(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110312791 A
(43)申请公布日 2019.10.08

(21)申请号 201880010756.0

(22)申请日 2018.02.06

(30)优先权数据
62/455,881 2017.02.07 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2019.08.07

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2018/017081 2018.02.06

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2018/148208 EN 2018.08.16

(71)申请人 康宁股份有限公司
地址 美国纽约州

(72)发明人 H·A·谢曼

(74)专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司 31100
代理人 陶家蓉 杨昀

(51)Int.Cl.
C12N 5/09(2006.01)
C12Q 1/02(2006.01)

权利要求书2页 说明书18页 附图14页

(54)发明名称

用于免疫细胞和药物归巢,迁移和肿瘤细胞毒性的高通量3D测定

(57)摘要

本公开涉及用于进行治疗剂对肿瘤细胞的主动迁移和细胞毒性,例如免疫细胞和/或药物归巢,迁移和肿瘤细胞毒性的测定的方法。该方法在实验室器具中进行,其为治疗剂(例如免疫细胞或药物)提供向肿瘤细胞迁移的机会,所述肿瘤细胞包括以3D球状体构象生长的肿瘤细胞。除了其他用途之外,该方法还允许研究治疗剂(例如免疫细胞或药物)对肿瘤细胞的作用,并且能够在单一,容易使用的高通量系统中研究归巢,肿瘤细胞毒性和肿瘤免疫逃避,用于更类似体内的测试。

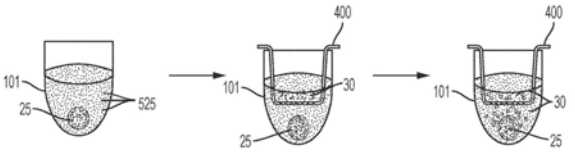


图 5A 图 5B 图 5C

CN 110312791 A

1.一种用于检测治疗剂的主动迁移和细胞毒性的测定方法,包括:

a)在细胞培养制品中培养肿瘤细胞以形成球状体,其中所述细胞培养制品包括经结构化以限制肿瘤细胞以3D球状体构象生长的腔室;

b)将包含多孔膜的插入物放入细胞培养物制品中并将治疗剂引入所述插入物中;

c)检测所述治疗剂从所述插入物向所述细胞培养制品腔室中的主动迁移;和

d)检测肿瘤细胞反应。

2.如权利要求1所述的测定方法,其中所述腔室包括:

侧壁;

顶部孔;和

包含至少一个凹面的液体不可渗透的底部,其中所述底部的至少一部分包含在至少一个凹面中或至少一个凹面上的低粘附或无粘附材料。

3.如权利要求1或2所述的测定方法,其中所述包含至少一个凹面的液体不可渗透的底部是透气的。

4.如权利要求2所述的测定方法,其中所述侧壁是不透明的。

5.如权利要求2-4中任一项所述的测定方法,其中所述底部是至少一部分是透明的。

6.如权利要求2-5中任一项所述的测定方法,其中所述细胞培养制品包括1至约2000个所述腔室,其中每个腔室与任何其他腔室物理分离。

7.如权利要求2-6中任一项所述的测定方法,其中所述至少一个凹面包括在同一腔室内的多个凹面。

8.如权利要求2-7中任一项所述的测定方法,其中所述至少一个凹面包括半球形表面,从侧壁到底表面具有30至约60度的锥度的锥形表面,或其组合。

9.如权利要求2所述的测定方法,其中所述侧壁包括垂直圆柱体,从腔室的顶部到底表面直径减小的垂直圆锥体的一部分,具有到所述至少一个凹形底表面的锥形过渡的垂直方轴,或其组合。

10.如权利要求2所述的测定方法,所述制品还包含用于接收用于抽吸的移液管尖端的腔室附件,所述腔室附件包括与腔室相邻并与腔室流体连通的表面,所述腔室附件具有间隔开并且在底表面上方的一定高度处的第二底部,其中所述第二底部使从移液管分配的流体偏离底表面。

11.如权利要求1-10中任一项所述的测定方法,其中所述插入物包括插入物板。

12.如权利要求1-11中任一项所述的测定方法,其中所述多孔膜的至少一部分构造成模拟血脑屏障。

13.如权利要求12所述的测定方法,其中所述多孔膜的至少一部分包括基本上汇合的单层微血管内皮细胞。

14.如权利要求1-13中任一项所述的测定方法,其中通过流式细胞术检测治疗剂的主动迁移和肿瘤细胞反应。

15.如权利要求1-14中任一项所述的测定方法,其中检测肿瘤细胞反应包括检测治疗剂向肿瘤细胞球状体中的浸润。

16.如权利要求1-15中任一项所述的测定方法,其中检测肿瘤细胞反应包括测量肿瘤细胞裂解。

17.如权利要求1-16中任一项所述的测定方法，其中所述治疗剂包括药物或细胞治疗剂。

18.如权利要求17所述的测定方法，其中所述治疗剂包括白细胞或淋巴细胞。

19.如权利要求1018中任一项所述的测定方法，其中所述治疗剂是药物。

用于免疫细胞和药物归巢,迁移和肿瘤细胞毒性的高通量3D测定

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请取决于并要求2017年2月7提交的美国临时申请第62/455,881号的优先权,其全部内容通过引用并入本文。

技术领域

[0003] 本公开一般涉及用于进行治疗剂对肿瘤细胞的主动迁移和细胞毒性,例如免疫细胞和/或药物归巢,迁移和肿瘤细胞毒性的测定的方法。该方法在实验室器具中进行,其为治疗剂(例如免疫细胞或药物)提供向肿瘤细胞迁移的机会,所述肿瘤细胞包括以3D球状体构象生长的肿瘤细胞。除了其他用途之外,该方法还允许研究治疗剂(例如免疫细胞或药物)对肿瘤细胞的作用,并且能够在单一,容易使用的高通量系统中研究归巢,肿瘤细胞毒性和肿瘤免疫逃避,用于更类似体内的测试。

技术背景

[0004] 传统上,利用肿瘤细胞二维系统(2D)(可能无法准确地反映三维(3D)肿瘤复杂性),或用3D肿瘤细胞模型(但没有迁移成分)研究细胞毒性独立研究了调查治疗剂的归巢和杀肿瘤活性以及肿瘤免疫逃避的体外模型。重要的是,免疫细胞和药物在3D肿瘤细胞系统中需要克服的屏障远远大于2D肿瘤细胞系统中的屏障。例如,免疫细胞不仅需要迁移到肿瘤部位,还需要渗透3D肿瘤结构以攻击靶肿瘤细胞。除了2D和3D系统之间的物理差异之外,已经表明当肿瘤细胞以3D培养时也会出现表型差异,这些表型差异允许更高的细胞毒性抗性。因此,尽管人们越来越关注通过激活患者自身免疫细胞(如T细胞,NK细胞,B细胞等)来攻击其肿瘤的治疗利用免疫细胞进行癌症治疗,但免疫治疗的有效性对于所有患者或癌症类型不尽相同,这导致需要为科学家和研究人员提供更好的模型。

[0005] 因此,存在对替代模型和方法的持续需求,以使得能够在单个易于使用的高通量系统中研究免疫细胞和药物归巢,肿瘤细胞毒性和肿瘤免疫逃避,用于更类似体内的测试。

发明内容

[0006] 根据本公开的各种实施方式,本文公开了用于测定治疗剂(包括免疫细胞和药物),以及它们对培养中以3D球状体构象中生长的肿瘤细胞的影响的方法和实验室器具。除了其他用途之外,该方法还允许研究治疗剂(例如免疫细胞或药物)对肿瘤细胞的作用,并且能够在单一,容易使用的高通量系统中研究归巢,肿瘤细胞毒性和肿瘤免疫逃避,用于更类似体内的测试。

[0007] 在各种实施方式中,公开了用于检测治疗剂的主动迁移和细胞毒性的测定方法。测定方法包括在细胞培养物品中培养肿瘤细胞以形成球状体,其中细胞培养物制品包括构造成限制肿瘤细胞以3D球状体构象生长的腔室。该测定方法还包括将包含多孔膜的插入物放入细胞培养物制品中并将治疗剂引入插入物中。该测定方法还包括检测治疗剂从插入物

到细胞培养物制品腔室的主动迁移并检测肿瘤细胞反应。在实施方式中，肿瘤细胞反应可以是肿瘤细胞裂解，治疗剂向肿瘤细胞球状体的浸润，或肿瘤细胞生理学变化的测量。

[0008] 在一些实施方式中，通过流式细胞术检测治疗剂的主动迁移和肿瘤细胞裂解。在一些实施方式中，测定方法还包括检测治疗剂(例如免疫细胞)向肿瘤细胞球状体的浸润。

[0009] 在一些实施方式中，治疗剂是细胞治疗剂和/或药物。在一些实施方式中，细胞治疗剂包括免疫细胞。在一些实施方式中，免疫细胞是白细胞。在一些实施方式中，免疫细胞是淋巴细胞。

[0010] 在用于检测治疗剂的主动迁移和细胞毒性的测定方法的一些实施方式中，细胞培养制品的腔室包括侧壁，顶部孔和包含至少一个凹面的液体不可渗透的底部。在实施方式中，底表面的至少一部分包括在至少一个凹面中或上的低粘附或无粘附材料。在一些实施方式中，包括至少一个凹面的液体不可渗透的底部是透气的。在一些实施方式中，侧壁是不透明的。在一些实施方式中，底部的至少一部分是透明的。

[0011] 在用于检测治疗剂的主动迁移和细胞毒性的测定方法的一些实施方式中，细胞培养制品包括1至约2000个所述腔室，其中每个腔室与任何其他腔室物理分离。在一些实施方式中，腔室的至少一个凹面包括在同一腔室内的多个凹面。

[0012] 在用于检测治疗剂的主动迁移和细胞毒性的测定方法的一些实施方式中，细胞培养制品的腔室的至少一个凹面包括半球形表面，从侧壁到底表面具有30至约60度的锥度的锥形表面，或其组合。

[0013] 在用于检测治疗剂的主动迁移和细胞毒性的测定方法的一些实施方式中，细胞培养制品的腔室的侧壁表面包括垂直圆柱体，从腔室的顶部到底部表面直径减小的垂直圆锥体的一部分，具有到所述至少一个凹形底表面的锥形过渡的垂直方轴，或其组合。

[0014] 在用于检测治疗剂的主动迁移和细胞毒性的测定方法的一些实施方式中，细胞培养制品还包括用于接收用于抽吸的移液管尖端的腔室附件，腔室附件包括与腔室相邻并与腔室流体连通的表面，腔室附件具有间隔开并且在底表面上方的一定高度处的第二底部，其中第二底部使从移液管分配的流体偏离底表面。

[0015] 在用于检测治疗剂的主动迁移和细胞毒性的测定方法的一些实施方式中，插入物包括插入板。

[0016] 在用于检测治疗剂的主动迁移和细胞毒性的测定方法的一些实施方式中，至少一部分多孔膜被配置为模拟生物屏障。在一些实施方式中，生物屏障是血脑屏障。在一些实施方式中，多孔膜的至少一部分包括基本上汇合的单层微血管内皮细胞。

[0017] 在以下的具体实施方式中提出了本公开主题的其他特征和优点，其中的部分特征和优点对本领域的技术人员而言根据所作描述即容易理解，或者通过实施包括以下具体实施方式、权利要求书以及附图在内的本文所述的本公开主题而被认识。

[0018] 应理解，前面的一般性描述和以下的具体实施方式给出了本公开主题的实施方式，并且旨在用来提供理解要求保护的本公开主题的性质和特性的总体评述或框架。包括的附图提供了对本公开的主题的进一步理解，附图并入本说明书中并构成说明书的一部分。附图例示了本公开的主题的各个实施方式，并与说明书一起对本公开的主题的原理和操作进行阐述。此外，附图和说明书仅仅是示例性的，并不试图以任意方式限制权利要求的范围。

附图说明

[0019] 当结合以下附图阅读时，可对下文本公开的具体的实施方式的详细描述有最好的理解，附图中相同的结构用相同的附图标记表示，其中：

[0020] 图1A，图1B和图1C显示了多孔微孔板的实施方式，在这种情况下是96孔球状体微孔板，在每个孔的底表面上具有微腔阵列，以在96孔中的每一孔中提供多个球状体。图1A显示了多孔微孔板。图1B显示了多孔板的单个孔。图1C是图1B中的框C中所示的单孔的底表面的区域的分解图。

[0021] 图2是微腔阵列的图示。

[0022] 图3A和图3B显示了球状体微孔板的实施方式，在这种情况下是96孔板，其具有圆底，其构造成在96个孔中的每个孔中包含单个球状体。

[0023] 图4A和4B是插入物的透视图。图4C是插入板和相关的多孔板的图。

[0024] 图5A，5B和5C示出了本文公开的方法的实施方式。

[0025] 图6是显示根据图4B中所示的实施方式，NK细胞向3D培养的A549/GFP肿瘤细胞迁移的图。

[0026] 图7是显示根据图4B中所示的实施方式3D培养的A549/GFP肿瘤细胞的NK诱导的细胞毒性的图。

[0027] 图8A，8B，8C，8D，8E，8F和8G是本文公开的方法的说明。

[0028] 图9是显示用化合物顺铂和荜茇酰胺(Piperlongumine)直接培养48小时后LN229球状体的剂量依赖性细胞毒性的图。每个浓度N＝12个孔形成2个独立研究。

[0029] 图10A是显示荧光黄渗透性的图，图10B是显示在血脑屏障(BBB)模型中在96HTS Transwells上培养5天后罗丹明123(Rh123)渗透性数据的图。N＝120来自3次独立研究。

[0030] 图11是显示具有或不具有血脑屏障替代物的LN229细胞毒性的图。通过含或不含BBB的Transwells药物暴露2小时后48小时LN229球状体的活力百分比。通过将无药物对照标准化至100％活力来评估活力。数据显示为3次独立研究的平均值，N＝30，单因素方差分析(1way ANOVA)与Boneferroni的后检验。***＝$p<0.0001$。

[0031] 图12A和图12B是显示具有或不具有血脑屏障替代物的LN229细胞毒性的图。通过含(图12B)或不含BBB(图12A)的Transwells药物暴露2小时后48小时LN229球状体的活力百分比。通过将无药物对照标准化至100％活力来评估活力。数据显示为3次独立研究的平均值，N＝30，单因素方差分析与Boneferroni的后检验。***＝$p<0.0001$。

[0032] 图13A和图13B是图12A和图12B的筛选概要的图，显示了使用和不使用BBB发现的命中的汇编。如果结果在3个独立筛选中的至少2个中低于缓冲反应3个西格玛，则结果被认为是“命中”。具有水平影线的框(除了仅缓冲之外)是仅在没有BBB的情况下发现的命中。具有对角影线的框是在有和没有BBB的情况下发现的命中。

具体实施方式

[0033] 下面将对本公开的主题的各个实施方式进行更详细的描述，其中的一些实施方式例示于附图中。图中使用的相同附图标记表示相同的部分、步骤等。但应理解，在特定的附图中使用附图标记表示一部分并不会对另一附图中用相同附图标记标出的部分构成限制。另外，使用不同的数字来表示组件并不意味着不同的编号的组件不能与其他编号的组件相

同或类似。

[0034] 特定实施方式的以下描述本质上仅是示例性的，并且决不旨在限制本发明的范围，其应用或用途，当然，这些范围可以变化。结合本文包括的非限制性定义和术语描述本发明。这些定义和术语不是设计用于限制本发明的范围或实践，而是仅出于说明性和描述性目的而给出。除非另外定义，本文中所使用的所有术语(包括技术和科学术语)的含意与本发明所属领域普通技术人员通常所理解的相同。将进一步理解，诸如在常用词典中定义的那些术语应被解释为具有与其在相关领域和本公开的上下文中的含义一致的含义，并且除非在此明确定义，将不被解释为理想化的或过于正式的含义。

[0035] 定义

[0036] 除非上下文另外清楚地说明，否则，本文所用的单数形式“一个”、“一种”以及“该/所述”包括复数指代。因此，例如，提到的一个“结构化底表面”包括具有两个或更多个这样的“结构化底表面”的实例，除非文中有另外的明确表示。

[0037] 如本说明书和所附权利要求书所用，“或”字通常在其包括“和/或”的含义上使用，除非文中有明确的相反表示。术语“和/或”表示所列出的要素中的一个或全部或者所列出的要素中的任何两个或多个元素的组合。

[0038] 在本文中，“有”、“具有”、“含有”、“包括”、“包含”、“含”、“拥有”等在其开放含义上使用，通常表示“包括但不限于”、“包含但不限于”或“含有但不限于”。

[0039] “任选”或“任选地”表示随后描述的事件、情形或部分可能发生，也可能不发生，而且该描述包括事件、情形或部分发生的情况和不发生的情况。

[0040] 术语“优选”和“优选地”是指能够在特定条件下产生某些益处的本公开的实施方式。然而，在相同条件或其它条件下，其它实施方式也可以是优选的。此外，一个或多个优选实施方式的描述并不意味着其它实施方式是不可用的，也无意于将其他实施方式排除在本发明技术公开的范围之外。

[0041] 本文中，范围可以表示为从“约”一个具体值开始和/或至“约”另一个具体值终止。当表述这种范围时，实例包括自某一具体值始和/或至另一具体值止。类似地，当使用先行词“约”表示数值为近似值时，应理解，具体数值构成了另一个方面。将进一步理解，每个范围的端点相对于另一个端点都是重要的，并且独立于另一个端点。

[0042] 同样，在本文中，通过端点引用数字范围包括该范围内包含的所有数字(例如，1-5包括1、1.5、2、2.75、3、3.80、4、5等)。还应理解，本说明书全文中给出的每个数值范围包括落入所述较宽数值范围的每个较窄数值范围，如同本文中明确写明这些较窄数值范围。当值的范围“大于”、“小于”等特定值时，该值包含在该范围内。

[0043] 本文所用的任何方向，如“顶部”、“底部”、“左”、“右”、“上”、“下”、“以上”、“以下”和其他方向和取向用于清楚参考附图并且不显示实际装置或系统或该装置或系统的使用。本文描述的许多装置，制品或系统可以在许多方向和取向上使用。本文中关于细胞培养装置使用的定向描述符通常指的是当装置被定向以便在装置中培养细胞时的方向。

[0044] 还应注意本文中涉及将部件“构造成”或使其“适于”的描述以特定的方式起作用。就这方面而言，将该部件“构造成”或使其“适于”是为了具体表现特定的性质，或者以特定的方式起作用，这样的描述是结构性的描述，而不是对预期使用的描述。更具体而言，本文所述的将部件“构造成”或使其“适于”的方式表示该部件现有的物理条件，因此可以将其看

作该组件的结构特征的限定性描述。

[0045] 如本文所用，术语“细胞培养物”是指细胞的任何体外培养物。在该术语中包括连续细胞系(例如具有永生表型)，原代细胞培养物，有限细胞系(例如未转化的细胞)和体外维持的任何其他细胞群，包括卵母细胞和胚胎。

[0046] 如本文所用，术语“体外”是指人工环境以及在人工环境内发生的过程或反应。体外环境可以由但不限于试管和细胞培养物组成。术语“体内”是指自然环境(例如动物或细胞)和在自然环境中发生的过程或反应。

[0047] 如本文所用，术语“细胞培养制品”是指可用于培养细胞的任何容器，包括提供细胞培养环境的板，孔，烧瓶，多孔板，多层烧瓶，灌注系统。

[0048] 在实施方式中，“孔”是以多孔板形式提供的单个细胞培养环境。在实施方式中，孔可以是4孔板，5孔板，6孔板，12孔板，24孔板，96孔板，1536孔板或任何其它多孔配置的孔。

[0049] 如本文所用，“构建以限制感兴趣的细胞以3D构象生长”的腔室或孔等意指具有维度或处理，或维度和处理的组合的孔，其促进培养中的细胞以3D或球状体构象而不是二维细胞片生长。例如，处理包括用低结合溶液处理，使表面疏水性降低的处理，或灭菌处理。

[0050] 如本文所用，“结构化以提供”或“构造以提供”意指制品具有提供所述结果的特征。

[0051] 在实施方式中，单个“球状体孔”可以是多孔板的孔，其被结构化以约束感兴趣的细胞在该单个球状体孔中作为单个3D细胞团或单个球状体生长。例如，96孔板的孔(传统96孔板的孔深约10.67mm，顶部孔径约6.86mm，孔底直径约6.35mm。

[0052] 在实施方式中，“球形体板”是指具有单球形体孔阵列的多孔板。

[0053] 在实施方式中，孔可以具有“微腔”阵列。在实施方式中，“微腔”可以是例如限定上孔和最低点，上孔的中心以及上孔的中心和最低点之间中心轴的微孔。在实施方式中，孔绕轴旋转对称(即，侧壁是圆柱形的)。或者，在实施方式中，孔可以是六边形，如图1C所示，或任何其他几何形状。在一些实施方式中，上孔限定穿过上孔的距离在250μm至1mm之间，或者在那些测量内的任何范围。在一些实施方式中，从上孔到最低点(深度“d”)的距离在200μm和900μm之间，或者在400和600μm之间。微腔阵列可具有不同的几何形状，例如，抛物线形，双曲线形，V形和横截面几何形状，或其组合。

[0054] 在实施方式中，“微腔球状体板”是指具有孔阵列的多孔板，每个孔具有微腔阵列。

[0055] 在实施方式中，孔或微腔的“圆底”可以是例如半球，或半球的一部分，例如构成孔或微腔底部的半球的水平部分或切片。

[0056] 在实施方式中，术语“3D球状体”或“球状体”可以是例如培养中的细胞球，其不是平坦的二维细胞片。术语“3D球状体”和“球状体”在本文中可互换使用。在实施方式中，球状体由单细胞类型或多细胞类型组成，其直径为例如约100至约500微米，更优选约150至约400微米，甚至更优选约150至约300微米，最优选约200至约250微米，包括中间值和范围，这取决于例如球状体中的细胞类型。球状体直径可以是，例如，约200至约400微米。球状体的最大尺寸通常受扩散考虑因素的限制(关于球状体和球状体容器的综述，参见Achilli,T-M,等,Expert Opin.Biol.Ther.(2012)12(10))。

[0057] 如本文所用，“肿瘤细胞”是指从肿瘤中分离的任何细胞，其来源于肿瘤或当注射入动物时引起肿瘤，或衍生自当注射入动物时引起肿瘤的细胞。肿瘤细胞可以是从动物(包

括人)获得的原发性肿瘤细胞,或肿瘤细胞可以是细胞系或基因工程改造的细胞。

[0058] 如本文所用,“插入物”意指契合球状体板或微腔球状体板的孔的细胞培养孔。插入物具有侧壁和底表面,其限定用于培养细胞的腔。底表面是多孔的,以允许细胞或化学物质迁移通过多孔底表面以影响以3D构象生长的感兴趣的细胞。

[0059] 如本文所用,“插入板”是指包含插入物阵列的插入板,所述插入物阵列被结构化以契合多孔板的孔阵列。

[0060] 如本文所用,“治疗剂”是指针对期望的,通常有益的或治疗性的效果选择的任何生物活性物质。治疗剂可包括,例如但不限于,通常称为“药物”的低分子量治疗剂,包括所有类别的作用,包括但不限于:抗肿瘤剂,免疫抑制剂,免疫刺激剂,抗增殖剂,抗血栓剂,抗血小板,抗脂质剂,抗炎剂,抗生素,血管生成剂,抗血管生成剂,维生素,ACE抑制剂,血管活性物质,抗有丝分裂剂,金属蛋白酶抑制剂,NO供体,雌二醇,抗硬化剂,激素,自由基清除剂,毒素,烷化剂,单独或组合使用。治疗剂还可以包括,例如但不限于,生物制剂,包括但不限于:肽,脂质,蛋白质药物,蛋白质偶联物药物,酶,寡核苷酸,核酶,遗传物质,朊病毒,病毒和细菌。

[0061] 如本文所用,“细胞治疗剂”是指可能对另一种细胞有影响的任何细胞。细胞治疗剂可以通过接触感兴趣的细胞,提供影响感兴趣的细胞的环境,吞噬感兴趣的细胞(吞噬作用),排出或以其他方式提供影响感兴趣的细胞的化学物质,破坏3D细胞团起作用,或以其他方式影响感兴趣的细胞。

[0062] 除非另有表述,否则都不旨在将本文所述的任意方法理解为需要使其步骤以具体顺序进行。因此,如果方法权利要求实际上没有陈述为其步骤遵循一定的顺序,或者其没有在权利要求书或说明书中以任意其他方式具体表示步骤限于具体的顺序,则都不旨在暗示该任意特定顺序。在任一项权利要求中所述的任何单个或多个特征或方面可以结合任一项或多项其他权利要求中所述的任何其他特征或方面或与任一项或多项其他权利要求中所述的任何其他特征或方面置换。

[0063] 虽然使用过渡语“包含”可以公开特定实施方式的各个特征、元素或步骤,但是应理解的是,这暗示了包括可采用过渡语“由……构成”或“基本上由……构成”描述在内的替代性实施方式。

[0064] 本公开尤其描述了用于测定治疗剂(包括免疫细胞和药物),以及它们对培养中以3D球状体构象生长的肿瘤细胞的作用的方法和实验室器具。除了其他用途之外,该方法还允许研究治疗剂(例如免疫细胞或药物)对肿瘤细胞的作用,并且能够在单一,容易使用的高通量系统中研究归巢,肿瘤细胞毒性和肿瘤免疫逃避,用于更类似体内的测试。与用于免疫细胞迁移和侵袭测定的利用2D培养的肿瘤细胞的大多数当前高通量模型不同,该模型使得3D肿瘤球状体成分能够进行更类似体内的测试。

[0065] 在各种实施方式中,公开了用于检测治疗剂的主动迁移和细胞毒性的测定方法。测定方法包括在细胞培养物品中培养肿瘤细胞以形成球状体,其中细胞培养物制品包括构造成限制肿瘤细胞以3D球状体构象生长的腔室,例如孔。该测定方法还包括将包含多孔膜的插入物放入细胞培养物制品中并将治疗剂引入插入物中。该测定方法还包括,在一段时间后,检测治疗剂从插入物到细胞培养物制品腔室的主动迁移并检测肿瘤细胞裂解。通过组合这种细胞培养制品和包含多孔膜的插入物,产生了在单一高通量测定中研究3D癌症和

免疫细胞相互作用的模型。与用于免疫细胞迁移和侵袭测定的利用2D培养的肿瘤细胞的大多数当前高通量模型不同，该模型使得3D肿瘤球状体成分能够进行更类似体内的测试。用于高通量3D肿瘤球状体形成和细胞毒性测定的替代模型与这些测定的迁移和侵入组分的可渗透支持物不相容。因此，该模型能够在单个易于使用的高通量系统中研究免疫细胞和/或药物归巢，肿瘤细胞毒性和肿瘤免疫逃逸。

[0066] 三维模式，如球状体培养的细胞，可以比以单层培养在二维模式中培养的对应物表现出更多的体内样功能性。在二维细胞培养系统中，细胞可附着到其上培养它们的基材上。然而，当细胞以三维模式(例如球状体)生长时，细胞彼此相互作用而不是附着于基材。在细胞通信和细胞外基质的发展方面，以三维模式培养的细胞更接近体内组织。例如，传统上，通过利用在二维(2D)中生长的细胞独立地研究杀肿瘤活性和免疫逃避，这可能不能准确地反映3D系统中肿瘤的复杂性。免疫细胞需要在3D系统中克服的屏障，并且体内系统是3D系统，远远大于2D系统中的那些屏障。免疫细胞不仅需要迁移到肿瘤部位，还需要渗透3D结构以攻击靶细胞。此外，除了2D和3D系统之间的物理差异之外，已经表明当肿瘤细胞以3D培养时也会出现表型差异，这些表型差异允许更高的细胞毒性抗性。因此，肿瘤细胞球状体为细胞迁移、分化、存活和生长提供了优越的模型，因此为诊断相关研究，包括药物疗效、药理学和毒性测试提供了更好的系统。

[0067] 现在参考图3A和图3B，显示了细胞培养制品的一个实施方式，其包括结构化以限制肿瘤细胞以3D球状体构象生长的腔室，例如球状体板。图3A显示了球状体板11的实施方式，在这种情况下是96孔板，其具有圆底119，其构造成在96个孔中的每个孔中包含单个球状体。虽然通常这些板以孔101的顶部孔118朝上的状态使用，但是在图3A中，板被颠倒地示出以显示孔101的底部结构。图3B是具有框架130，多个孔101，每个孔具有顶部孔118，侧壁121和液体不可渗透的凹形弓形底表面119的球状体微孔板实施方式的图示。在每个单独的孔101的底部示出了3D肿瘤细胞球状体25。在实施方式中，框架130可以将孔的底部保持在诸如实验室工作台或桌子的表面上方。在一些实施方式中，可以在孔119的底部和板下方的表面之间存在空气空间。在实施方式中，空气空间可以与外部环境连通，或者可以是封闭的。

[0068] 在实施方式中，腔室的至少一个凹弧形底表面可以具有例如在同一孔内的多个相邻的凹弧形底表面。或者，如图1所示，多孔板可具有平坦底表面的孔，平底表面具有相邻凹弧形底表面的阵列或同一孔内的微腔。在实施方式中，细胞培养制品可以是，例如，具有许多“球形孔”的单孔或多孔板构造，例如每个孔的底部或基底中的多个凹坑或凹陷，例如微腔球状体板。每个腔室的多个球状体或球状体孔可以优选地容纳例如每个球状体孔单个或一个球状体。

[0069] 现在参考图1A，图1B和图1C，显示了微腔球状体板的实施方式，在这种情况下是96孔微腔球状体板，在每个孔的底表面上具有微腔阵列，以在96孔中的每一孔中提供多个球状体。图1A示出了具有孔阵列101的多孔板10。图1B示出了图1A的多孔板10的单孔101。单孔101具有顶部孔118，底表面106和侧壁113。图1C是图1B中的框C中所示的孔101的底表面106的区域的分解图，示出了图1B中所示的单孔的底表面中的微腔阵列112。微腔112阵列中的每个微腔115具有侧壁121和底表面116。图1A，图1B和图1C中所示的微腔球状体板可用于在多孔板的每个单独孔的每个微腔中生长3D球状体，该微腔球状体板在每个单独的孔101的

底部提供微腔阵列112。通过使用这种类型的容器，使用者可以在多孔板的每个孔中生长大量球状体，从而提供大量可以在相同培养和实验条件下处理的球状体用于本文提供的测定。

[0070] 现在参考图2，显示了微腔阵列112的图示。图2示出了孔115，每个孔具有顶部孔118，底表面119，深度d，和由侧壁121限定的宽度w。如图2所示，微腔阵列具有圆底119。在实施方式中，微腔的底表面可以是圆形或圆锥形，有角度的，平底的，或适于形成3D肿瘤球状体的任何形状。在实施方式中，微腔具有圆形底部。当垂直侧壁过渡到圆底119时，圆底119可以具有过渡区120。这可以是平滑或成角度的过渡区。在实施方式中，“微腔”可以是例如限定上孔118和最低点116，上孔的中心以及上孔的中心和最低点之间中心轴105的微孔115。在实施方式中，孔绕轴旋转对称(即，侧壁是圆柱形的)。或者，孔可以具有其他几何形状，例如六边形。在一些实施方式中，上孔限定穿过上孔的距离(宽度w)在250μm至1mm之间，或者在那些测量内的任何范围。在一些实施方式中，从上孔到最低点(深度“d”)的距离在200μm和900μm之间，或者在400和600μm之间。微腔阵列可具有不同的几何形状，例如，抛物线形，双曲线形，V形和横截面几何形状，或其组合。在实施方式中，微腔可以在其下方具有保护层130，以保护它们免于与诸如实验室工作台或桌子的表面直接接触。在一些实施方式中，可以在孔119的底部和保护层之间提供空气空间110。在实施方式中，空气空间110可以与外部环境连通，或者可以是封闭的。

[0071] 在实施方式中，具有至少一个凹弧形底表面或“杯”的腔室的底表面可以是例如半球形表面，具有圆形底部的锥形表面，以及类似的表面几何形状，或者组合它们。腔室(例如孔)和腔室底部(例如，孔底部或微腔底部)最终在对球状体“友好的”圆形或弯曲表面(例如凹坑，凹陷等凹形圆锥形表面或其组合)中终止，结束或见底。在实施方式中，细胞培养制品的腔室的至少一个凹面包括半球形表面，从侧壁到底表面具有30至约60度的锥度的锥形表面，或其组合。在一些实施方式中，所述至少一个凹弧形底表面可以是例如半球的一部分，例如半球的水平部分或切片，其直径为例如约250至约5000微米(即，0.010至0.200英寸)，包括中间值和范围，取决于例如所选择的孔几何形状，每个孔内凹弧形表面的数量，板中孔的数量等。其他凹弧形表面可以具有例如抛物线形，双曲线形，V形等截面几何形状或其组合。

[0072] 在实施方式中，包含腔室(例如，球状体板或微腔球状体板)的细胞培养制品可以进一步包括在腔室的一部分(例如至少一个凹面和/或一个或多个侧壁)上的低粘附性，超低粘附性或无粘附性涂层。非粘附材料的实例包括全氟化聚合物、烯烃或类似聚合物或其混合物。其它实例包括琼脂糖、非离子水凝胶如聚丙烯酰胺、或聚醚如聚环氧乙烷或多元醇如聚乙烯醇、或类似物质或其混合物。

[0073] 在实施方式中，侧壁表面(即，环绕件)可以是例如垂直圆柱或轴，从腔室顶部到腔室底部的直径减小的垂直圆锥的一部分，具有锥形过渡的垂直方轴或垂直椭圆轴，即在所述孔的顶部的正方形或椭圆形，过渡到圆锥形，并且以具有至少一个凹形弧形表面(即，圆形或弯曲形或其组合)的底部结束。其他说明性几何形状示例包括多孔圆柱，多孔圆锥圆柱，先圆柱后圆锥，以及其他类似几何形状或其组合。

[0074] 例如，低附着基底中的一个或多个，细胞培养制品腔室的主体和基部中的孔曲率，和重力可以诱导肿瘤细胞自组装成球状体。肿瘤细胞保持分化的细胞功能，指示相对于以

单层生长的细胞而言更像体内的响应。在实施方式中，球状体可以是基本上球形的，其直径为例如约100至约500微米，更优选约150至约400微米，甚至更优选约150至约300微米，最优选约200至约250微米，包括中间值和范围，这取决于例如球状体中的细胞类型。球状体直径可以是，例如约200至约400微米，并且上部直径受扩散考虑因素的限制。

[0075] 在实施方式中，细胞培养制品还可包括不透明侧壁和/或透气且不透液体的底部，其包括至少一个凹面。在一些实施方式中，包括至少一个凹面的底部的至少一部分是透明的。具有这些特征的孔板可以为本公开的方法提供若干优点，包括不需要将肿瘤细胞球状体从一块多孔板(其中形成球状体并且可以可视化)转移到另一块板以进行测定(例如，测量裂解和治疗剂的迁移)，因此节省时间并避免任何不必要的球状体破坏。此外，透气底部(例如，由具有特定给定厚度的透气性的聚合物制成的孔底部)可以使肿瘤球状体接受增加的氧合作用。示例性的透气底部可以由一定厚度的全氟化聚合物或例如聚4-甲基戊烷的聚合物形成。透气性聚合物的代表性厚度和范围可以是，例如，约0.001英寸至约0.025英寸，0.0015英寸至约0.03英寸，包括中间值和范围(其中1英寸＝25400微米;0.000039英寸＝1微米)。另外或替代地，具有高透气性的其他材料，例如聚二甲基硅氧烷聚合物，可以在例如厚达约1英寸的厚度下提供足够的气体扩散。

[0076] 在实施方式中，细胞培养制品还可包括腔室附件，腔室延伸区域或辅助侧腔室，用于接收用于抽吸的移液管尖端，腔室附件或腔室延伸部(例如，侧袋)可以是，例如，与腔室相邻并与腔室流体连通的整体表面。腔室附件可具有与腔室的液体不可渗透的底部间隔开的第二底部。腔室附件和腔室附件的第二底部可以例如与腔室的液体不可渗透的底部间隔开，例如在较高的高度或相对高度处。腔室附件的第二底部使从移液管分配的流体偏离腔室的液体不可渗透的底部，以避免破坏或干扰球状体。

[0077] 用于检测治疗剂的主动迁移和细胞毒性的测定方法还包括将包含多孔膜的插入物放入细胞培养制品中并将治疗剂引入插入物中。在实施方式中，包括多孔膜的插入物可位于腔室的一部分内，位于腔室附件的一部分内，或同时位于腔室和腔室附件的一部分内。包含多孔膜的插入物提供位于腔室上部，位于由多孔膜形成的腔室上部，或者两个腔室上部的治疗剂(例如免疫细胞或药物)与靠近透明底部的一个或两个腔室的下部中的肿瘤细胞球体的(至少最初)隔离或分离。

[0078] 图4A和图4B是插入物400的透视图。图4A和图4B中所示的插入物400是Corning®Transwell®插入物。如图4A和图4B所示，插入物具有顶部孔418，侧壁421和底表面419，形成腔420。如图4C所示，这些插入物400可以设置在插入板401的构造中，其中单块板401包含多个插入物400，并且多孔插入板被结构化成插入多孔板11中的互补孔阵列中。插入物可以许多构型获得。在实施方式中，这些插入物具有多孔的底表面，其具有足够的多孔性以允许诸如药物，蛋白质，载剂或其他物质的小分子穿过底表面119，而细胞不会穿过。在另外的实施方式中，插入物具有多孔底表面419，其具有足够直径的孔以允许细胞(例如包括免疫细胞的细胞治疗剂)迁移通过底表面。

[0079] 插入物的多孔膜可以由各种不同的材料制成，包括但不限于跟踪蚀刻膜或编织或非编织多孔材料。可以处理或涂覆多孔膜的材料以使其更粘附或更不粘附于细胞，或者可以处理或涂覆任何其它需要的涂层以支持细胞培养。可以通过本领域已知的任何数量的方法来实现处理，这些方法包括等离子体放电，电晕放电，气体等离子体放电，离子轰击，电离

辐射和高强度UV光。可以通过本领域已知的任何合适的方法引入涂层，包括印刷，喷涂，冷凝，辐射能，电离技术或浸渍。然后涂层可以提供共价或非共价附着位点。这些位点可用于附着部分，例如细胞培养组分(例如，促进生长或粘附的蛋白质)。此外，涂层还可用于增强细胞(例如，聚赖氨酸)的附着。或者，如上所述的细胞非粘附涂层可用于预防或抑制细胞结合。多孔膜可以是γ灭菌的。这种插入物通常可从Corning®（Transwell®）或Millipore®（Millicell®或Ultracell®)获得。

[0080] 在某些方面，可以处理或涂覆多孔膜，使得多孔膜的至少一部分被构造成模拟血脑屏障(BBB)，如本领域中已知的。在一些实施方式中，多孔膜的至少一部分包括基本上汇合的单层微血管内皮细胞，例如但不限于微血管内皮细胞。在一些实施方式中，微血管内皮细胞是脑内皮细胞。在一些实施方式中，包括微血管内皮细胞的内皮细胞与星形胶质细胞和/或周细胞组合使用。这样的模型可用于研究脑癌，由于BBB，脑癌是最难治疗的癌症之一，BBB作为大脑自身的防御系统起作用。BBB旨在保护大脑免受潜在毒素的侵害，通常会阻止常规疗法(如化疗)到达脑肿瘤。传统上，通过体外BBB的化合物渗透性的高通量测试限于放射性或荧光团标记的化合物在它们通过在可渗透的支持系统上生长的细胞单层时的测定。不幸的是，标记物本身可能影响测定，并且必须独立研究确定所得肿瘤细胞毒性的能力。本文公开的方法和数据证明了用于研究治疗剂(例如，细胞治疗剂，药物或生物剂)的BBB转运以及治疗剂的所得脑肿瘤细胞毒性，以及能够在单个易于使用的高通量系统中进行归巢，肿瘤细胞毒性和肿瘤免疫逃避的研究的三维(3D)模型，用于更类似体内的试验。与用于免疫细胞迁移和侵袭测定的利用2D培养的肿瘤细胞的大多数当前高通量模型不同，该模型使得3D肿瘤球状体成分能够进行更类似体内的测试。

[0081] 在用于检测治疗剂的主动迁移和细胞毒性的本文公开的测定方法的特定方面，本公开内容提供了Corning®球状体微孔板与Corning® 96HTSTranswells®可渗透支持系统组合提供用于进行测定的环境的用途。Corning®球状体微孔板是多孔细胞培养微孔板，具有圆形孔底几何形状，涂有Corning®超低附着表面，因此能够在每个孔中心形成高度可重复的单个多细胞肿瘤球状体。Corning®96HTSTranswells®是用于高通量药物转运和细胞迁移和侵袭研究的可渗透支持物。

[0082] 图5A-5C示出了用于检测治疗剂的主动迁移和细胞毒性的本文公开的方法的实施方式。如图5A中所描绘的，感兴趣的细胞525(例如肿瘤细胞)在孔101中的培养基500中生长，孔101被结构化成约束感兴趣的细胞525以3D构象生长。在这种情况下，孔101是单个单球状体孔。在实施方式中，孔101例如是96孔板的一个孔，例如Corning®96孔球状体板的一个孔。在实施方式中，感兴趣的细胞525，例如肿瘤细胞，可以在多孔板的孔中生长(参见图1C)，每个孔101具有微腔阵列112，每个微腔结构化成约束感兴趣的细胞以3D构象生长，其将导致发展成球状体阵列，多孔板的孔的底表面上的微腔阵列中的每个微腔中有一个球状体。随着细胞在培养中生长和繁殖，它们被约束为随球状体25生长。随着时间的推移，球状体25发生。图5A示出了球状体25的形成。一旦肿瘤细胞发展成球状体25，就将细胞培养插入物400放入孔101中，如图5B所示。在实施方式中，插入物可以是插入板，例如图4B中所示的插入板。将治疗剂(例如，细胞治疗剂，药物或生物制剂)，在这种情况下为细胞治疗剂30，添加到插入物400的腔420中。在该配置中，含有治疗剂(例如，细胞治疗剂，药物或生物制剂)，

例如治疗细胞30的插入物，和含有3D构象的感兴趣细胞525的孔101，例如3D肿瘤球体，一起孵育。然后，在适当的一段时间后，在测定中测量治疗剂(例如，细胞治疗剂，药物或生物制剂)，在这种情况下，细胞治疗剂30，对感兴趣的细胞，例如3D肿瘤球体的作用，以及治疗剂从插入物向细胞培养制品的测定腔室中的迁移。该孵育期将根据所进行的测定的类型，用于测定的治疗剂(例如，细胞治疗剂，药物或生物制剂)而变化。孵育期也将根据插入物400中膜所用的孔径而变化。较大的孔径将导致治疗剂的更快速分布并因此导致更短的孵育期，但可能导致非特异性结果。孵育时间的调整可以在初步实验中完成，并且完全在本领域技术人员的一般技能范围内。如图5C所示，然后可以测量治疗剂30对肿瘤球状体25的作用。例如，在图5C中，在实施方式中，测定可测量球状体25的溶解。

[0083] 图8A，8B，8C，8D，8E，8F和8G是用于在模型中检测治疗剂30的主动迁移和细胞毒性的本文公开方法的实施方式的图示，所述模型包括使用在多孔膜302上细胞层300，其是插入物400的部分。在这些实施方式中，插入物400的多孔膜302上的细胞层300被配置为模拟血脑屏障(BBB)。

[0084] 首先，如图8A所示，将用于模拟BBB的细胞300接种到培养基500中的细胞培养插入物400的多孔膜302上。这些细胞是例如内皮细胞。一段时间后，接种的细胞300，例如内皮细胞，形成模拟BBB的细胞306的汇合单层(2D层)。一旦形成细胞306的汇合单层，就可以将插入物400放入球状体孔101中，如图8C所示。

[0085] 类似于图5，感兴趣的细胞，例如肿瘤细胞，也在孔101中在培养基500中生长，孔101结构化成约束感兴趣的细胞以3D构象生长并形成球状体25，如图8B所示。如图8B所示，孔101是单个单球状体孔。在实施方式中，感兴趣的细胞，例如肿瘤细胞，可以在具有微腔阵列的多孔板的孔中生长(如图1A，1B和1C所示)，每个微腔结构化成约束感兴趣的细胞以3D构象生长(参见图1C)，其将导致大量球状体的形成，多孔板中孔的底表面上的微腔阵列中每个微腔中有一个球状体。随着细胞在培养中生长和繁殖，它们被约束为以球状体生长，如图8B所示球状体25发展。一旦肿瘤细胞发展成球状体25并形成模拟BBB的内皮细胞306的汇合单层，就将细胞培养插入物400置于孔101中，如图8C所示。

[0086] 仍然参考图8C，并且类似于图5，将治疗剂(例如，细胞治疗剂，药物或生物制剂)，在这种情况下为药物310，添加到插入物400的腔312中。在该配置中，含有治疗剂310(例如，细胞治疗剂，药物或生物制剂)，在这种情况下为药物310的插入物400，和含有3D构象的感兴趣的细胞，例如3D肿瘤球状体25的孔一起孵育。这在图8D和图8E中示出。孵育期将根据用于测定的治疗剂，例如，细胞治疗剂，药物或生物制剂而变化。孵育期也将根据插入物400中膜所用的孔径而变化。较大的孔径将导致治疗剂310的更快速分布并因此导致更短的孵育期，但可能导致非特异性结果。孵育时间的调整可以在初步实验中完成，并且完全在本领域技术人员的一般技能范围内。在多孔膜302上使用细胞层306，其配置成模拟血脑屏障(BBB)，可用于评估治疗剂穿过血脑屏障的能力。

[0087] 然后，在适当的一段时间之后，可以测量治疗剂310对感兴趣的细胞(例如3D肿瘤球状体25)的作用。例如，如图8F所示，显示了球状体25的破坏或溶解。可以通过测量细胞培养制品的测定腔室315中的球状体25的完整性的变化来测量该破坏。或者，如图8G所示，虽然球状体25在孵育期后显示完整，但可以测量细胞功能以确定构成球状体25的细胞的生理学变化。例如，可以通过测量肿瘤细胞生理学的变化来测量药物310的细胞毒性作用或药物

310向3D肿瘤球状体25中浸润。

[0088] 可以测量治疗剂310从插入物400迁移到细胞培养制品的测定腔室315中。例如，将治疗剂310引入装置的插入腔室312中，然后对从测定腔室315测量的药物310的浓度进行评估，以确定有多少药物310穿过血脑屏障。

[0089] 可以通过本领域已知的任何手段测量对3D肿瘤球状体的影响和治疗剂从插入物迁移到细胞培养制品的腔室中，包括对细胞、细胞提取物或培养基的遗传、代谢或蛋白质分析，可视化，荧光测量。例如，可以评估免疫细胞的迁移(其中治疗细胞是免疫细胞)和细胞毒性(或肿瘤细胞的生理学变化)，例如但不限于通过使用适当染色的流式细胞术，如在本领域中已知并且在本文的实施例中所使用的。另外，举例来说，药物或生物制剂的迁移可以通过使用标记的药物或生物制剂，包括放射性标记的药物或生物制剂或荧光标记的药物或生物制剂等来测量。可以，例如但不限于通过可视化和/或荧光测量来检测治疗剂，例如，细胞治疗剂，药物或生物制剂向3D肿瘤球状体中浸润或肿瘤细胞裂解。例如，可以对3D肿瘤球状体和浸润细胞进行固定和切片，并且可以通过本领域已知的常规组织学技术对细胞进行染色。

[0090] 可以培养多种肿瘤细胞类型以形成3D肿瘤球状体25。用于可以培养以形成3D肿瘤球状体25的肿瘤细胞类型的癌细胞包括源自肿瘤，赘生物，癌症，癌前病变的任何细胞，细胞系，或任何其他有无限增殖和生长潜力的细胞来源。癌细胞源自天然存在的来源或人工产生。当置于动物宿主中时，癌细胞能够侵入其他组织并转移。癌细胞还包括侵入其他组织和/或转移的任何恶性细胞。生物体背景中的一种或多种癌细胞也可称为癌症，肿瘤，赘生物，生长，恶性肿瘤或本领域中用于描述癌性状态的细胞的任何其他术语。

[0091] 作为可以培养形成3D肿瘤球状体25的肿瘤细胞类型的来源的癌症包括但不限于实体瘤，例如纤维肉瘤，粘液肉瘤，脂肪肉瘤，软骨肉瘤，成骨肉瘤，脊索瘤，血管肉瘤，内皮肉瘤，淋巴管肉瘤，淋巴管内皮细胞肉瘤，滑膜瘤，间皮瘤，尤文氏瘤，平滑肌肉瘤，横纹肌肉瘤，结肠癌，结直肠癌，肾癌，胰腺癌，骨癌，脑癌，乳腺癌，卵巢癌，前列腺癌，食道癌，胃癌，口腔癌，鼻癌，咽喉癌，鳞状细胞癌，基底细胞癌，腺癌，汗腺癌，皮脂腺癌，乳头状癌，乳头状腺癌，囊腺癌，髓样癌，支气管癌，肾细胞癌，肝癌，胆管癌，绒毛膜癌，精原细胞瘤，胚胎癌，肾母细胞瘤，宫颈癌，子宫癌，睾丸癌，小细胞肺癌，膀胱癌，肺癌，上皮癌，神经胶质瘤，多形性胶质母细胞瘤，星形细胞瘤，成神经管细胞瘤，颅咽管瘤，室管膜瘤，松果体瘤，血管母细胞瘤，听神经瘤，少突神经胶质瘤，脑膜瘤，皮肤癌，黑色素瘤，神经母细胞瘤和视网膜母细胞瘤。

[0092] 作为癌细胞来源的其他癌症包括但不限于血源性癌症，例如急性淋巴细胞白血病，急性淋巴细胞性B细胞白血病，急性淋巴细胞性T细胞白血病，急性成髓细胞白血病，急性早幼粒细胞白血病，急性单核细胞白血病，急性红白血病，急性巨核细胞白血病，急性髓细胞白血病，急性非淋巴细胞白血病，急性未分化白血病，慢性粒细胞白血病，慢性淋巴细胞白血病，毛细胞白血病，多发性骨髓瘤，成淋巴细胞白血病，髓性白血病，淋巴细胞白血病，髓细胞白血病，霍奇金疾病，非霍奇金淋巴瘤，瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症，重链疾病和真性红细胞增多症。在用于检测本文公开的治疗剂的主动迁移和细胞毒性的方法的一些实施方式中，3D肿瘤球状体包含一个或多个癌细胞。在一些实施方式中，所述癌细胞被冷冻保存。在一些实施方案中，一个或多个细胞正在主动分裂。

[0093] 在一些实施方案中，该方法包括培养基(例如，包括营养物质(例如蛋白质，肽，氨基酸)，能源(例如碳水化合物)，必需金属和矿物质(例如钙，镁，铁，磷酸盐，硫酸盐)，缓冲剂(例如磷酸盐，乙酸盐)，pH变化的指示剂(例如酚红，溴-甲酚紫)，选择剂(例如化学品，抗微生物剂)等)，如本领域中已知的。

[0094] 在用于检测治疗剂的主动迁移和细胞毒性的本文公开的方法的一些实施方式中，治疗剂是细胞治疗剂，药物和/或生物制剂。

[0095] 在一些实施方式中，细胞治疗剂包括免疫细胞。在一些实施方式中，免疫细胞是白细胞(例如，嗜中性粒细胞，巨噬细胞，树突细胞或单核细胞)。在一些实施方式中，免疫细胞是淋巴细胞(例如，天然杀伤细胞，或淋巴细胞，例如T细胞，B细胞，更特别是细胞毒性T细胞)。

[0096] 可以在本文公开的用于检测治疗剂的主动迁移和细胞毒性的方法中测试多种药物310，包括已知的抗癌药物或怀疑具有潜在抗癌活性的物质，例如新的分子实体或新化学实体。抗癌药物包括但不限于：阿西维辛、阿柔比星、盐酸阿考达唑、阿克罗宁、阿多来新、阿地白介素、六甲蜜胺、安波霉素、乙酸阿美蒽醌、氨鲁米特、安吖啶、阿那曲唑、安曲霉素、门冬酰胺酶、曲林菌素、阿扎胞苷、阿扎替派、阿佐霉素、巴马司他、苯佐替派、比卡鲁胺、盐酸比生群、二甲磺酸双奈法德、比折来新、硫酸博来霉素、布喹那钠、溴匹立明、白消安、放线菌素C、卡普睾酮、卡醋胺、卡贝替姆、卡铂、卡莫司汀、盐酸卡柔比星、卡折来新、西地芬戈、苯丁酸氮芥、西罗霉素、瞬铂、克拉屈滨、甲磺酸克立那托、环磷酰胺、阿糖胞苷、达卡巴嗪、更生霉素、盐酸柔红霉素、地西他滨、右奥马铂、地扎胍宁、甲磺酸地扎胍宁、地吖醌、多西他赛、多柔比星、盐酸多柔比星、屈洛昔芬、柠檬酸屈洛昔芬、丙酸屈他雄酮、达佐霉素、依达曲沙、盐酸依氟鸟氨酸、依沙芦星、恩洛铂、恩普氨酯、依匹哌啶、盐酸表柔比星、厄布洛唑、盐酸依索比星、雌莫司汀、雌莫司汀磷酸钠、依他硝唑、依托泊苷、磷酸依托泊苷、氯苯乙嘧胺、盐酸法倔唑、法扎拉滨、芬维A胺、氮尿苷、磷酸氟达拉滨、氟尿嘧啶、氟西他滨、磷喹酮、福司曲星钠、吉西他滨、盐酸吉西他滨、羟基脲、盐酸伊达比星、异环磷酰胺、伊莫福新、白介素2(包括重组白介素2或rIL2)，干扰素α-2a、干扰素α-2b、干扰素α-n1、干扰素α-n3、干扰素β-Ia、干扰素γ-Ib、异丙铂、盐酸伊立替康、乙酸兰瑞肽、来曲唑、乙酸亮丙瑞林、盐酸利阿唑、洛美曲索钠、洛莫司汀、盐酸洛索蒽醌、马索罗酚、美登素、盐酸氮芥、乙酸基孕甾酮、乙酸美仑孕酮、苯丙氨酸氮芥、美诺立尔、巯嘌呤、氨甲喋呤、氨甲喋呤钠、氯苯氨啶、美妥替哌、米丁度胺、米托卡星、丝裂红素、米托洁林、丝裂马菌素、丝裂霉素、米托司培、米托坦、盐酸米托蒽醌、霉酚酸、诺考达唑、诺拉霉素、奥马铂、奥昔舒仑、紫杉醇、培门冬酶、培利霉素、奈莫司汀、硫酸培洛霉素、培磷酰胺、哌泊溴烷、哌泊舒凡、盐酸吡罗蒽醌、普卡霉素、普洛美坦、卟菲尔钠、泊非霉素、泼尼莫司汀、盐酸丙卡巴肼、嘌罗霉素、盐酸嘌罗霉素、吡唑呋喃菌素、利波腺苷、罗谷亚胺、沙芬戈、盐酸沙芬戈、司莫司汀、辛曲秦、磷乙酰天冬氨酸钠、司帕霉素、盐酸锗螺胺、螺莫司汀、螺铂、链黑霉素、链佐星、磺氯苯脲、他利霉素、替可加兰钠、替加氟、盐酸替洛蒽醌、替莫泊芬、替尼泊苷、替罗昔隆、睾内酪、硫咪嘌呤、硫鸟嘌呤、塞替派、噻唑呋林、替拉扎明、柠檬酸托瑞米芬、乙酸曲托龙、磷酸曲西立滨、三甲曲沙、葡糖醛酸三甲曲沙、曲普瑞林、盐酸妥布氯唑、乌拉莫司汀、乌瑞替派、伐普肽、维替泊芬、硫酸长春碱、硫酸长春新碱、长春地辛、硫酸长春地辛、硫酸长春匹定、硫酸长春甘酯、硫酸长春罗新、酒石酸长春瑞滨、硫酸长春罗定、硫酸长春利定、伏氯唑、折尼铂、净司他丁、盐酸佐柔比星。其他

抗癌药物包括但不限于:20-表-1,25二羟基维生素D3;5-乙炔基尿嘧啶;阿比特龙;阿柔比星;酰基富烯;腺环戊醇(adecypenol);阿多来新;阿地白介素;ALL-TK拮抗剂;六甲蜜胺;氨莫司汀;阿米多克斯(amidox);氨磷汀;氨基乙酰丙酸;氨柔比星;安吖啶;阿那格雷;阿那曲唑;穿心莲内酯;血管新生抑制剂;拮抗剂D;拮抗剂G;安雷利克斯;抗-背侧化形成蛋白-1;抗雄激素;前列腺癌;抗雌激素;抗瘤酮(antineoplaston);反义寡核苷酸;甘氨酸阿非迪霉素;凋亡基因调节剂;凋亡调节剂;脱嘌呤核酸;ara-CDP-DL-PTBA;精氨酸脱氨酶;阿苏拉科林(asulacrine);阿他美坦;阿莫司汀;阿西他汀(axinastatin)1;阿西他汀2;阿西他汀3;阿扎司琼;阿扎毒素;重氮酪氨酸;浆果赤霉素III衍生物;巴拉醇(balanol);巴马司他;BCR/ABL拮抗剂;苯并二氢卟酚(benzochlorin);苯甲酰星孢素;β内酰胺衍生物;β-阿里辛(β-alethine);贝塔克拉霉素(betaclamycin)B;桦木酸;bFGF抑制剂;比卡鲁胺;比生群;双氮丙啶精胺;双奈法德;比特迪尼(bistratene)A;比折来新;贝伏特(breflate);溴匹立明;布度钛;丁基硫堇亚胺;卡泊三醇;卡弗他丁(calphostin)C;喜树碱衍生物;金丝雀痘;卡培他滨;羧酰胺-氨基-三唑;羧基酰胺三唑;CaRest M3;CARN 700;软骨衍生的抑制剂;卡折来新;酪蛋白激酶抑制剂(ICOS);澳粟精胺;杀菌肽B;西曲瑞克;双氢叶吩(chlorlns);氯代喹喔啉磺酰胺;西卡前列素;顺-卟啉;克拉屈滨;恩氯米芬类似物;克霉唑;克利霉素(collismycin)A;克利霉素B;考布他汀A4;考布他汀类似物;克纳宁(conagenin);科莱贝司丁(crambescidin)816;克立那托;自念珠藻环肽(cryptophycin)8;自念珠藻环肽A衍生物;麻疯树毒蛋白(curacin)A;环戊蒽醌(cyclopentanthraquinone);环普拉坦(cycloplatam);塞培霉素(cypemycin);阿糖胞苷十八烷基磷酸钠;细胞裂解因子;磷酸己烷雌酚(cytostatin);达昔单抗;地西他滨;脱氢代代宁B;地洛瑞林;地塞米松;右异环磷酰胺;右雷佐生;右维拉帕米;地吖醌;代代宁B;二羟基苯并氧肟酸(didox);二乙基正精胺;二氢-5-氮杂胞苷;二氢紫杉醇,9-;二氧霉素(dioxamycin);二苯基螺莫斯汀;多西他赛;二十二烷醇;多拉司琼;去氧氟尿苷;屈洛昔芬;屈大麻酚;多卡霉素SA;依布硒;依考莫司汀;依地福新;依决洛单抗;依氟鸟氨酸;榄香烯;乙嘧替氟;表柔比星;依立雄胺;雌莫司汀类似物;雌激素激动剂;雌激素拮抗剂;依他硝唑;磷酸依托泊甙;依西美坦;法倔唑;法扎拉滨;芬维A胺;非格司亭;非那雄胺;夫拉平度(flavopiridol);氟卓斯汀;夫卢丝龙(fluasterone);氟达拉滨;盐酸氟代柔红霉素(fluorodaunorunicin);福酚美克;福美坦;福司曲星;福莫司汀;德卟啉钆(gadolinium texaphyrin);硝酸镓;加洛他滨;加尼瑞克;明胶酶抑制剂;吉西他滨;谷胱甘肽抑制剂;赫舒反(hepsulfam);调蛋白;环己基双乙酰胺;金丝桃蒽酮;伊班膦酸;黄胆素;艾多昔芬;伊决孟酮;伊莫福新;伊洛马司他;咪唑并吖啶酮;咪喹莫特;免疫刺激肽;胰岛素样生长因子1受体抑制剂;干扰素激动剂;干扰素;白介素;碘苄胍;碘阿霉素;甘薯苦醇,4-;伊罗普拉;伊索拉定;异本格唑(isobengazole);异高软海绵素(isohomohalicondrin)B;伊他司琼;结丝立得(jasplakinolide);卡哈拉得(kahalalide)F;片螺素(lamellarin)-N三乙酸;兰瑞肽;雷纳霉素(leinamycin);来格司亭;硫酸蘑菇多糖;莱托斯汀(leptolstatin);来曲唑;白血病抑制因子;白细胞α干扰素;亮丙瑞林+雌激素+孕酮;亮丙瑞林;左旋咪唑;利阿唑;直链多胺类似物;亲脂性二糖肽;亲脂性铂化合物;利索纳得(lissoclinamide)7;洛铂;胍乙基磷酸丝氨酸;洛美曲索;氯尼达明;洛索蒽醌;洛伐他汀;洛索立宾;勒托替康;德卟啉镥(lutetium texaphyrin);莱索菲林(lysofylline);细胞裂解肽;美坦新;慢诺他汀(mannostatin)A;马立马司他;马索罗酚;马

斯平(maspin);基质溶解因子抑制剂;基质金属蛋白酶抑制剂;美诺立尔;硫巴妥苯胺;美替瑞林;甲硫氨酸酶;甲氧氯普胺;MIF抑制剂;米非司酮;米替福新;米立司亭;错配的双链RNA;米托胍腙;二溴卫矛醇;丝裂霉素类似物;米托萘胺;迈托毒素(mitotoxin)成纤维细胞生长因子-皂草毒蛋白;米托蒽醌;莫法罗汀;莫拉司亭;单克隆抗体,人绒毛膜促性腺激素;单磷酰基脂质A+分支杆菌细胞壁骨架;莫哌达醇;多药物抗性基因抑制剂;基于多肿瘤抑制物1的疗法;芥类抗癌剂;印度洋海绵(mycaperoxide)B;分枝杆菌细胞壁提取物;米亚普龙(myriaporone);N-乙酰基地那林;N-取代的苯甲酰胺;那法瑞林;那瑞替喷(nagrestip);纳洛酮+镇痛新;纳帕英(napavin);萘萜二醇(naphterpin);那托司亭;奈达铂;奈莫柔比星;奈立膦酸;中性内肽酶;尼鲁米特;尼萨霉素(nisamycin);氮氧化物调节剂;硝基氧抗氧化剂;尼多林(nitrullyn);O6-苄基鸟嘌呤;奥曲肽;奥可斯酮(okicenone);寡核苷酸;奥那司酮;昂丹司琼;昂丹司琼;奥莱辛(oracin);口服细胞因子诱导物;奥马铂;奥沙特隆;奥沙利铂;氧杂奥诺霉素(oxaunomycin);紫杉醇;紫杉醇类似物;紫杉醇衍生物;帕劳胺(palauamine);棕榈酰根霉素;帕米磷酸;人参炔三醇;帕诺米芬;副菌铁素(parabactin);帕折普汀;培门冬酶;培得星;戊聚硫钠;喷司他丁;喷托唑(pentrozole);全氟溴烷;培磷酰胺;紫苏子醇;苯那霉素(phenazinomycin);乙酸苯酯(phenylacetate);磷酸酶抑制剂;皮西巴尼(picibanil);盐酸匹鲁卡品;吡柔比星;吡曲克辛;胎盘素(placetin)A;胎盘素B;纤溶酶原激活物抑制剂;铂络合物;铂化合物;铂-三胺络合物;卟菲尔钠;泊非霉素;氯泼尼松;丙基双吖啶酮;前列腺素J2;蛋白酶体抑制剂;基于蛋白A的免疫调节剂;蛋白激酶C抑制剂;蛋白激酶C抑制剂,微藻(microalgal);蛋白质酪氨酸磷酸酶抑制剂;嘌呤核苷磷酸化酶抑制剂;红紫素;吡唑啉吖啶;吡哆醛化的血红蛋白聚氧乙烯偶联物;raf拮抗剂;雷替曲塞;雷莫司琼;ras法尼基蛋白转移酶抑制剂;ras抑制剂;ras-GAP抑制剂;去甲基化的瑞替普汀;依替膦酸铼Re 186;根霉素;核酶;RII维甲酰胺(retinamide);吡鲁米特;罗希吐碱(rohitukine);罗莫肽;罗喹美克;卢比格酮(rubiginone)B1;卢伯西(ruboxyl);沙芬戈;伞托平(saintopin);SarCNU;萨可菲醇(sarcophytol)A;沙格司亭;Sdi 1模拟物;司莫司汀;衰老衍生的抑制剂1;正义寡核苷酸;信号转导抑制剂;信号转导调节剂;单链抗原结合蛋白;西佐喃;索布佐生;硼卡钠;苯基乙酸钠;索尔醇(solverol);生长调节素结合蛋白;索纳明;膦门冬酸;斯卡霉素(spicamycin)D;螺莫司汀;脾脏五肽(splenopentin);海绵他汀(spongistatin)1;角鲨胺;干细胞抑制剂;干细胞分裂抑制剂;斯提酰胺(stipiamide);基质分解素抑制剂;斯菲诺辛(sulfinosine);强效血管活性肠肽拮抗剂;素拉迪塔(suradista);苏拉明;苦马豆碱;合成氨基葡聚糖;他莫司汀;他莫昔芬甲碘化物;牛磺莫司汀;他扎罗汀;替可加兰钠;替加氟;碲吡喃洋(tellurapyrylium);端粒酶抑制剂;替莫泊芬;替莫唑胺;替尼泊苷;十氧化四氯(tetrachlorodecaoxide);四佐胺(tetrazomine);泰立拉汀(thaliblastine);噻可拉林;血小板生成素;血小板生成素模拟物;胸腺法新;胸腺生成素受体激动剂;胸腺曲南;促甲状腺激素;本紫红素乙酯锡;替拉扎明;二氯环戊二烯钛;拓扑森汀(topsentin);托瑞米芬;全能性干细胞因子;翻译抑制剂;维甲酸;三乙酰基尿苷;曲西立滨;三甲曲沙;曲普瑞林;托烷司琼;妥罗雄脲;酪氨酸激酶抑制剂;酪氨酸磷酸化抑制剂(tyrphostin);UBC抑制剂;乌苯美司;泌尿生殖窦衍生的生长抑制因子;脲激酶受体拮抗剂;伐普肽;瓦立奥林(variolin)B;载体系统,红细胞基因疗法;维拉雷琐;藜芦明;瓦尔丁(verdins);维替泊芬;长春瑞滨;威科萨汀(vinxaltine);维他辛;伏氯唑;扎诺特隆;

折尼铂;亚苄维C;和净司他丁斯酯。

[0097] 应该理解,本文公开的方法和概念可以扩展到另外的共培养模型。例如,虽然已经描述了模拟的血脑屏障,但是在多孔膜上生长的细胞可以被配置为模拟任何生物屏障。“生物屏障”是与生理保护屏障相关的生物膜,并且可以包括但不限于血脑屏障,肺屏障,胎盘屏障,表皮屏障,眼屏障,嗅屏障,胃食管屏障,粘膜,血尿屏障,空气-组织屏障,血胆屏障,口腔屏障,肛门直肠屏障,阴道屏障和尿道屏障。其他生物屏障包括血乳屏障,血睾屏障和粘膜屏障,包括阴道粘膜,尿道粘膜,肛门粘膜,颊粘膜,舌下粘膜,直肠粘膜等。

[0098] 另外,在细胞培养物制品中培养以形成球状体25的细胞不限于肿瘤细胞或癌细胞。可以培养多种细胞类型。在一些实施方案中,球状体包含单一细胞类型。在一些实施方案中,球状体包含超过一种细胞类型。在一些实施方案中,其中生长超过一个球状体时,每个球状体具有相同类型,而在其他实施方案中,生长两种或更多种不同类型的球状体。在球状体中生长的细胞可以是天然细胞或改变的细胞(例如,包含一个或多个非天然遗传改变的细胞)。在一些实施方式中,细胞是体细胞。在一些实施方案中,细胞是任何所需分化状态的干细胞或祖细胞(例如,胚胎干细胞,诱导的多能干细胞)(例如多能,专能,命运确定,永生化等)。在一些实施方式中,细胞是疾病细胞或疾病模型细胞。细胞可来自或衍生自任何所需组织或器官类型,包括但不限于肾上腺,膀胱,血管,骨,骨髓,脑,软骨,子宫颈,角膜,子宫内膜,食管,胃肠道,免疫系统(例如,T淋巴细胞,B淋巴细胞,白细胞,巨噬细胞和树突状细胞),肝,肺,淋巴管,肌肉(例如,心肌),神经,卵巢,胰腺(例如,胰岛细胞),垂体,前列腺,肾,唾液,皮肤,肌腱,睾丸和甲状腺。在一些实施方式中,细胞是哺乳动物细胞(例如人,小鼠,大鼠,兔,狗,猫,牛,猪,鸡,山羊,马等)。

[0099] 此外,治疗剂对细胞培养腔室中的球状体的测试效果不限于细胞毒性(例如,细胞裂解)。本方法和概念可以应用于药物发现,表征,功效测试和毒性测试。此类检测包括但不限于药理作用评估,致癌性评估,医学成像剂特征评估,半衰期评估,辐射安全评估,遗传毒性测试,免疫毒性测试,生殖和发育测试,药物相互作用评估,剂量评估,吸附评估,倾向评估,代谢评估,消除研究等。如本领域技术人员已知的,特定细胞类型可用于特定测试(例如,用于肝脏毒性的肝细胞,用于肾毒性的肾近端小管上皮细胞,用于血管毒性的血管内皮细胞,用于神经毒性的神经元和神经胶质细胞,用于心脏毒性的心肌细胞,用于横纹肌溶解的骨骼肌细胞等)。可以评估治疗剂对球状体细胞的任何数量的所需参数的影响,包括但不限于膜完整性,细胞代谢物含量,线粒体功能,溶酶体功能,细胞凋亡,遗传改变,基因表达差异等。

[0100] 因此,本文公开的方法和概念可用于研究,例如但不限于,药物或病毒(当治疗剂是药物或病毒时)穿过血脑屏障或胎盘屏障(当多孔膜被配置为模拟血脑屏障或胎盘屏障时)的能力,以及随后的效应(例如,细胞毒性)和向细胞培养制品腔室中的肿瘤球状体中浸润。此外,举例来说,本文公开的方法和概念可用于研究球状体细胞的病毒感染(当治疗剂是病毒时)或治疗剂对胚胎发育的影响(例如,当球状体包含胚胎干细胞时)。

[0101] 实施例

[0102] 以下实施例用于说明本公开的某些优选的实施方式和方面,并不构成对其范围的限制。

[0103] 实施例1

[0104] 细胞培养

[0105] 将A549/GFP细胞(细胞生物实验室公司(Cell Biolabs,Inc.)目录号AKR-209)以每孔2,000个细胞接种到96孔球状体微孔板(康宁目录号4515)中补充有10％胎牛血清(FBS)(康宁目录号35-010-CV)的Iscove的改良DMEM(IMDM)(康宁目录号10-016-CM)中。第二天,用200μL含有30ng/mL人SDF-1α(SDF-1α)/CXCL12(Shenandoah Biotechnology Inc™目录号100-20)或载剂对照的IMDM 10％FBS替换培养基。用80μM CellTracker™ Blue CMHC染料(Molecular Probes™目录号C2110)将NK92-MI细胞染色1小时,同时用在没有血清的IMDM中的2μg/mL前列腺素E2(PGE_2)(Tocris目录号2296)或载剂对照处理一小时。将HTS Transwell-96孔透气性支持物置于96孔球状体板中(示意图显示在图1A和图4C中)。然后将NK-92MI细胞重新悬浮在无血清IMDM中,并以50,000个细胞/插入物接种到插入物的顶腔室中。24小时后,取出插入物并处理球状体微孔板用于流式细胞术。简而言之,除去培养基并用150μL TrepLE™选择酶(10X)(Gibco™目录号A1217701)替换,并在37℃孵育直至可以用最少的移液处理将球状体破碎成单个细胞。然后使用Miltenyi Biotec MacsQuant®通过流式细胞术分析细胞。

[0106] 评价NK-92MI(NK)细胞迁移

[0107] 使用市售的Corning HTS 96Transwell插入物与Corning 96孔球状体微孔板评估A549/GFP细胞的NK-92MI迁移和杀肿瘤活性,如图4和图5所示。恶性结构中某些免疫细胞的存在已被证明与患者存活率增加有关。与用于研究免疫细胞毒性的更常用的2D体外模型不同,3D模型可用于观察免疫细胞向肿瘤球状体中浸润。图6是显示根据图5中所示的实施方式,NK细胞向3D培养的A549/GFP肿瘤细胞迁移的图。数据显示为2次独立研究的平均值,N＝24,单向ANOVA与Boneferroni的后检验。***＝$p<0.0001$并且**＝$p<0.001$。图6说明了如何通过添加趋化因子如SDF-1α来增强免疫细胞迁移,以及通过添加抑制剂如PGE_2来抑制免疫细胞迁移。当化学引诱物SDF-1α与球状体微孔板中的肿瘤球状体一起存在时,NK迁移显着增加。图7是显示根据图4A、图4B和图5中所示的实施方式3D培养的A549/GFP肿瘤细胞的NK诱导的细胞毒性的图。相反,当NK细胞暴露于PGE_2时,迁移显着降低,PGE_2是一种通常由癌细胞分泌的免疫细胞功能的已知抑制剂,作为免疫逃避的形式。杀肿瘤活性与迁移数据很好地对应,用没有PGE_2的情况下暴露于SDF-1α的NK细胞观察到A549/GFP肿瘤细胞的最低存活率(图7)。

[0108] 实施例2

[0109] 血脑屏障模型

[0110] MDCKII/MDR1细胞来自Piet Borst博士(荷兰癌症研究所(Netherlands Cancer Institute),荷兰阿姆斯特丹),并以100μL补充有10％胎牛血清(FBS)(康宁目录号35-010-CV)的达氏改良伊氏培养基(DMEM)(康宁目录号10-013-CM)中100,000个细胞/cm^2接种到HTS 96孔Transwells(康宁目录号3391或3977)中。培养它们5天,在测定前24小时更换培养基。通过荧光黄渗透性(图10A)(西格玛目录号L0144)和罗丹明123转运(图10B)(西格玛目录号R8004)评估单层完整性。按照制造商的方案进行MDCKII/MDR1单层的免疫染色以确认存在紧密连接蛋白ZO1(赛默飞世尔(Thermo Fisher)目录号339188)和闭合蛋白(赛默飞世尔目录号331588)(数据未显示)。

[0111] 胶质瘤球形成

[0112] 将LN229细胞(ATCC®目录号CRL-2611™)在含有10％FBS的DMEM中常规培养。用Accutase®细胞剥离溶液(康宁目录号25-058-CI)收获细胞,并在测定前以每孔1,000个细胞接种到96孔球状体微孔板中24小时(图8B)。

[0113] 血脑屏障/胶质瘤球体模型试验

[0114] 如图8A-8G所示,在用于检测治疗剂的主动迁移和细胞毒性的本文公开方法的实施方式中进行血脑屏障/胶质瘤球体模型试验,所述模型包括使用配置成模拟血脑屏障的多孔膜。首先,如图8A所示,将用于模拟BBB的MDCKII/MDR1细胞接种到细胞培养插入物400的多孔膜302上。LN229肿瘤细胞在Corning®96孔球状体板中生长(如图8B所示)。一旦LN229肿瘤细胞发育成球状体(如图8B所示)并且形成融合的单层MDCKII/MDR1内皮细胞(其模拟细胞培养插入物的多孔膜上的BBB(如图8A所示)),将细胞培养插入物置于孔中。参考图8C,将诸如顺铂或荜茇酰胺的药物加入到插入物的腔中2小时。药物孵育后,移除细胞培养插入物并测试单层完整性(数据未显示)。将球状体再培养2天(如图8D和图8E所示),然后例如通过染色例如CellTiter-Glo® 3D测定肿瘤细胞裂解(如图8F所示)。还测试了处理后的球状体生理学(如图8G所示)。图9是显示用化合物顺铂和荜茇酰胺(Piperlongumine)直接培养48小时后LN229球状体的剂量依赖性细胞毒性的图。每个浓度N＝12个孔形成2个独立研究。图11是显示具有或不具有血脑屏障替代物的顺铂和荜茇酰胺的LN229细胞毒性的图。显示了通过在具有或不具有BBB的情况下暴露于Transwells药物2小时后,48小时LN229球状体的活力百分比。通过将无药物对照标准化至100％活力来评估活力。数据显示为3次独立研究的平均值,N＝30,单向ANOVA与Boneferroni的后检验。***＝$p<0.0001$。图12A和图12B是显示来自Tocris文库的代表性筛选的图,显示用(图12B)和不用BBB(图12A)发现的命中。顶部虚线是平均缓冲对照,底部虚线表示缓冲反应以下3个西格玛。图13A和13B是图12A和图12B的屏幕概要的曲线图,显示了使用和不使用BBB发现的命中的汇编。如果它们在3个独立筛选中的至少2个中低于缓冲反应3个西格玛,则结果被认为是命中。具有水平影线的盒(除了仅缓冲之外)是仅在没有BBB的情况下发现的命中。具有对角影线的框是在有和没有BBB的情况下发现的命中。因此,本文提供的数据表明,可包括康宁球状体微孔板和HTS Transwell 96孔可渗透支持物组合的本文公开的方法允许新的3D模型,其可以区分可以通过BBB的化合物和那些不能通过BBB的化合物同时观察由此产生的胶质瘤球体(或其他3D肿瘤球状体)细胞毒性。

[0115] 上述说明书中提及的所有出版物和专利都通过引用纳入本文。对本领域技术人员显而易见的是,可以对本发明技术进行各种修改和变动而不偏离本公开的精神和范围。虽然已结合具体的优选实施方案对本公开作了描述,但应了解,如权利要求所述,本公开不应过分地受限于这些具体实施方案。因为本领域技术人员可以结合本发明技术的精神和实质,对所公开的实施方式进行各种改良、组合、子项组合和变化,因此应认为本发明技术包括所附权利要求书范围内的全部内容及其等同内容。

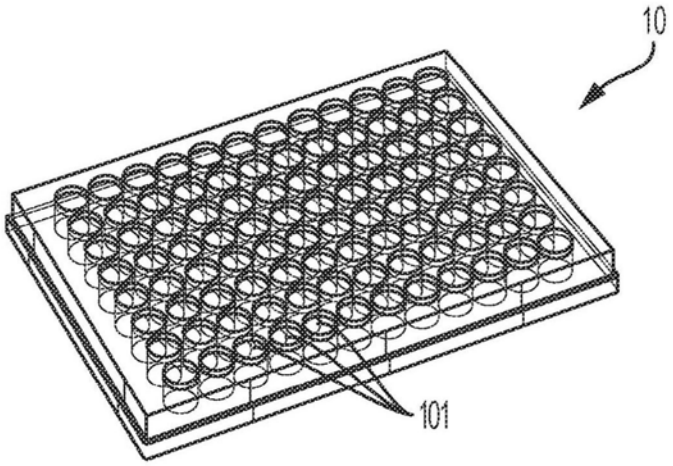


图1A

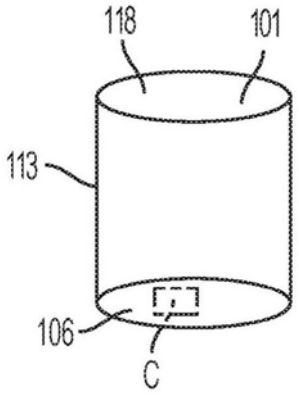


图1B

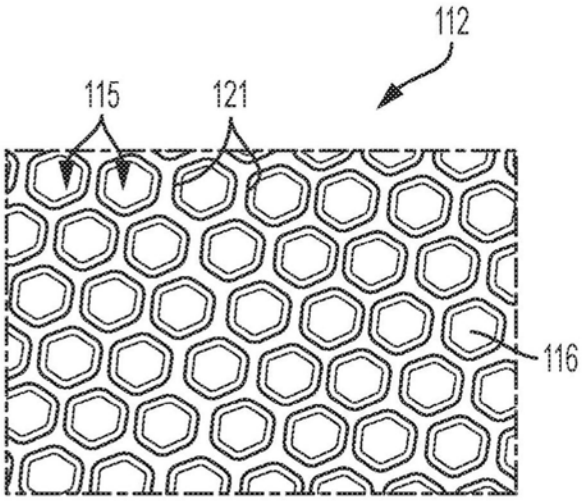


图1C

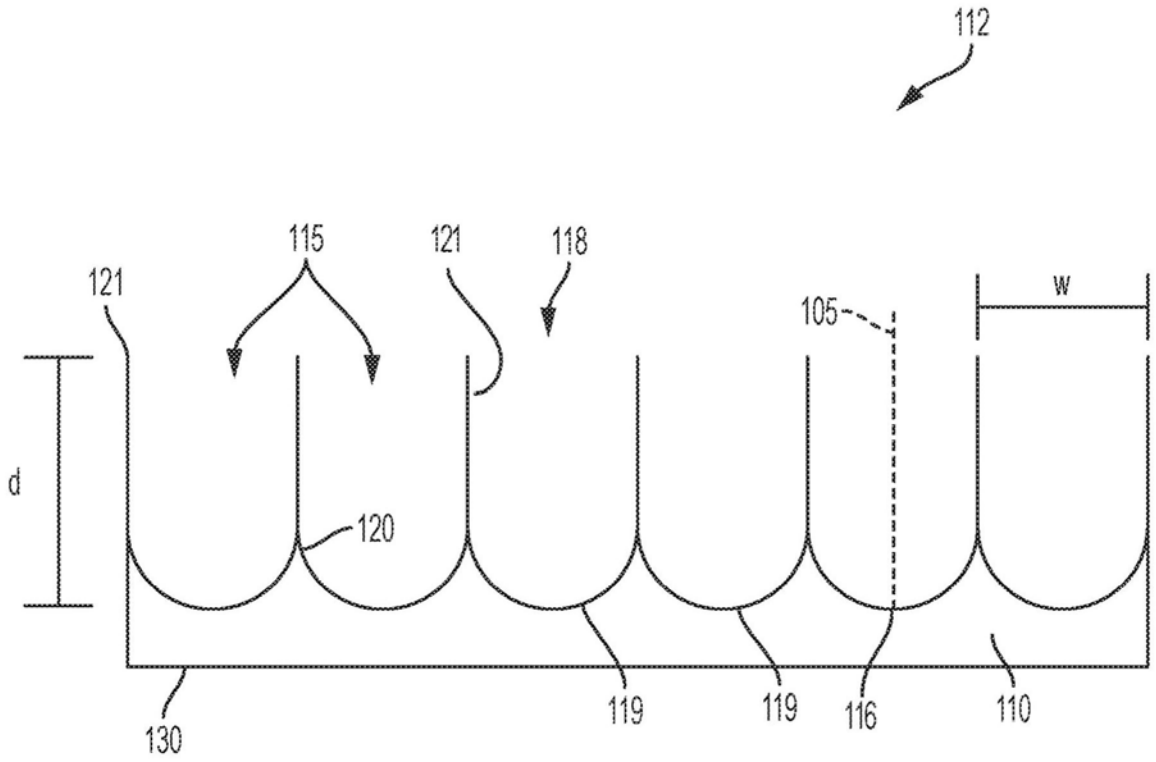


图2

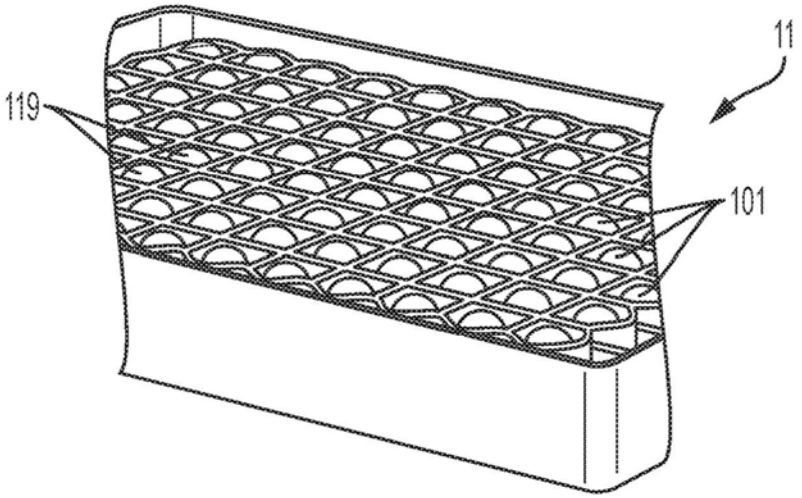


图3A

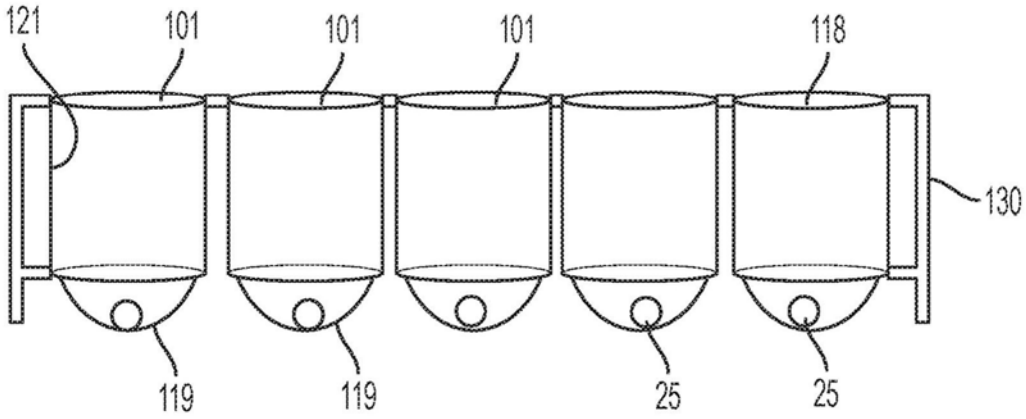


图3B

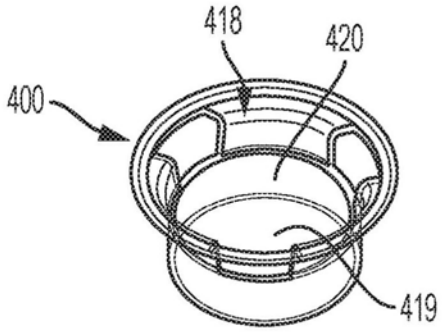


图4A

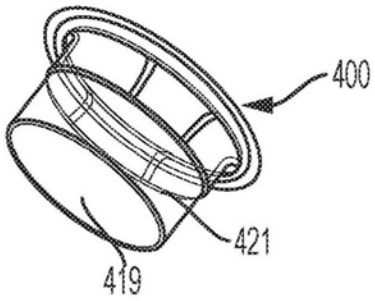


图4B

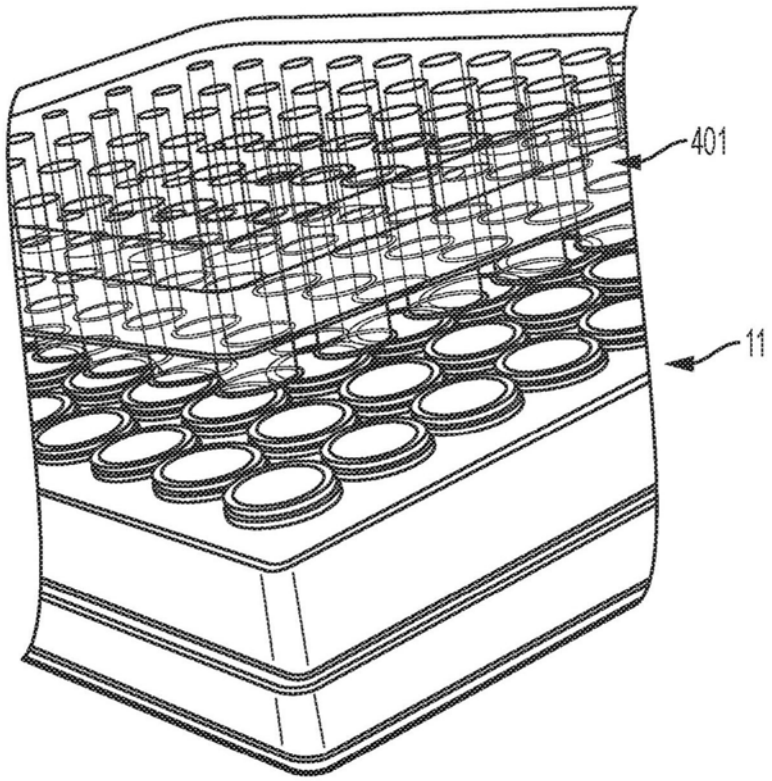


图4C

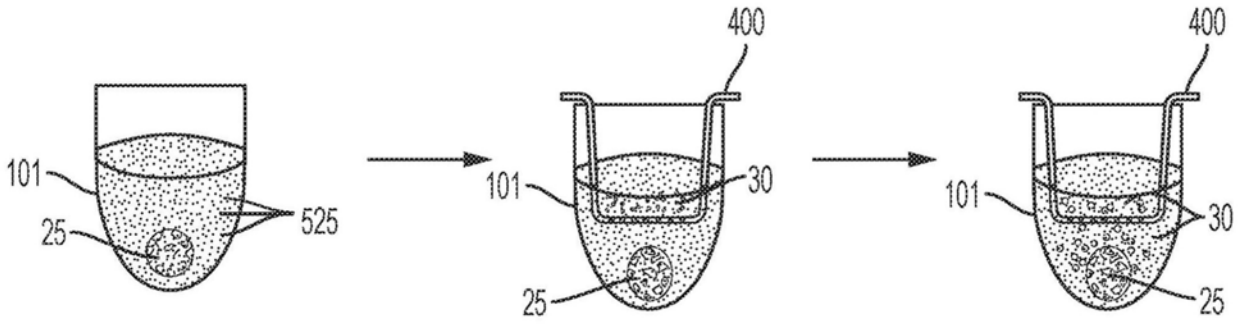


图 5A 图 5B 图 5C

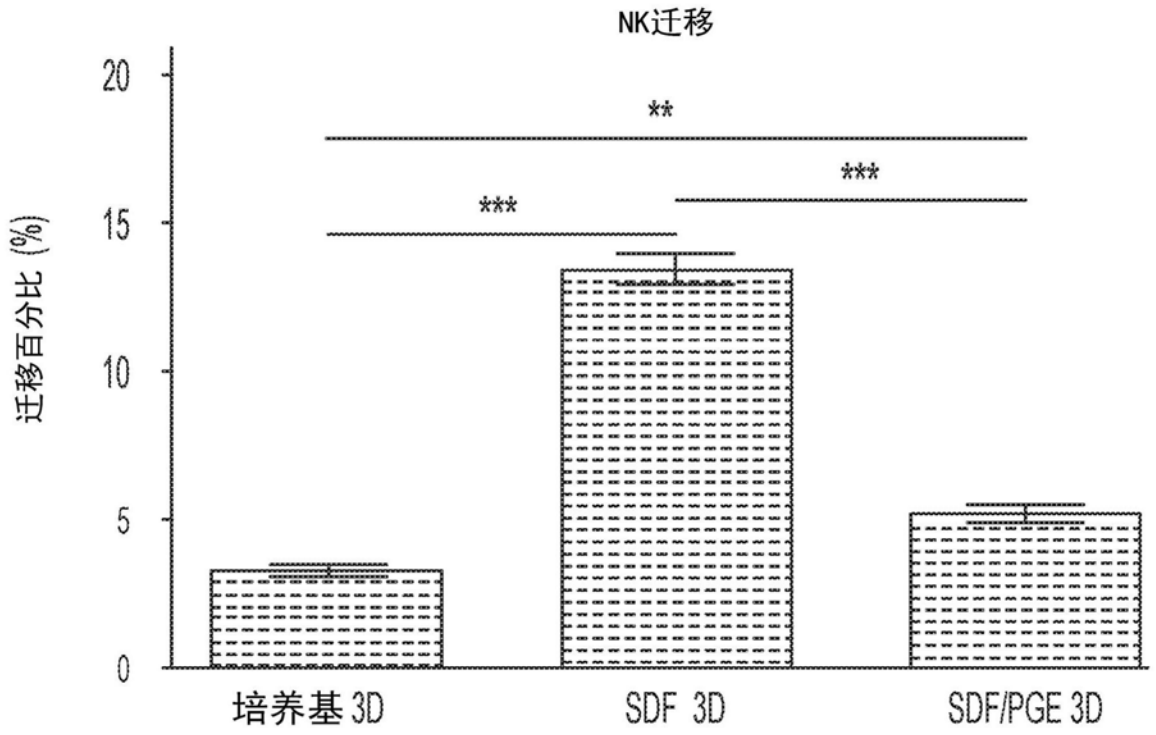

NK迁移
迁移百分比 (%)
20
15
10
5
0
**
***
***
培养基 3D
SDF 3D
SDF/PGE 3D

图6

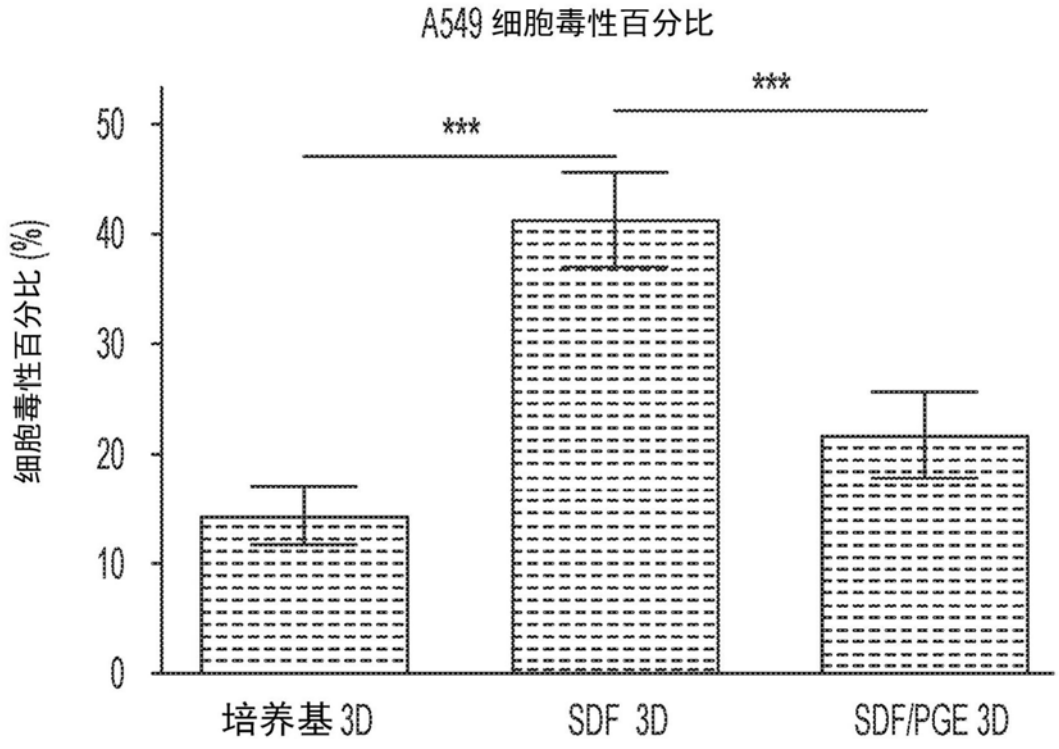

A549 细胞毒性百分比
细胞毒性百分比 (%)
50
40
30
20
10
0
***
***
培养基 3D
SDF 3D
SDF/PGE 3D

图7

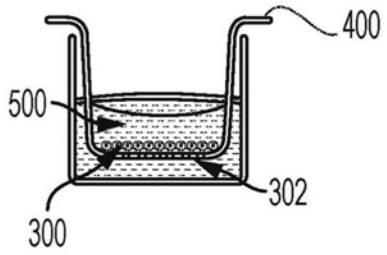


图8A

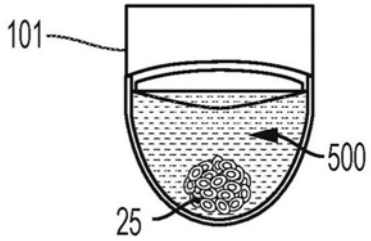


图8B

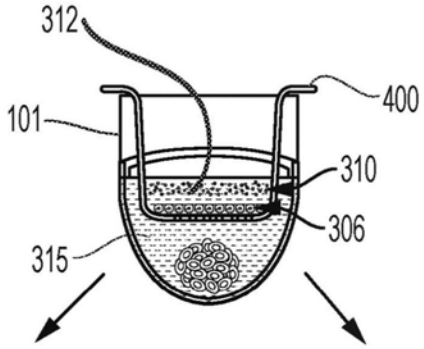


图 8C

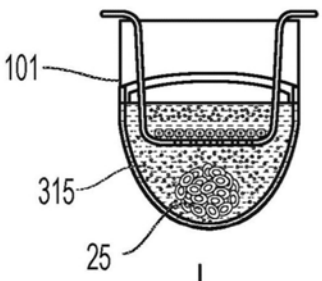


图 8D

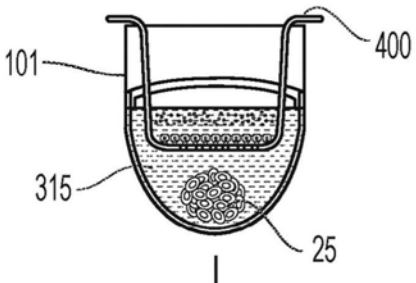


图 8E

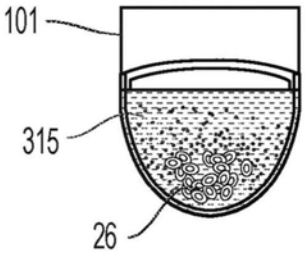


图 8F

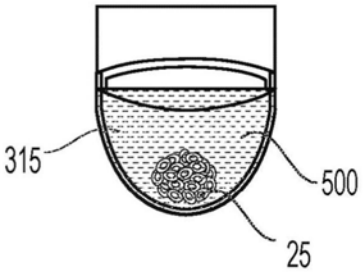


图 8G

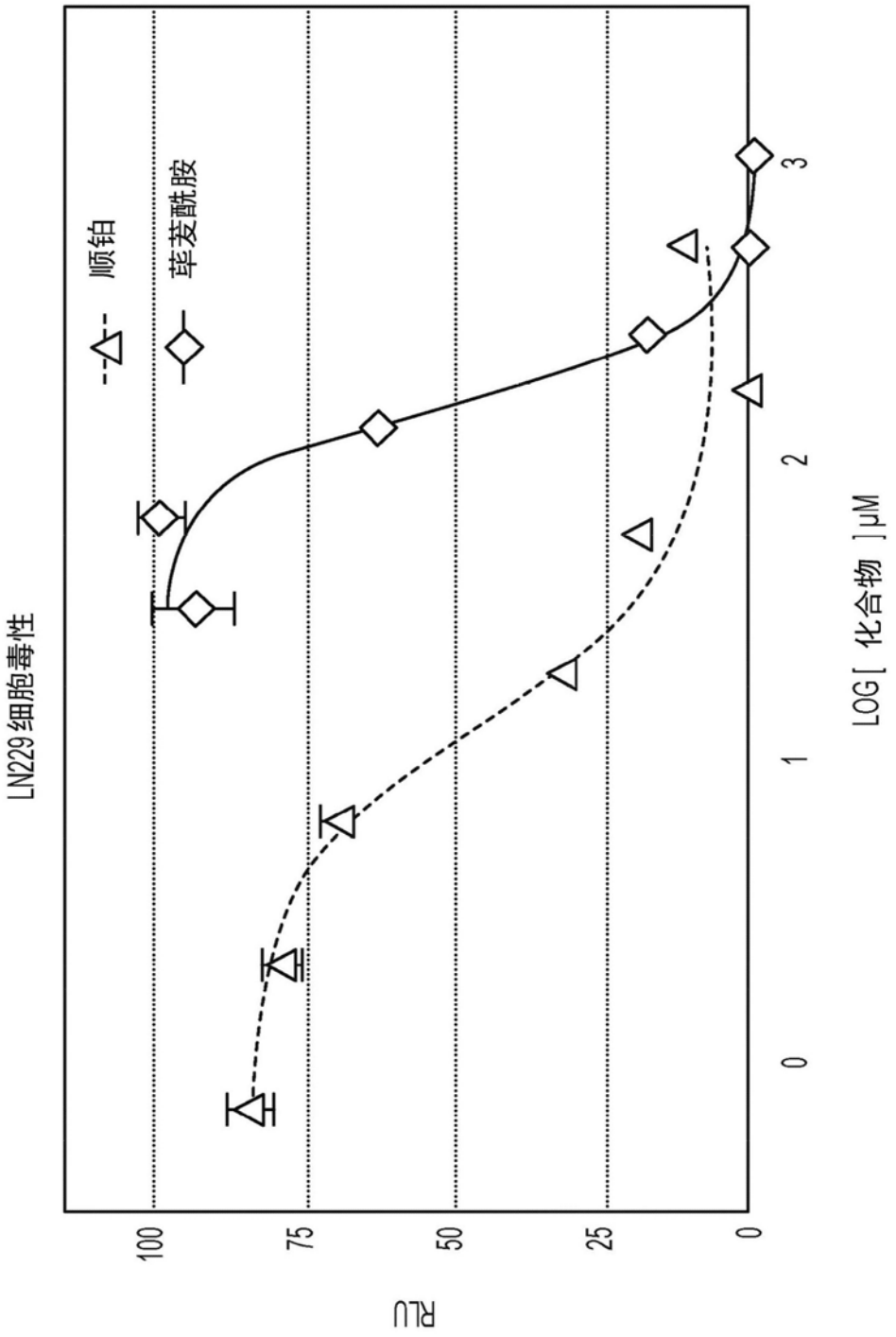


图9

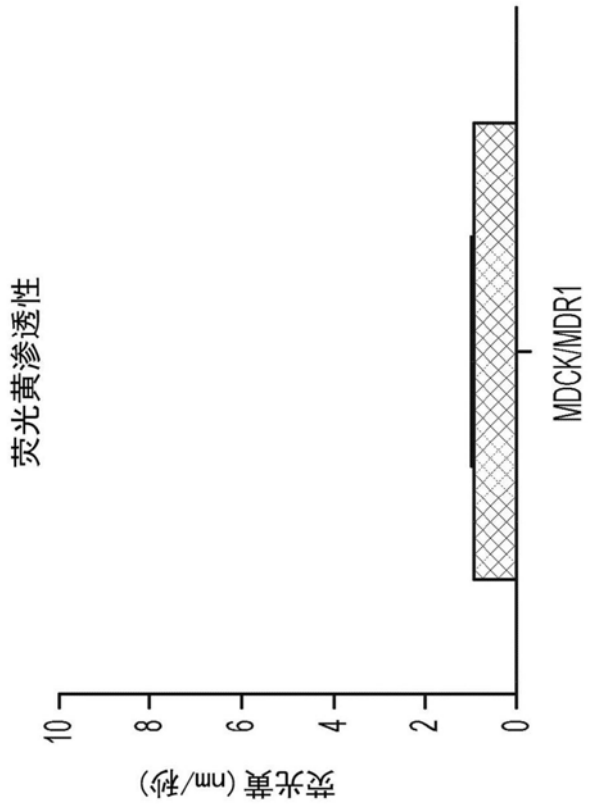

荧光黄渗透性
荧光黄 (nm/秒)
10
8
6
4
2
0
MDCK/MDR1

图10A

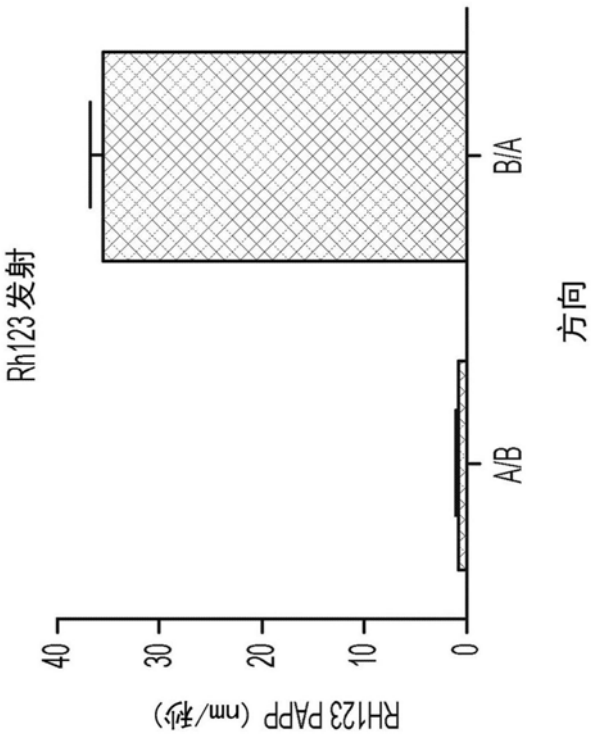

Rh123 发射
RH123 PAPP (nm/秒)
40
30
20
10
0
A/B
B/A
方向

图10B

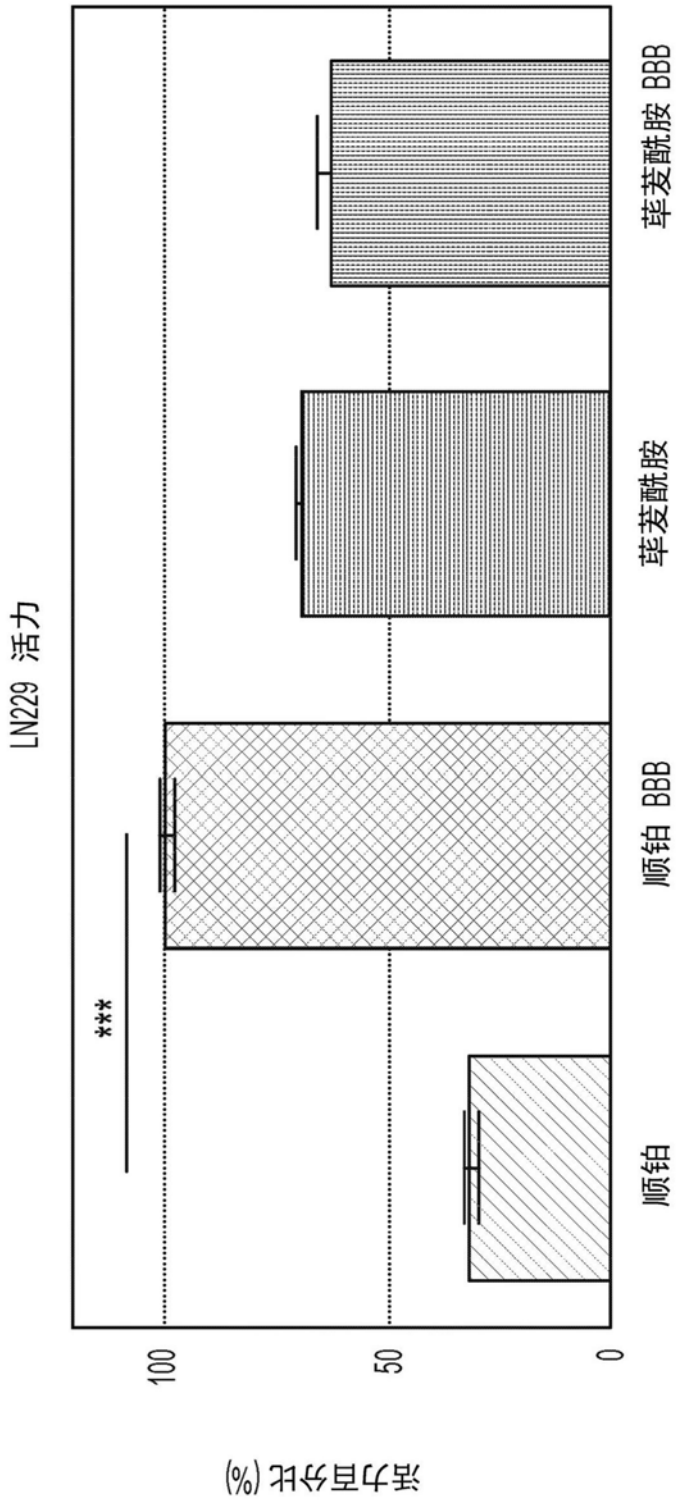


图11

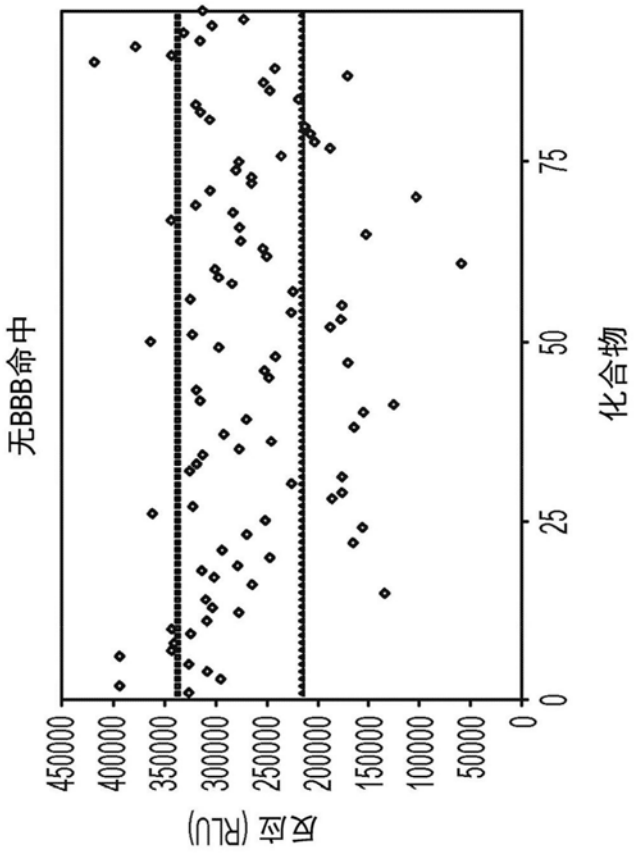

无BBB命中
反应 (RLU)
450000
400000
350000
300000
250000
200000
150000
100000
50000
0
0
25
50
75
化合物

图12A

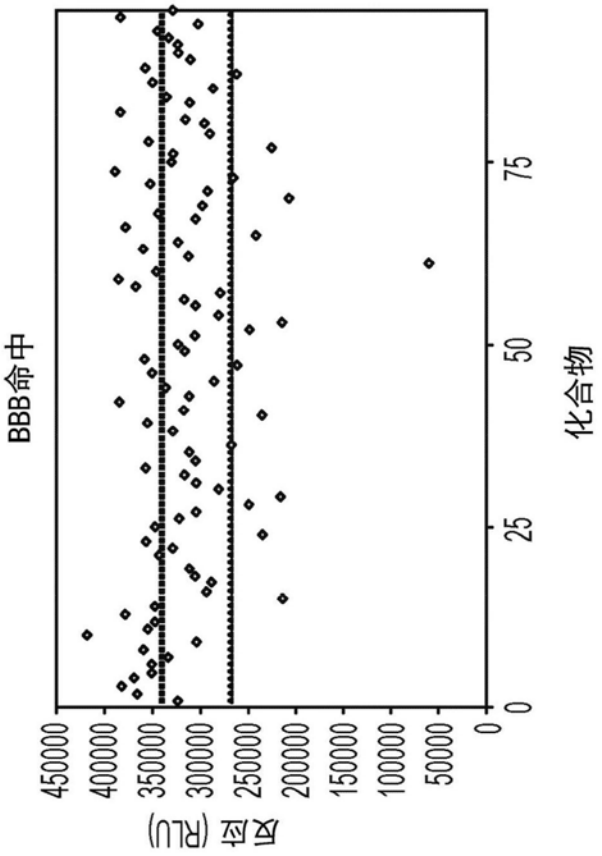

BBB命中
反应 (RLU)
450000
400000
350000
300000
250000
200000
150000
100000
50000
0
0
25
50
75
化合物

图12B

	1	2	3	4	5	6
A	缓冲液	0414 AG 490	0431 ML 9 盐酸盐	3439 NH 125	0541 法舒地尔 盐酸盐	0741 GF 109203X
B	缓冲液	1264 SB 202190	1284 奥罗莫星	1300 LFM -A 13	1321 ZM 336372	1366 ZM 449829
C	缓冲液	1407 PP 2	1459 SU 4312	1496 SP 600125	1580 波伏醇 A	1581 波伏醇 B
D	缓冲液	1937 NSC 693868	1962 SB 239063	1969 SL 327	2002 RO 31-8220 甲磺酸盐	2072 氨基波伏醇A
E	缓冲液	2291 1,2,3,4,5,6- 六溴环己烷	2415 HA 1100 盐酸盐	2416 BIB X 1382 二盐酸盐	2442 CGP 53353	2457 团网菌碱 (arcyriaflavin) A
F	缓冲液	2542 Ki 8751	2558 10-DEBC 盐酸盐	2559 TP CA-1	2560 SB 218078	2591 TCS 359
G	缓冲液	2694 PD 407824	2718 LY 364947	2731 CGP 57380	2768 PQ 401	2814 PI 828
H	缓冲液	2977 GW843682X	3000 艾瑞莎	3037 SU 5416	3063 1- 萘基 PP1	3572 GSK 650394

图13A

	7	8	9	10	11	12
A	1110 染料木素	1130 LY 294002 盐酸盐	1144 U0126	1213 PD 98059	1254 Y-27632 二盐酸盐	缓冲液
B	1367 ZM 39923 盐酸盐	1381 GW 5074	1397 PP 1	1402 SB 203580 盐酸盐	1405 (-)- 土曲霉酸	缓冲液
C	3544 KU 55933	1614 SB 431542	1616 SB 216763	1617 SB 415286	1777 牛蒡子苷元	缓冲液
D	2151 API-2	2238 GW 441756	2239 GW583340 二盐酸盐	2272 Ro 08-2750	2275 TBB	缓冲液
E	2458 ZM 447439	2471 ER 273 19 马来酸盐	2475 ZM 323881 盐酸盐	2499 ZM 306416 盐酸盐	2539 IKK 16	缓冲液
F	2605 P D 198306	2609 雷福菌素 (ryuvidine)	2611 IM D 0354	2639 CGK 733	2693 PHA 665752	缓冲液
G	2828 NU 7026	2902 D 4476	2908 EO 1428	2910 H 89 二盐酸盐	2926 FPA 124	缓冲液
H	3194 BIO	3269 SD 208	3271 化合物 401	3314 BI 78D3	3318 SC 514	缓冲液

图13B