临床肿瘤手术样本或包含患者肿瘤细胞的小鼠 PDX 样本于运输保存管中，冰上运输，在尽可能短的时间内运至实验室。

细胞消化与分选

在生物安全柜中去除非肿瘤组织和坏死组织后，将肿瘤样品切成 1-3 立方毫米小块，用 HBSS 冲洗并收集组织块，1000rpm 离心 3 分钟去上清，使用 1X 胶原酶（购自 Gibco）、37℃ 消化肿瘤块 1-2 小时；

用血清培养基（购自 Life Technologies）1:1 稀释终止消化并过 70 μ m 筛网收集细胞悬液；

1000rpm 离心 3 分钟去除上清，使用 10ml 含 1% 胎牛血清（FBS）的 PBS 重悬细胞并进行清洗后，将细胞重悬于含 1%FBS 的 PBS，计数，并调整细胞密度至 1×10^8 /ml；

以 20μ l/ 10^7 细胞的浓度加入商购 CD45 细胞分选磁珠（购自 Miltenyi Biotec）和成纤维细胞分选磁珠（购自 Miltenyi Biotec），室温孵育 30min；

加入含 1%FBS 的 PBS 清洗细胞，并用 2ml 1%FBS 的 PBS 重悬。同时将磁珠装在磁铁上，用含 1%FBS 的 PBS 对磁珠进行润洗；

将细胞加入润洗过的磁柱中，待液体流尽，用 3ml 含 1%FBS 的 PBS 清洗两次柱子，收集流下的液体；

收集的液体 1000rpm 离心 3 分钟去除上清，细胞培养液 PC-1（购自 Lonza）重悬，计数，调整细胞密度至 $1-10 \times 10^5$ /ml。

细胞装管、接种及活力检测

在生物安全柜中取出植入装置，即直径 1mm 的改良聚偏氟乙烯管，所述改良聚偏氟乙烯管经过乙醇的浸泡、冲洗和高压灭菌等预处理。截取每根管子约 2 cm 长度大小，用 PBS 反复冲洗 3-5 遍，
5 吹掉液体；

将肿瘤细胞悬液加入改良聚偏氟乙烯管中，密封；

用肿瘤穿刺针将改良聚偏氟乙烯管接种至实验小鼠背部皮下，并设置给药组和对照组，伤口用医用胶粘合，分别进行小鼠的给药处理；

10 给药后 5-14 天，处死小鼠，取出改良聚偏氟乙烯管通过 CellTiter-Glo 发光法通过对 ATP 进行定量测定来检测细胞活力。

数据分析

根据对照组肿瘤细胞的活力值，计算出给药组肿瘤细胞活力增殖
15 百分比（t/c%），进而评价相应药物的药效。

图 1 显示了本发明的抗肿瘤药物快速药效检测方法的流程图。首先，获得离体肿瘤组织，然后进行消化和分选，获得分离的肿瘤细胞，并将所述肿瘤细胞装至植入装置中，接种到动物（例如小鼠）皮下，将
20 待测药物施用于小鼠后 5-7 天后取出植入装置，进行肿瘤细胞活力测试。

图 2-7 显示了传统的 PDX 药效检测法与本发明的药效检测法的比较。
25

实施例

实施例 1

通过将来自患者的原代胃癌肿瘤细胞植入小鼠体内获得小鼠 PDX 模型 GAPF155。饲养 2 个月后，从 GAPF155 获得患者来源的胃癌细胞

样品。分别利用传统 PDX 方法和本发明的方法，检测 GAPF155 中的胃癌细胞对于 S-1 的敏感性（图 2 和图 3）。结果均显示所述肿瘤细胞对 S-1 敏感。

5 实施例 2

通过将来自患者的原代胃癌肿瘤细胞植入小鼠体内获得小鼠 PDX 模型 GAPF157。饲养 2 个月后，从 GAPF157 获得患者来源的胃癌细胞样品。分别利用传统 PDX 方法和本发明的方法，检测 GAPF157 中的胃癌细胞对于 S-1 的敏感性（图 4 和图 5）。结果均显示所述肿瘤细胞
10 对 S-1 敏感。

实施例 3

通过将来自患者的原代胃癌肿瘤细胞植入小鼠体内获得小鼠 PDX 模型 GAPF161。饲养 2 个月后，从 GAPF161 获得患者来源的胃癌细胞
15 样品。分别利用传统 PDX 方法和本发明的方法，检测 GAPF161 中的胃癌细胞对于 S-1 的敏感性（图 6 和图 7）。结果均显示所述肿瘤细胞对 S-1 不敏感。

通过传统 PDX 和通过本发明的方法获得的药效数据显示，S-1 对
20 于 GAPF155 模型中的肿瘤细胞（图 2 和 3）和 GAPF157 模型中的肿瘤细胞（图 4 和 5）均有很好的抗肿瘤活性，而 S-1 对于 GAPF161 模型中的肿瘤细胞（图 6 和 7）无明显抗肿瘤活性。通过传统 PDX 方法和通过本发明的方法获得的结果是一致的。

25 实施例 4

选择男性肺腺癌患者（60 岁）。医生根据肺腺癌临床经验选择用药方案为培美曲赛 (Pemetrexe)+顺铂。3 个疗程 9 周后，患者的病情出现复发转移。经患者知情同意后，从该肺腺癌患者采集胸水获得原代肿瘤细胞。

通过本发明的药敏检测方法，检测患者来源的原代肺腺癌肿瘤细胞对抗肿瘤药物的敏感性。实验结果表明，紫杉醇+顺铂方案对该患者的肿瘤样本表现出较强的抗肿瘤活性（图 8）。

调整方案后的治疗结果：

- 5 医生更换了用药方案，选择了紫杉醇+顺铂方案，用药 7 周，患者胸水消失，现病情稳定已出院。

实施例 5

- 10 选择男性十二指肠壶腹部肿瘤患者（56 岁）。经患者知情同意后，从该患者获得原代肿瘤组织。

根据本发明的方法进行药物筛选。结果显示：患者对治疗胰腺癌的吉西他滨反应良好（图 9）。

医生根据上述结果选定吉西他滨+顺铂治疗方案，患者病情得到控制。

15

下表 1 显示，本发明人通过本发明的方法对来自患者的多种原代肿瘤细胞进行了药物筛选：

表 1

癌细胞类型	筛选例数	癌细胞类型	筛选例数
肺癌	72	胃癌	14
胆管癌	28	胰腺癌	35
胆囊癌	19	肝癌	15
骨肉瘤	1	头颈癌	5
结肠癌	23	卵巢癌	3
脑胶质瘤	10	膀胱癌	2
十二直肠癌	3	滋养细胞瘤	4

食管癌	8	腺样囊腺癌	1
子宫内膜癌	3	睾丸癌	1
乳腺癌	4	前列腺癌	4
肛管癌	1	直肠癌	5
总数		261 (例)	

上述实施例仅仅是通过举例的方式描述。在不偏离本发明所附权利要求限定的保护范围的情况下，可有各种变体。

权 利 要 求 书

1、一种检测原代肿瘤细胞对抗肿瘤药物的药物敏感性的方法，包括以下步骤：

- 5 (1) 将原代肿瘤细胞置于植入装置中；
 (2) 将包含所述原代肿瘤细胞的植入装置植入受试动物体内；
 (3) 将待测药物施用于所述受试动物；
 (4) 检测肿瘤细胞对待测药物的敏感性。

10

2、权利要求 1 所述的方法，其中所述原代肿瘤细胞来自离体肿瘤组织样品。

3、权利要求 2 的方法，其中所述的离体肿瘤组织样品获得自肿瘤患者，或者获得自利用肿瘤患者的肿瘤细胞构建的 PDX 模型。

15

4、权利要求 1 至 3 中任一项的方法，其中所述的受试动物为小鼠，优选裸小鼠。

5、权利要求 1 至 4 中任一项的方法，其中检测肿瘤细胞对待测药物的敏感性在体外进行。

20

6、权利要求 1 至 5 中任一项的方法，其中所述待测药物通过口服或胃肠外途径施用于所述受试动物。

25

7、权利要求 1 至 6 中任一项的方法，其中所述原代肿瘤细胞是经过消化和/或分选的分离的肿瘤细胞。

8、权利要求 1 至 7 中任一项的方法，其中检测肿瘤细胞对待测药

物的敏感性在将待测药物施用于受试动物后 5-14 天, 优选 5-7 天进行。

- 9、权利要求 1 至 8 中任一项的方法, 其中所述植入装置是可截留分子量约 500,000 道尔顿的分子的管状装置, 优选改良聚偏氟乙烯管, 进一步优选内径约 1-2 mm 的改良聚偏氟乙烯管。

10、权利要求 1 至 9 中任一项的方法, 其中将所述植入装置植入受试动物的皮下。

- 10 11、一种用于检测原代肿瘤细胞对抗肿瘤药物的药物敏感性的试剂盒, 其包含一种植入装置, 所述植入装置是可截留分子量约 500,000 道尔顿的分子的管状装置, 优选改良聚偏氟乙烯管, 进一步优选内径约 1-2 mm 的改良聚偏氟乙烯管。

- 15 12、权利要求 11 的试剂盒, 其用于实施权利要求 1-9 的方法。

13、权利要求 12 的试剂盒在检测原代肿瘤细胞对于抗肿瘤药物的药物敏感性以及快速筛选抗肿瘤药物中的用途。

20