

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2023 年 3 月 30 日 (30.03.2023)



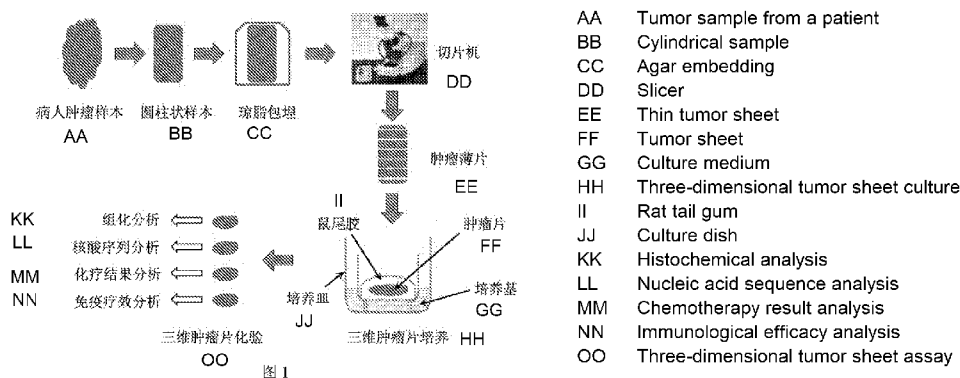
(10) 国际公布号
WO 2023/045494 A1

- (51) 国际专利分类号:
C12Q 1/02 (2006.01) *C12N 5/09* (2010.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2022/104365
- (22) 国际申请日: 2022 年 7 月 7 日 (07.07.2022)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
202111114318.9 2021 年 9 月 23 日 (23.09.2021) CN
- (71) 申请人: 澳门大学 (UNIVERSITY OF MACAU) [CN/CN]; 中国澳门特别行政区氹仔大学大马路, Macau 999078 (CN)。南方科技大学 (SOUTHERN UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) [CN/CN]; 中国广东省深圳市南山区学苑大道 1088 号, Guangdong 518055 (CN)。

- (72) 发明人: 邓初夏 (DENG, Chuxia); 中国澳门特别行政区氹仔大学大马路澳门大学, Macau 999078 (CN)。刘子铭 (LIU, Tzu Ming); 中国澳门特别行政区氹仔大学大马路澳门大学, Macau 999078 (CN)。邢富强 (XING, Fuqiang); 中国澳门特别行政区氹仔大学大马路澳门大学, Macau 999078 (CN)。王冠宇 (WANG, Guanyu); 中国澳门特别行政区氹仔大学大马路澳门大学, Macau 999078 (CN)。
- (74) 代理人: 北京超凡宏宇专利代理事务所 (特殊普通合伙) (CHOFN INTELLECTUAL PROPERTY); 中国北京市海淀区北四环西路 68 号左岸工社 1215-1218 室, Beijing 100080 (CN)。
- (81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ,

(54) **Title:** METHOD FOR SCREENING DRUG AND METHOD FOR CULTURING THREE-DIMENSIONAL TUMOR SLICE MODEL

(54) 发明名称: 一种药物的筛选方法以及三维肿瘤切片模型的培养方法



(57) **Abstract:** Provided are a method for screening a drug and a method for culturing a three-dimensional tumor slice model, which relate to the field of biomedicines. A method for culturing a three-dimensional tumor slice model is established, and in combination with label-free technology and/or a time-lapse imaging method for an apoptosis reporter substance, high-throughput screening of a drug is implemented, and a high-efficiency drug for a specific cancer sample is obtained within one week. In the culture of the three-dimensional tumor slice model, immune components of an original tumor are completely retained, allowing for the successful implementation of an immune checkpoint blocking test by using an immune checkpoint inhibitor. Said technology provides a cheap, fast, and simple platform for anti-cancer drug discovery and accelerates precise anti-cancer treatment.

(57) **摘要:** 提供了一种药物的筛选方法以及三维肿瘤切片模型的培养方法, 涉及生物医药领域。建立了一种三维肿瘤切片模型的培养方法, 结合无标记技术和/或细胞凋亡报告物质的延时成像方法, 实现了对药物的高通量筛选, 并在一周内取得针对特定癌症样本的高效药物。三维肿瘤切片模型的培养完整保留了原始肿瘤的免疫成分, 这使得用免疫检查点抑制剂成功实现免疫检查点阻断试验成为可能。该技术为抗癌药物发现提供了一个廉价、快速和简单的平台, 加速了精准抗癌治疗。

IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ,
LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK,
MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA,
PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD,
SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ,
UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区
保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ,
NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM,
AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG,
CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU,
IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT,
RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI,
CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

— 包括国际检索报告 (条约第21条(3))。

一种药物的筛选方法以及三维肿瘤切片模型的培养方法

相关申请的交叉引用

本公开要求于 2021 年 09 月 23 日提交中国专利局的申请号为“CN 202111114318.9”名称为“一种药物的筛选方法以及三维肿瘤切片模型的培养方法”的中国专利申请的优先权，其全部内容通过引用结合在本公开中。

技术领域

本公开涉及生物医药技术领域，具体而言，涉及一种药物的筛选方法以及三维肿瘤切片模型的培养方法。

背景技术

精准医学是一种考虑个人基因、环境和生活方式暴露的影响来定制干预措施的方法。以往用于癌症治疗的个性化医疗的药物发现模型存在很多缺陷，2D 培养的人细胞系很容易失去其原始功能，并且其形态、生物功能、遗传等方面的表现和人体生理差异极大，固定和染料标记忽略了药物治疗微环境中的细胞动力学和代谢变化，难以定量评估肿瘤碎片中的药物敏感性和效率。因此，许多评估候选药物安全性和有效性的生物学测试必须在动物体内进行。对整只动物进行的此类测试的成本高昂，导致医疗保健成本更高。

个体化治疗的成功需要准确的预测以确定药物敏感性。而准确的预测需要与其原始条件最相似的微环境中生长的肿瘤样本。目前，基于三维培养条件的细胞培养模型和类器官培养模型得到了医药行业的关注。采用三维培养条件取代普通培养条件应用于培养筛药模型，其能够在一定程度上保留类器官或细胞的部分生理特征，但同时也存在着很多缺陷。

比如，现有技术无法更加直观地从分子层面获取培养模型的信息，且需要终止试验后，才能对细胞进行详细的鉴定和分析，无法实时且直观有效地对药物进行评估和筛选。

例如现有专利利用受试者自己的血清或体液用于 3D 培养条件下培养受试者的组织或癌细胞，使得细胞或组织在更加真实地微环境的生长。然而，该方法存在一定的局限，患者可提供的血清或体液的量是有限的，且过度的提取患者的血清或体液会对患者的身心造成一定程度的伤害，不利于患者的治疗和恢复。此外，该方法也是基于 3D 培养细胞或组织的状态进行观察，无法更加直观地从分子层面获取细胞或组织的信息，需要在试验结束后，才能进一步进行分析鉴定。

尽管针对如何真实模拟地癌症患者的肿瘤微环境的问题做出了许多努力，但在创建适用于来自不同个体的所有类型肿瘤的体外环境方面仍然存在挑战。三维细胞培养模型以及类器官培养模型对于药物治疗以及新药开发仍然存在着的敏感性和反应性不足的缺点，且筛药过程需要耗费大量的时间，无法在短时间内实现地对药物的实时评估和筛选。

发明内容

本公开提供一种药物的筛选方法，其包括以下步骤：对三维肿瘤切片模型进行三维培养；其中，所述三维肿瘤切片模型的制备方法包括：将标记有细胞凋亡报告物质的肿瘤组织进行切片处理，获得所述三维肿瘤切片模型；

采用候选药物对三维培养中的三维肿瘤切片模型进行处理，基于所述凋亡细胞报告物质的信号筛选候选药物。

在一些实施方式中，所述三维肿瘤切片的厚度为 200~300 μ m。

在一些实施方式中，所述切片处理的方法如下：采用凝胶对肿瘤组织进行包裹后切片。

在一些实施方式中，所述三维培养的条件如下：采用插入式细胞培养皿对三维肿瘤切片进行三维培养，采用的培养液中包含体积分数为 15%~20% 的胎牛血清以及 40~60 μ g/ml 庆大霉素。

在一些实施方式中，所述细胞凋亡报告物质包括：用于检测细胞凋亡的传感器。

在一些实施方式中，所述传感器包括 caspase-3 传感器。

在一些实施方式中，所述细胞凋亡报告物质包括：SCAT3 或 zipGFP。

在一些实施方式中，标记有细胞凋亡报告物质的肿瘤组织的获取方法如下：将所述标记有细胞凋亡报告物质的细胞或其培养物导入动物或动物模型的皮下组织，以形成所述肿瘤组织。

在一些实施方式中，在采用三维肿瘤切片模型对候选药物进行筛选前，所述筛选方法还包括：采用标记有细胞凋亡报告物质的肿瘤细胞模型对药物进行预筛选，以获得所述候选药物。

在一些实施方式中，在采用三维肿瘤切片模型进行药物筛选后，所述筛选方法还包括：对临床肿瘤切片样本进行三维培养，将候选药物或经三维肿瘤切片模型筛选后的药物对三维培养中的临床肿瘤切片样本进行处理，基于临床肿瘤切片样本中的内源性荧光物的信号筛选药物。

在一些实施方式中，所述内源性荧光物包括：脂褐素、黄素、芳香族氨基酸和 NADH 中的至少一种。

在一些实施方式中，当所述内源性荧光物为脂褐素时，内源性荧光物的荧光检测条件如下：单光子的激发波长为 488~570nm，双光子的激发波长为 970~1140nm，发射波长为 550~700nm。

在一些实施方式中，所述候选药物包括抗癌药物。

在一些实施方式中，所述抗癌药物包括免疫检查点抑制剂和抗肿瘤药物中的任意一种；

在一些实施方式中，所述肿瘤包括乳腺癌、结肠癌、卵巢癌、子宫癌、肝癌、胃癌、肺癌和鼻咽癌中的任意一种。

本公开还提供了一种三维肿瘤切片模型的培养方法，其包括：对三维肿瘤切片模型进行三维培养；其中，所述三维肿瘤切片模型的制备方法包括：将标记有细胞凋亡报告物质的肿瘤组织进行切片处理，获得所述三维肿瘤切片模型。

在一些实施方式中，所述三维肿瘤切片模型的厚度为 200~300 μ m。

在一些实施方式中,所述切片处理的方法如下:采用凝胶对肿瘤组织进行包裹后切片。

在一些实施方式中,所述三维培养的条件如下:采用插入式细胞培养皿对三维肿瘤切片模型进行三维培养,采用的培养液中包含体积分数为15%~20%的胎牛血清以及40~60 μ g/ml庆大霉素。

本公开还提供一种用于筛选药物的方法,其特征在于,其包括以下步骤:对临床肿瘤切片样本进行三维培养,将候选药物对三维培养中的临床肿瘤切片样本进行处理,基于临床肿瘤切片样本中的内源性荧光物的信号进一步筛选药物。

本公开还提供一种实时预测药物反应的方法,其特征在于,其包括:对三维肿瘤切片模型进行三维培养;其中,所述三维肿瘤切片模型的制备方法包括:将标记有细胞凋亡报告物质的肿瘤组织进行切片处理,获得所述三维肿瘤切片模型;

采用候选药物对三维培养中的三维肿瘤切片模型进行处理,基于所述细胞凋亡报告物质的信号实时预测候选药物的反应。

本公开还提供一种药物的筛选体系,所述筛选体系包括:

经三维培养的三维肿瘤切片模型;

候选药物;

所述三维肿瘤切片模型通过将标记有细胞凋亡报告物质的肿瘤组织进行切片处理获得;

所述筛选体系采用所述候选药物对经三维培养的三维肿瘤切片模型进行处理,基于所述凋亡细胞报告物质的信号筛选候选药物。

在一些实施方式中,所述三维肿瘤切片模型的厚度为200~300 μ m。

在一些实施方式中,所述切片处理的方法如下:采用凝胶对肿瘤组织进行包裹后切片。

在一些实施方式中,所述三维培养的条件如下:采用插入式细胞培养皿对三维肿瘤切片模型进行三维培养,采用的培养液中包含体积分数为15%~20%的胎牛血清以及40~60 μ g/ml庆大霉素。

在一些实施方式中,所述细胞凋亡报告物质包括:用于检测细胞凋亡的传感器。

在一些实施方式中,所述传感器包括caspase-3传感器。

附图说明

为了更清楚地说明本公开实施例的技术方案,下面将对实施例中所需要使用的附图作简单地介绍,应当理解,以下附图仅示出了本公开的某些实施例,因此不应被看作是对范围的限定,对于本领域普通技术人员来讲,在不付出创造性劳动的前提下,还可以根据这些附图获得其他相关的附图。

图1为三维肿瘤切片模型的制备以及筛药流程示意图;

图2为三维肿瘤切片模型以及临床样本切片模型应用于筛药的流程示意图;

图3为三维肿瘤切片模型完整保留了原始肿瘤样本的结构和肿瘤标志物;其中,(A)形态观察裸鼠乳腺B477-GFP细胞形成的肿瘤在三维肿瘤切片模型中的肿瘤生长;(B)检测裸鼠乳腺B477-GFP细胞形成的肿瘤在三维肿瘤切片模型中肿瘤细胞的活力;(C,D)组织病理学检测基因工程小鼠肿瘤三维肿瘤切片模型培养过程的生物标志物,蓝色为苏木精核复染,棕色为DAB阳性蛋白, γ H2AX是DNA双链断裂标记;Desmin是调节肌节结构;E-cadherin是一种钙依赖性细胞-细胞粘附分子;Vimentin维持细胞完整性并锚定细胞器在细胞质中的位置;CK7是上皮性来源的肿瘤常用的标记物;(E)定量分析C、D中三维肿瘤切片模型中生物标志物;Caspase-3没有被激活,因此没有计算;抗体染色的组织载玻片的5个数字图像用于计算每个样品的平均值;

图4为三维肿瘤片培养模型能够维持其原始肿瘤的细胞库和免疫成分;其中,(A-D)组织学分析带有免疫能力的基因工程小鼠肿瘤在三维肿瘤片模型中免疫生物标志物变化;蓝色为苏木精染核,棕色为DAB阳性蛋白;CD3e/CD8a为T淋巴细胞标志物;CD11b为巨噬细胞和小胶质细胞标志物;CD45为T、NK、树突状和淋巴因子激活的杀伤(LAK)细胞标志物;F4/80为小鼠巨噬细胞标志物;PD-1为一种由T细胞表达的免疫受体;PD-L1为髓系、淋巴系、正常上皮细胞或癌细胞表达的PD-1的配体;(E)RNA序列分析免疫相关基因的表达水平;ssGSEA代表样本内基因数据集的水平上调或下调;(F)T细胞和B细胞免疫标记基因表达的RNA序列分析;其中,TPM用于估计转录本或基因表达水平;(G)通过计算D1至D8的T细胞和B细胞的Pearson相关系数,与D0比较基因表达水平;

图5为基于FRET技术实时预测三维肿瘤片对药物的敏感性;其中,(A)观察10 μ M阿霉素诱导MDA-MB-231-C3细胞凋亡在48小时内的动态变化;CFP(ex:430nm/em:480nm)与YFP(ex:430nm/em:520nm);(B)量化分析单个细胞的FRET变化;(C)量化分析阿霉素诱导MDA-MB-231-C3细胞凋亡数量和细胞总数;其中,绿线和蓝线分别表示总细胞和凋亡细胞数;(D)顺铂/阿霉素在三维肿瘤片模型中诱导的细胞凋亡;用100 μ M顺铂或10 μ M阿霉素对MDA-MB-231-C3肿瘤片处理六天;(E)量化分析面板(D)实验中FRET比率;(F)不同剂量顺铂处理MDA-MB-231-C3三维肿瘤片模型中细胞凋亡的动态过程;(G)量化面板(F)实验中三维肿瘤片的FRET比率;(H)量化分析100 μ M顺铂处理六天后MDA-MB-231-C3三维肿瘤片的面积;

图6为通过MTT法定量评估三维肿瘤片对药物的疗效;其中,(A)通过观察GFP荧光和MTT染色观察100 μ M顺铂处理或未处理的B477-GFP乳腺肿瘤切片在0~7天内的变化;比例尺为1mm;(B)MTT法评估面板(A)中的药物功效;(C)FRET荧光(d0-6)和MTT染色(d6)观察1 μ M硼替佐米处理六天的MDA-MB-231-C3肿瘤片;(D)FRET比率(d0-6)和MTT测定(d6)评估面板(C)中的药物敏感性;比例尺为2毫米;(E,F)通过PI、FRET比率和MTT法测定不同剂量顺铂处理6天的MDA-MB-231-C3肿瘤片的药物敏感性;比例尺为1毫米;

(G)PI染色和MTT法观察顺铂处理6天的B477三维肿瘤片;比例尺为0.8mm;(H)MTT法测定(G)中的药效;(I)MTT法评估顺铂处理5天的PDX来源的结肠肿瘤片对药物敏感性;

图7为基于FRET技术实时预测小鼠来源的多种癌症样本对药物敏感性及MTT终点法预测病人手术切除的肿

瘤在三维肿瘤片培养后对药物的疗效；其中，(A) 基于 FRET 技术筛选三维肿瘤片抗肿瘤药物。药物分别处理 MDA-MB-231-C3 和 HepG2-C3 三维肿瘤片；(B) 药物处理的三维肿瘤片后的代表性 FRET 图像；比例尺为 1 毫米；(C) MTT 染色药物处理 4 天的人结肠和乳腺三维肿瘤片；比例尺为 1 毫米；(D-F) MTT 法检测药物处理 4 天的人结肠三维肿瘤片的药物反应；其中，D (结肠病例 1)、E (结肠病例 2)、F (结肠病例 3)；色瑞替尼 (2.5 μ M)、盐酸柔红霉素 (2.5 μ M)、奥希替尼 (5 μ M)，其余用于病人结肠样本的药物浓度均为 20 μ M；(G, H) MTT 法检测药物处理 4 天的病人乳腺癌三维肿瘤片的药物反应；G (乳房病例 1)、H (乳房病例 2)；除米托蒽醌 Mitoxantrone (5 μ M) 和来那替尼 Neratinib (10 μ M) 外，用于病人乳腺样本的药物浓度为 20 μ M；

图 8 为三维肿瘤片对 PD-1/PD-L1 免疫检查点抑制剂的药物反应；(A) PD-1 抗体诱导小鼠三维肿瘤片细胞死亡，将小鼠 Smad4^{co/co}；Pten^{co/co}；Alb-Cre (SPC) 肿瘤切片 (658-607) 用对照 IgG 或 α PD-1 抗体处理 6 天后，MTT 法分析肿瘤片的细胞活力；(B) PD-L1 抗体诱导小鼠三维肿瘤片细胞死亡；MTT 法分析对照 IgG 或 α PD-L1 处理 6 天后的小鼠 SPC 肿瘤切片 (658-607) 的活力；与 PD-L1 IHC % 的水平做对应比较 (n/a: PD-L1 IHC 无数据)；(C) 组化分析 (B) 中新鲜肿瘤样本的 PD-L1 水平；(D) 病人手术切除肿瘤的 PD-L1 IHC 染色；(E) PD-L1 抗体诱导病人三维肿瘤片的细胞死亡；MTT 法分析对照 IgG1 或 α PD-L1 (durvalumab) 处理 7 天后的人结肠癌 (结肠病例 4-结肠病例 7) 肿瘤片；(F) PD-1 抗体诱导人结肠癌细胞死亡；MTT 法分析对照 IgG4 或 α PD-1 抗体处理 7 天后的人结肠肿瘤片 (结肠病例 7-结肠病例 9)；(G) MTT 法测定 PD-1 抗体联合 IL-2 处理 6 天小鼠 MK 3941 三维肿瘤片的免疫治疗反应；

图 9 为脂褐素 (lipofuscin) 作为无标记的自发荧光分子在化疗和免疫治疗的肿瘤样本出现红色荧光增强；其中，(A) 脂褐素的荧光发射光谱；(B) 双光子影像观察 25 μ M 顺铂、2.5 μ g/mL α PD-1 或 2.5 μ g α PD-L1 抗体处理带 GFP 的小鼠三维肿瘤片中脂褐素荧光增强现象，GFP (绿色，例如 @960 nm) 和脂褐质 (红色，例如 @1040 nm)；

图 10 为 PI 染色和 MTT 染色方法确认化疗和免疫治疗后在小鼠乳腺三维肿瘤片样本出现细胞死亡；其中，(A) 左列为双光子荧光成像观察 NADH (蓝色，ex.@740nm)、碘化丙啶 PI (红色，ex.@1040 nm) 和 collagen 的二次谐波生成成像 (绿色，ex.@1040 nm)；右列为 collagen 的二次谐波生成成像 (蓝色，ex.@890 nm)、flavins 的双光子荧光成像 (绿色，ex.@890 nm) 和碘化丙啶 PI (红色，ex.@1040 nm)；这组图像通过碘化丙啶 (PI) 染色评估了用 25 μ M 顺铂、2.5 μ g/mL α PD-1 或 2.5 μ g/mL α PD-L1 处理的基因工程小鼠乳腺三维肿瘤片中的癌细胞死亡；(B) MTT 法染色 25 μ M 顺铂、2.5 μ g/mL α PD-1 或 2.5 μ g/mL α PD-L1 处理的三维肿瘤片；(C) MTT 法测定顺铂处理的小鼠乳腺三维肿瘤片中的细胞活力；

图 11 为基于无标记荧光成像技术实时监测三维肿瘤片对化疗和免疫检查点抑制剂治疗的反应；其中，(A) 25 μ M 顺铂、2.5 μ g/mL α PD-1 或 2.5 μ g/mL α PD-L1 处理 4 天的基因工程小鼠肿瘤片中胶原蛋白 collagen、脂褐素 lipofuscin 和黄素 flavin 的双光子自发荧光影像；比例尺为 24 μ m；(B) 药物处理 0-5 天的基因工程小鼠三维肿瘤片中脂褐素的双光子自发荧光增强成像；比例尺为 24 μ m；(C) 量化分析药物处理的基因工程小鼠三维肿瘤片中脂褐素自发荧光强度；(D, E) 10 μ g/mL α PD-1 或 10 μ g/mL α PD-L1 处理三天的人鼻咽癌三维肿瘤片中脂褐素的双光子自发荧光成像和脂褐素强度评估；比例尺为 24 μ m；(F, G) 10 μ g/mL α PD-1 或 10 μ g/mL α PD-L1 处理 7 天的人结肠癌切片 (结肠病例 10) 中脂褐素的双光子自发荧光成像和脂褐素强度评估。

具体实施方式

术语定义

如本文所用，术语“细胞活力”是指总细胞中活细胞所占的百分比。

如果本所所用，术语“细胞凋亡”是指为维持内环境稳定，由基因控制的细胞自主的有序的死亡，即主动的由基因决定的自动结束生命的过程，所以也常常被称为程序化细胞死亡。

如果本所所用，术语“高通量筛选”是指以分子水平和细胞水平的实验方法为基础，以微板（诸如不同密度的微孔平板）形式作为实验工具载体，以自动化操作系统执行试验过程，以灵敏快速的检测装置在同一时间检测数以千万的样品、采集实验数据和数字化分析处理，并以得到的相应数据库支持运转的技术体系。

为使本公开实施方式和实施例的目的、技术方案和优点更加清楚，下面将对本公开实施方式和实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述。实施方式和实施例中未注明条件者，按照常规条件或制造商建议的条件进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者，均为可以通过市售购买获得的常规产品。

本公开一实施方式提供了一种药物的筛选方法，其包括以下步骤：对三维肿瘤切片模型进行三维培养；其中，所述三维肿瘤切片模型的制备方法包括：将标记有细胞凋亡报告物质的肿瘤组织进行切片处理，获得所述三维肿瘤切片模型；然后，采用候选药物对三维培养中的三维肿瘤切片模型进行处理，基于所述细胞凋亡报告物质的信号筛选候选药物，可参照图 1。

本文中“采用候选药物对三维培养中的三维肿瘤切片模型进行处理”可以指：将药物与三维肿瘤切片模型接触，例如可以通过在三维培养的培养基中添加药物的手段。本公开建立的三维肿瘤切片模型可以准确保留原始肿瘤的细胞库和免疫成分。

上述筛选方法允许对细胞死亡进行时间进程和定量评估，能够测试针对手术切除的癌症的个体化药物反应和免疫检查点阻断疗法。与其他离体系统（如 PDO）相比，具有几个主要优点：1）三维肿瘤切片模型中含有基质细胞、免疫细胞和癌细胞；2）所有切除的肿瘤样本均可用于药物评价；3）它是一种快速且低成本的体外系统。事实上，筛选或评估过程可以在 4-7 天内完成，而 PDO 需要两周以上的时间。这些特性使三维肿瘤切片成为精准肿瘤学领域的生理相关模型，用于为每个癌症患者选择最佳和最有效的药物。

在可选的实施方案中，所述三维肿瘤切片的厚度为 200~300 μ m，例如可以为 210~290 μ m、230~280 μ m 或 240~260 μ m，诸如可以为 200 μ m、220 μ m、240 μ m、260 μ m、280 μ m 或 300 μ m。三维肿瘤切片的厚度在本公开的范围可以提高切片的效率和质量，完好地保持原初肿瘤的微环境。同时保证检测内源性荧光信号的有效性，有利于

保持检测结果的有效性和稳定性。三维肿瘤切片的厚度低于该范围可能导致切片的效率和质量，破坏原初肿瘤的微环境，高于该厚度范围可能导致检测内源性荧光信号的降低，不利于保持检测结果的有效性和稳定性。

可选地，所述切片处理的方法如下：采用琼脂糖凝胶对肿瘤组织进行包裹后切片，步骤如下：肿瘤被收集并放入预冷的。DMEM 培养液，含 10%FBS 和 1%青霉素/链霉素（Gibco）；采用低熔点琼脂糖凝胶对肿瘤组织进行包裹后切片；肿瘤切片（200~300 μ m）是在手术后 2-6 小时内使用莱卡 VT1200 S（Leica Biosystems Nussloch GmbH, 德国）在无菌 PBS 条件下做震动切片。

在可选的实施方式中，三维培养条件可参照现有公开的方法和材料，只要能够满足使三维肿瘤切片模型呈空间立体方式生长即可。

可选地，所述三维培养的条件如下：采用插入式细胞培养皿对三维肿瘤切片进行三维培养，采用的培养液中包含体积分数为 15%~20%的胎牛血清以及 40~60 μ g/ml 庆大霉素，胎牛血清的体积分数例如为 16%~19%、17%~18% 或 17.5%~18%，诸如可为 15%、16%、17%、18%、19%或 20%。庆大霉素的终浓度例如 43~58 μ g/ml、45~55 μ g/ml 或 47~52 μ g/ml，诸如可以为 40 μ g/ml、45 μ g/ml、50 μ g/ml、55 μ g/ml 或 60 μ g/ml。

可选地，所述三维培养的条件如下：将冰上预冷 A（鼠尾胶原 I），B（10 X Ham's F-12）和 C（无菌缓冲液，2.2g NaHCO₃ 在 100ml 0.05N NaOH 和 200mM HEPES）按照 8: 1: 1 比例配制。取配置的 100 μ L 凝胶溶液平铺到直径为 12 mm 的 Millicell 插入式细胞培养内皿（PIHP01250）中的膜上（膜孔径 0.4 mm），放入 37 °C 孵化器中保温 20-30 分钟，直到凝胶完全凝固。然后，将肿瘤切片小心地放置在凝胶表面。再加 100 μ L 凝胶溶液覆盖到肿瘤片上，放入 37 °C 孵化器中保温 20-30 分钟，直到凝胶完全凝固。最后在插入式细胞培养外皿中加入 400 μ L 培养液。培养液是 Ham's F12 包含 20%的胎牛血清和 50 μ g/毫升庆大霉素。最后，三维肿瘤切片放置在 5%的二氧化碳和 37°C 的培养箱中培育并且每 4 天更改一次培养液。

本公开的三维肿瘤片的培养条件保留了原始肿瘤的重要特征，例如癌症异质性和结构、免疫成分和稳定的基因表达。

在可选实施方式中，本公开不对所述细胞凋亡报告物质的种类进行限定，只要满足能够检测细胞凋亡的作用即可。在一些实施方式中，其可以包括：用于检测细胞凋亡的传感器。

在可选的实施方式中，所述细胞凋亡报告物质包括用于检测细胞凋亡的传感器，可选地为胱天蛋白酶-3 传感器 Sensor C3。

可选地为胱天蛋白酶-3 传感器（Sensor C3）。传统上，评估药物反应依赖于破坏性固定和有毒染料标记，它们分别对细胞具有破坏性和毒性，有价值的细胞学和代谢信息被丢弃。为了克服与缺乏有效的预测性生物标志物或药物发现报告基因相关的挑战，本公开建立了基于 FRET 的传感器 Sensor C3 作为细胞凋亡报告物质的三维肿瘤切片模型，以筛选多种抗癌药物。这是通过抑制细胞生长和诱导细胞凋亡来实现的。这种方法应该适用于大规模的药物筛选，以缩小潜在的候选药物进行进一步分析。

在其他实施方式中，细胞凋亡报告物质还可以包括但不限于 SCAT3 和 zipGFP。

在可选的实施方式中，标记有细胞凋亡报告物质的肿瘤组织的获取方法如下：将所述标记有细胞凋亡报告物质的细胞或其培养物导入动物或动物模型的皮下组织，以形成标记有细胞凋亡报告物质的肿瘤组织。

在一些实施方式中，筛选方法还包括对三维肿瘤切片模型进行组化分析、核酸序列分析、化疗结果分析以及免疫疗效分析中的至少一种。

在可选的实施方式中，在采用三维肿瘤切片模型对候选药物进行筛选前，所述筛选方法还包括：采用标记有细胞凋亡报告物质的肿瘤细胞模型对药物进行预筛选，以获得所述候选药物。

在可选的实施方式中，在采用三维肿瘤切片模型进行药物筛选后，所述筛选方法还包括：对临床肿瘤切片样本进行三维培养，将候选药物或经三维肿瘤切片模型筛选后的药物对三维培养中的临床肿瘤切片样本进行处理，基于临床肿瘤切片样本中的内源性荧光物的信号筛选药物，可参照图 2。

在一些实施方式中，除了转基因荧光标记，内源性荧光物（内在代谢荧光团）也可以提供有价值的替代品。近年来，无标记成像技术取得了显著进展，例如肿瘤微环境的可视化、膜电位、未标记的完整乳腺癌细胞和肿瘤异种移植物中的铁结合转铁蛋白、细胞周期状态和细胞代谢反应。本公开首次将无标记荧光成像技术应用于三维肿瘤片的时程成像，结果表明，无标记荧光成像在三维肿瘤片药效学可视化中的潜力。

肿瘤组织中存在很多内源性荧光物，这些内源性荧光物能够被特定波长的激发光激发，发射特定波长段的荧光信号，而这些信号最终可以实现对应分子的无标记成像。激发的方式包括单光子激发和双光子激发。

可选地，所述内源性荧光物包括：脂褐素、NADH 和黄素类（Flavins）中的至少一种。内源性荧光物可选地为脂褐素，据信不受理论的约束，本公开范围内的内源性荧光物诸如脂褐素的背景值较低，不容易受到其它代谢物状态改变强度或者光学参数，本公开的内源性荧光物诸如脂褐素对于细胞凋亡比较具有专一性，能够更加准确有效地反应细胞凋亡。

可选地，当所述内源性荧光物为脂褐素时，内源性荧光物的荧光检测条件如下：单光子的激发波长为 488~570nm，双光子的激发波长为 970~1140nm，发射波长为 550~700nm。脂褐素可以采用单光子激活或双光子激发，无论是采用哪种激发方式，发射波段均为 550~700nm，在该区间内都可以侦测。

在可选的实施方式中，临床肿瘤切片样本的切片方法可以同前述实施方式中三维肿瘤切片模型的切片方式，在此不再赘述。

可选地，所述候选药物包括抗癌药物，可选地，所述抗癌药物包括免疫检查点抑制剂和抗肿瘤药物中的任意一种。可选地，所述肿瘤包括乳腺癌、结肠癌、卵巢癌、子宫癌、肝癌、胃癌、肺癌和鼻咽癌中的任意一种。

本公开实施方式提供了一种三维肿瘤切片模型的培养方法，其包括：对三维肿瘤切片模型进行三维培养；其中，所述三维肿瘤切片模型的制备方法包括：将标记有细胞凋亡报告物质的肿瘤组织进行切片处理，获得所述三维肿瘤

切片模型。

可以理解的是，三维肿瘤切片模型、其制备及其培养方法同前述任意实施方式所述，不再赘述。

本公开实施方式还提供了一种用于筛选药物的方法，其包括以下步骤：对临床肿瘤切片样本进行三维培养，将候选药物对三维培养中的临床肿瘤切片样本进行处理，基于临床肿瘤切片样本中的内源性荧光物的信号进一步筛选药物。

本公开实施方式还提供了一种实时预测药物反应的方法，其包括：对三维肿瘤切片模型进行三维培养；其中，所述三维肿瘤切片模型的制备方法包括：将标记有细胞凋亡报告物质的肿瘤组织进行切片处理，获得所述三维肿瘤切片模型。采用候选药物对三维培养中的三维肿瘤切片模型进行处理，基于所述细胞凋亡报告物质的信号实时预测候选药物的反应。

可以理解的是，在用于筛选药物的方法以及实时预测药物反应的方法的实施方式中，三维肿瘤切片模型的制备方法、三维培养的条件以及信号的检测方法均可以同前述任意的实施方式所述，在此不再赘述。

总之，三维肿瘤切片模型（三维肿瘤片）展示了其在相对较短的时间内直接在患者来源的肿瘤组织上测试化合物或抗体的强大潜力，不仅适用于靶向化疗，也适用于免疫治疗。凭借转基因报告系统和无标记代谢成像技术，三维肿瘤片可以加速药物发现，通过提供准确的临床指导来改善癌症治疗，因此，当标准临床选择时，可能会改善个体患者的个性化治疗所面临的筋疲力尽的困境。

本公开建立了三维肿瘤切片模型的培养方法，结合无标记技术和/或细胞凋亡报告物质的延时成像方法，实现了对药物的高通量筛选，并在一周内取得针对特定癌症样本的高效药物。三维肿瘤切片模型的培养完整保留了原始肿瘤的免疫成分，这使得用免疫检查点抑制剂成功实现免疫检查点阻断试验成为可能。该技术为抗癌药物发现提供了一个廉价、快速和简单的平台，加速了精准抗癌治疗。

以下结合实施例对本公开的特征和性能作进一步的详细描述。

实施例 1

三维肿瘤切片模型能够维持其原始肿瘤的细胞库和免疫成分。

三维肿瘤切片模型的制备方法如下：将新鲜肿瘤嵌入低熔点琼脂糖并用振动切片机以 300 μm 的厚度切片。然后，将肿瘤切片放置在气液界面系统上进行培养，并从培养前的原始肿瘤（指第 0 天，记为 D0）到培养中的第 7 天（计为 D7）捕获切片的时程图像，使用 Leica M165FC 荧光体视显微镜。

其中，三维肿瘤切片的培养条件为：将冰上预冷 A（鼠尾胶原 I），B（10 X Ham's F-12）和 C（无菌缓冲液，2.2g NaHCO_3 在 100ml 0.05N NaOH 和 200mM HEPES（4-羟乙基哌嗪乙磺酸））按照 8: 1: 1（体积比）比例配制。取配置的 100 μL 凝胶溶液平铺到直径为 12 mm 的 Millicell 插入式细胞培养内皿（PIHP01250）中的膜上（膜孔径 0.4 mm），放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵化器中保温 20-30 分钟，直到凝胶完全凝固。然后，将肿瘤切片小心地放置在凝胶表面。再加 100 μL 凝胶溶液覆盖到肿瘤片上，放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵化器中保温 20-30 分钟，直到凝胶完全凝固。最后在插入式细胞培养外皿中加入 400 μL 培养液。培养液是 Ham's F12 包含 20% 的胎牛血清和 50 μg /毫升庆大霉素。最后，三维切片放置在 5% 的二氧化碳和 37 $^{\circ}\text{C}$ 的培养箱中培育并且每 4 天更改一次培养液。

在三维肿瘤片的培养条件下，来自小鼠乳腺肿瘤 B477-GFP 的肿瘤切片在 7 天内变大，GFP 信号变强（图 3 中 A）。为了进一步确定三维肿瘤片是否可以模拟肿瘤生长，使用各种方法验证了该模型如下。

首先，通过计数活细胞来监测三维肿瘤片的细胞活力（即总细胞中活细胞所占的百分比），发现总细胞数逐渐增加，而细胞活力在 10 天内保持在>80%（图 3 中 B）。

使用针对 E-cadherin（上皮钙黏素）和波形蛋白（Vimentin）的抗体（分别为上皮细胞和间充质细胞的标志物）以及 CK7（一种维持肿瘤实质的蛋白质）的抗体染色（图 3 中 C、E），在长达 8 天的培养时间过程中也未检测到显著差异。

接下来，对三维肿瘤片和各种生物标志物（包括 γH2AX 、Ki67、活化的胱天蛋白酶-3（cleaved caspase-3）和结蛋白（desmin））进行组织学分析（图 3 中 D-E）。结果表明，三维肿瘤片总体上表现出与原发肿瘤相似的特征，除了 Ki67+ 细胞增加，这之前观察到的增殖细胞增加一致（图 3 中 B）。

接下来，确定三维肿瘤片是否也可以维持原始肿瘤的肿瘤免疫微环境。因此，在三维肿瘤片中分析了免疫成分，该三维肿瘤片来自内源性乳腺肿瘤携带乳腺特异性破坏乳腺癌 1 号基因（Brca1, Brca1Co/Co;MMTV-Cre）的基因工程小鼠模型。通过组织病理学分析免疫标志物，包括 CD3e、CD8a、CD11b、CD45、F4/80、PD-1 和 PD-L1（图 4 中 A-D）。在 8 天的培养期间，所有这些免疫标志物在三维肿瘤片中均呈阳性。

此外，与 D0（新鲜肿瘤切片）相比，没有观察到显著差异，表明免疫成分在切片培养条件下得到了很好的保存。RNA 测序结果表明，在 8 天内，三维肿瘤片中免疫基因的稳定表达（图 4 中 E-F）。通过计算 D1 至 D8 与 D0 的巨噬细胞、中性粒细胞、单核细胞、NK 细胞、T 细胞和 B 细胞的 Pearson 相关系数，对培养 D0 前、培养 D1 至 D8 后即刻的原始肿瘤的通路基因表达水平进行量化，结果显示高相关性（图 4 中 G）。总之，结果表明三维肿瘤片保持了其原始肿瘤的细胞库和免疫成分。

定量和延时预测三维肿瘤片对体外抗癌药物的反应。

建立三维肿瘤片作为药物敏感性测试的可靠模型需要对细胞死亡进行定量测量。因此，将表达 CFP-Asp-Glu-Val-Asp (DEVD)-YFP 融合蛋白的胱天蛋白酶-3（caspase-3）报告传感器 Sensor C3 引入癌细胞系。氨基酸序列 DEVD 是胱天蛋白酶-3 的切割位点。表达传感器 C3 的细胞可以将电子能量从 CFP 转移到 YFP，导致细胞发出绿色荧光，即活传感器细胞中的荧光共振能量转移 (FRET)。然而，当胱天蛋白酶-3 被激活时，它会切割荧光蛋白之间的 DEVD，从而消除能量转移并导致细胞发射蓝色荧光。因此，传感器 C3 使我们能够监测活细胞凋亡过程中胱天蛋白酶-3 的动态（图 5 中 A-C）。时间进程研究表明，与传统的基于抗体的胱天蛋白酶-3 激活测定或凋亡染色方法（如 TUNEL 测定）相比，C3 标记的癌细胞在药物疗效的延时评估中更强大，后者仅可以监测终点，不能检测培养

物的早期药物反应。

接下来，将 C3 标记的癌细胞进行培养，之后消化收集细胞，细胞悬浮于 PBS 溶液中并用注射器将 1×10^6 细胞注入小鼠的皮下组织，约 1 个月后，获得肿瘤组织，将肿瘤组织进行切片处理，获得对应的三维肿瘤片。并测试是否也可以实现三维肿瘤片中药物反应的延时测试。结果发现，顺铂（抗癌药物）或阿霉素（药物）处理三维肿瘤片以剂量依赖性方式降低导致 FRET 比率（图 5 中 D-E）。另一项时间过程实验也显示 FRET 比率以剂量和时间依赖性方式降低（图 5 中 F-H）。

实施例 2

基于 FRET 延时技术和 MTT 终点法预测化学药物在三维肿瘤片平台中的疗效。

由于临床癌症样本缺乏荧光标志物，因此，本实施例在三维肿瘤片中使用了 GFP 标记细胞、C3 标记的细胞和非荧光标记的细胞来测试药物反应。首先，用顺铂处理的 B477-GFP 乳腺肿瘤切片中测量了荧光样品的细胞活力（图 6 中 A-B）。在三维肿瘤片期间的 7 天内发现 GFP 信号增加，并且这种增加在顺铂治疗后被阻止，如肿瘤片大小、GFP 强度等，这些现象和 MTT 法测定的细胞活力一致。

接下来用 $1 \mu\text{M}$ 硼替佐米（药物）处理 MDA-MB-231-C3 肿瘤片，并在时间序列研究中测量了药物反应。发现 FRET 比率在硼替佐米治疗期间以梯级方式下降（图 6 中 C-D）。在第 6 天，MTT 法测定硼替佐米处理的 MDA-MB-231-C3 肿瘤片中细胞活力（图 6 中 D）。

此外，用增加剂量的顺铂处理 MDA-MB-231-C3 的三维肿瘤片 6 天，也发现 FRET 比降低和 PI 染色增强，而 PI 是排除在具有完整细胞膜的活细胞之外，但可以穿透死亡或受损的细胞并通过插入它们的碱基之间来与 DNA 和 RNA 结合（图 6 中 E-F）。

然后使用 MTT 法对细胞活力进行定量，结果发现细胞活力的下降类似于 FRET 减少的趋势。这些数据表明 PI 染色和 MTT 法分析都可以从不同药物的治疗中产生比较理想的结果。由于所有临床样本均未有标记，因此继续用 PI 染色和 MTT 法分析和测试小鼠非荧光 B477 和 PDX 来源的人结肠 499/552 肿瘤切片中的药物反应，发现所有肿瘤片均可用于定量测量细胞活力（图 6 中 G-I）。

实施例 3

基于 FRET 和延时监测技术的离体三维肿瘤片培养模型的药物筛选。

采用传感器 C3 介导的细胞筛药模型首先可以用来筛选针对某种癌症的药物并鉴定少量抗癌药物以供进一步评估。从文库中筛选出 166 种候选化合物（表 1），其中大部分被 FDA 批准用于各种癌症的临床治疗，并使用 MDA-MB-231-C3, Hct116-C3, PANC1-C3, A549-C3 和 HepG2-C3 细胞系测试药物反应。

表 1 166 种候选化合物

No	药物	No	药物	No	药物	No	药物
1	10-脱乙酰基巴卡丁 (10-DAB (10-Deacetylbaicatin))	51	多柔比星 (阿霉素) (Doxorubicin (Adriamycin))	101	芍药苷(Paeoniflorin)	151	亚叶酸钙 (Leucovorin calcium)
2	2-甲氧雌二醇(2-Methoxyestradiol)	52	艾曲波帕 (Eltrombopag) (SB-497115-GR)	102	盐酸帕唑帕尼 (Pazopanib hydrochloride)	152	奥西替尼 (Osimertinib)(AZD9291)
3	乙酸阿比特龙酯 (Abiraterone acetate)	53	盐酸表柔比星 (Epirubicin hydrochloride)	103	培美曲塞二钠 (Pemetrexed disodium)	153	帕布昔利布盐酸盐 (Palbociclib hydrochloride)(PD-0332991)
4	甲氨蝶呤(Abitrexate (Methotrexate))	54	盐酸埃罗替尼 (Erlotinib hydrochloride)	104	保泰松(Phenylbutazone (Butazolidin, Butatron))	154	帕米膦酸钠 (Pamidronate disodium)
5	5-氟尿嘧啶(Adrucil (Fluorouracil))	55	埃索美拉唑钠 (Esomeprazole sodium (Nexium))	105	苯丁酸(Phenylbutyric acid (Chlorambucil))	155	普乐沙福 (Plerixafor)(AMD3100)
6	阿法替尼 (Afatnib)(BIBW2992)	56	雌莫司汀 (Estramustine)	106	匹格列酮(Pioglitazone (Actos))	156	普拉曲沙 (Pralatrexate)
7	六甲蜜胺(Altretamine (Hexalen))	57	依托泊苷 (Etoposide)(VP-16)	107	泊马度胺 (Pomalidomide)	157	Prednisone(强的松)
8	N-(1,3-苯并二氧戊环-5-基甲基)-4-苯并咪唑并[3,2-D]嘧啶-4-基-1-哌嗪硫代甲酰胺 (Amuvatinib)(MP-470)	58	依维莫司 (Everolimus)(RAD001)	108	帕纳替尼 (Ponatinib)(AP24534)	158	罗米地辛 (Romidepsin)(FK228)
9	阿那曲唑(Anastrozole (Arimidex))	59	氟尿苷 (Floxuridine)	109	盐酸丙基解痉素 (Proadifen hydrochloride)	159	他莫昔芬柠檬酸盐 (Tamoxifen citrate)
10	盐酸环胞苷 (Ancitabine hydrochloride)	60	氟达拉滨 (Fludarabine (Fludara))	110	盐酸甲基苄胍 (Procarbazine hydrochloride)	160	维奈妥拉 (Venetoclax)(ABT-199)
11	蒿甲醚 (Artemether)(SM-224)	61	盐酸氟桂利嗪 (Flunarizine dihydrochloride)	111	瑞格非尼 (Regorafenib)(BAY 73-4506)	161	枸橼酸托瑞米芬 (Toremifene citrate)
12	阿司匹林 (乙酰水杨酸) (Aspirin (Acetylsalicylic acid))	62	氟他胺(Flutamide (Eulexin))	112	罗格列酮(Rosiglitazone (Avandia))	162	尼拉帕尼 (Niraparib)(MK-4827)

13	阿扎那韦硫酸盐 (Atazanavir sulfate)	63	福美司坦 (Formestane)	11 3	鲁索利替尼 (Ruxolitinib)(INCB0184 24)	16 3	THZ2
14	阿西替尼(Axitinib)	64	替加氟(Ftorafur (Tegafur))	11 4	塞卡替尼(Saracatinib)	16 4	青蒿素(Artemisinin)
15	5-氮杂胞苷 (Azacitidine (Vidaza))	65	氟维司群 (Fulvestrant (Faslodex))	11 5	索拉非尼(Sorafenib (Nexavar))	16 5	青蒿琥酯 (Artesunate)
16	8-氮鸟嘌呤 (Azaguanine-8)	66	吉非替尼(Gefitinib (Iressa))	11 6	链脲菌素(Streptozotocin (Zanosar))	16 6	双氢青蒿素 (Dihydroartemisinin)
17	阿奇霉素 (Azithromycin (Zithromax))	67	盐酸吉西他滨 (Gemcitabine Hydrochloride)	11 7	舒林酸(Sulindac (Clinoril))		
18	盐酸苯达莫司汀 (Bendamustine hydrochloride)	68	京尼平苷酸 (Geniposidic acid)	11 8	苹果酸舒尼替尼 (Sunitinib Malate (Sutent))		
19	苯磺酸贝托司汀 (BepotastineBesilate)	69	金雀异黄酮 (Genistein)	11 9	盐酸替莫普利 (Temocapril hydrochloride)		
20	佛手柑内酯 (Bergapten)	70	组胺二盐酸盐 (Histamine dihydrochloride)	12 0	西罗莫司脂化物 (Temsirrolimus (Torisel))		
21	宾达利(Bindarit)	71	异环磷酰胺 (Ifosfamide)	12 1	替尼泊甙(Teniposide)		
22	硫酸博来霉素 (Bleomycin sulfate)	72	甲磺酸伊马替尼 (Imatinib Mesylate)	12 2	枸橼酸托法替尼 (Tofacitinib citrate) (CP- 690550 citrate)		
23	硼替佐米(Bortezomib)	73	伊立替康 (Irinotecan)	12 3	甲苯磺丁脲 (Tolbutamide)		
24	伯舒替尼(Bosutinib (SKI-606))	74	伊曲康唑 (Itraconazole (Sporanox))	12 4	托萘酯(Tolnaftate)		
25	白消安(Busulfan)	75	拉莫三嗪 (Lamotrigine)	12 5	维 A 酸(Tretinoin (Aberela))		
26	斑蝥素(Cantharidin)	76	二对甲苯磺酸拉帕 替尼(Lapatinib Ditosylate (Tykerb))	12 6	凡德他尼(Vandetanib (Zactima))		
27	卡培他滨(Capecitabine (Xeloda))	77	来那度胺 (Lenalidomide)	12 7	瓦他拉尼碱(Vatalanib)		
28	卡络磺钠 (Carbazochrome sodium sulfonate)	78	来曲唑(Letrozole)	12 8	维罗非尼(Vemurafenib (PLX4032))		
29	卡铂(Carboplatin (Diamine(1,1- cyclobutane- dicarboxylato)platinum (II)))	79	盐酸林可霉素 (Lincomycin hydrochloride (Lincocin))	12 9	长春新碱(Vincristine)		
30	卡莫氟(Carmofur)	80	洛莫司汀 (Lomustine) (CeeNU)	13 0	长春瑞宾(Vinorelbine (Navelbine))		
31	卡莫司汀(Carmustine)	81	氯尼达明 (Lonidamine)	13 1	维莫德吉(Vismodegib (GDC-0449))		
32	三尖杉宁碱 (Cephalomannine)	82	马赛替尼 (Masitinib)	13 2	伏立诺他(Vorinostat (SAHA))		
33	苯丁酸氮芥 (Chlorambucil)	83	恩杂鲁胺 (MDV3100) (Enzalutamide)	13 3	卡博替尼(XL- 184)(Cabozantinib)		
34	盐酸甲状腺激素 (Cinacalcet hydrochloride) (AMG- 073 HCl)	84	恩比兴 (Mechlorethamine HCL)	13 4	唑来膦酸(唑来膦酸 (Zoledronic acid))		
35	顺铂(Cisplatin (cis- Diammineplatinum(II) dichloride))	85	醋酸甲地孕酮 (Megestrol acetate)	13 5	托瑞米芬(Toremifene)		
36	克拉屈滨(Cladribine)	86	6-巯基嘌呤 (Mercaptopurine)	13 6	千金藤素 (Cepharanthine)		
37	氯法拉滨(Clofarabine)	87	美司那 (Mesna (Uromitexan, Mesnex))	13 7	4-[4-氟-3-[(4-甲氧基哌 啶-1-基)羰基]苄基]酞嗪 -1(2H)-酮(AZD2461)		
38	枸橼酸氯米芬 (Clomifene citrate (Serophene))	88	盐酸甲烯土霉素 (Methacycline hydrochloride (Physiomycine))	13 8	奥拉帕尼(Olaparib (AZD2281, Ku-0059436))		

39	氯舒隆(Clorsulon)	89	替莫唑胺 (Methazolastone (Temozolomide))	13 9	4,5,6,7-四溴-1H-苯并三 唑 (Tetrabromoazabenzimid azole (TBB))		
40	克唑替尼(Crizotinib) (PF-02341066)	90	米替福新 (Miltefosine (hexadecyl phosphocholine))	14 0	四钼酸铵(Ammonium tetramolybdate (TM))		
41	环磷酰胺 (Cyclophosphamide monohydrate)	91	米托坦(Mitotane (Lysodren))	14 1	磷酸氯喹(Chloroquine phosphate)		
42	阿糖胞苷(Cytarabine)	92	米托蒽醌 (Mitoxantrone)	14 2	艾乐替尼(Alectinib) (CH5424802)		
43	达卡巴嗪(Dacarbazine (DTIC-Dome))	93	吗啉胍 (Moroxydine)	14 3	贝利司他 (Belinostat)(PXD101)		
44	达克替尼(Dacomitinib) (PF299804,PF- 00299804)	94	盐酸纳洛酮 (Naloxone HCl)	14 4	色瑞替尼 (Ceritinib)(LDK378)		
45	达鲁舍替(Danuserib) (PHA-739358)	95	奈拉滨(Nelarabine (Arranon))	14 5	盐酸柔红霉素 (Daunorubicin hydrochloride)		
46	(2S)-N-[N-(3,5-二氟苯 乙酰基)-L-丙氨酰]-2- 苯基甘氨酸叔丁酯 (DAPT (GSI-IX))	96	来那替尼 (Neratinib)	14 6	地塞米松 (Dexamethasone (DHAP))		
47	达沙替尼(Dasatinib)	97	尼罗替尼 (Nilotinib) (AMN- 107)	14 7	依西美坦(Exemestane)		
48	多西他赛(Docetaxel (Taxotere))	98	尼伐地平 (Nilvadipine) (ARC029)	14 8	依鲁替尼(Ibrutinib)(PCI- 32765)		
49	4-氨基-5-氟-3-[5-(4-甲 基哌嗪-1-基)-1H-苯并 咪唑-2-基]喹啉-2(1H)- 酮(Dovitinib) (TKI- 258)	99	奥沙利铂 (Oxaliplatin (Eloxatin))	14 9	盐酸伊达比星 (Idarubicin hydrochloride)		
50	去氧氟尿苷 (DOXIFLURIDINE)	10 0	紫杉醇(Paclitaxel (Taxol))	15 0	艾代拉里斯(Idelalisib) (GS-1101)		

由于许多药物抑制肿瘤细胞的生长，IC₅₀（50% 细胞死亡）在 5-20 μ M 之间并取决于细胞系，本实施例首先使用所有药物的浓度为 20 μ M 处理细胞系 0-96 小时，以便在 5 种细胞系中进行快速测试（表 2 和表 3）。

表 2 231C3 以及 HepG2-C3 的测试结果

药物	231C3										HepG2-C3									
	0 d	1 d	2d	3 d	4 d	0d	1d	2d	3d	4d	0 d	1 d	2 d	3 d	4d	0d	1d	2d	3d	4d
	凋亡细胞 (Apoptotic cells) %					细胞数量 (Cell number) %					凋亡细胞 (Apoptotic cells) %					细胞数量 (Cell number) %				
色瑞替尼 (Ceritinib) (LDK378)	2. 3	5 0	0	0	0	10 0	23	0	0	0	1 5	5 0		0	0	10 0	13	0	0	0
米托蒽醌 (Mitoxantrone)	0	7 5	0	0	0	10 0	2. 9	0	0	0	2. 1	0		0	0	10 0	22	0	0	0
奥西替尼 (Osimertinib) (AZD9291)	0	0	0	0	0	10 0	0	0	0	0	0	1. 6		0	0	10 0	64	0	0	0
苹果酸舒尼替 尼(Sunitinib Malate (Sutent))	0	0	0	0	0	10 0	1. 8	0	0	0	0	5 0	0	0	0	10 0	3. 1	0	0	0
他莫昔芬柠檬 酸盐 (Tamoxifen citrate)	1 4	0	0	0	0	10 0	0	0	0	0	6. 4	0	0	0	0	10 0	0	0	0	0
长春瑞宾 (Vinorelbine (Navelbine))	0	1 6	5. 9	0	0	10 0	11 0	38	0	0	0	0	0	0	0	10 0	85	1. 5	0	0
达克替尼 (Dacomitinib) (PF299804,PF- 00299804)	0	2 2	0	0	0	10 0	63	1. 6	0	0	1. 4	1 8	2 9	0	0	10 0	11 8	9. 7	1. 4	0
马赛替尼 (Masitinib)	0	0. 6	2. 5	0	2. 2	10 0	15 9	73	10 7	83	0. 9	5	6. 5	0	0	10 0	11 4	10 1	0	0
10-脱乙酰基巴	1	5.	13	9.	8.	10	12	99	91	55	2.	0.	6.	6.	14	10	11	11	85	47

卡丁(10-DAB (10-Deacetylbaecati n))		6		7	4	0	1				2	9	9	3		0	4	0		
培美曲塞二钠 (Pemetrexed disodium)	0	2	4.9	32	30	100	180	123	240	118	42	0.6	1.1	1.7	2.2	100	120	127	127	63
盐酸伊达比星 (Idarubicin hydrochloride)	0	47	0	0	0	100	45	1.1	0	0	3.5	14	0	0	0	100	39	0.7	0	0
克拉屈滨 (Cladribine)	0	1.1	12	22	27	100	162	147	121	87	1.6	3.7	1.8	2.7	2.9	100	131	180	241	224
凡德他尼 (Vandetanib (Zactima))	0	0	0	0	0	100	25	0	0	0	0	1.8		0	0	100	104	0	0	0
来那替尼 (Neratinib)	2.5	0	2.7	0	0	100	98	136	0	0	0	13	33	0	0	100	69	3	0	0
索拉非尼 (Sorafenib (Nexavar))	0	16	5.5	0	0	100	77	215	5.9	3.4	2.9	7.1	19	67	0	100	93	15	2.9	0
阿法替尼 (Afatinib) (BIBW2992)	0	0	0	0	0	100	6.6	2.8	0	0	1.1	0		0	0	100	24	0	0	0
贝利司他 (Belinostat) (PXD101)	0	14	28	0	0	100	182	97	0	0	3.1	15	27	86	100	100	115	39	5.3	1.5
唑来膦酸 (Zoledronic acid)	0	3.1	1.5	23	35	100	162	135	127	73	1.6	1.9	1.9	10	7.1	100	123	80	46	33
托瑞米芬 (Toremifene)	0	2.4	1.7	1.7	2.2	100	154	217	267	294	2.8	0.7	1	0.9	0.6	100	133	192	207	157
青蒿琥酯 (Artesunate)	0	0	0.9	2.9	3	100	172	166	109	105	1.7	1.1	0	0	0.6	100	158	198	236	305
盐酸表柔比星 (Epirubicin hydrochloride)	0	10	55	49	63	100	120	68	36	7.7	0.8	11	22	42	59	100	124	72	41	21
磷酸氯喹 (Chloroquine phosphate)	0	13	5.2	50	0	100	124	124	4.3	0	2.3	3	5.3	0	0	100	113	65	73	34
瑞格非尼 (Regorafenib) (BAY 73-4506)	0	3.2	4.8	6.5	5.3	100	131	201	43	26	2.3	0	0	2.4	0	100	107	117	99	84
长春新碱 (Vincristine)	0	15	1.1	19	8.6	100	151	120	84	46	2.9	2.5	1.8	2.7	5.8	100	115	107	73	67
硼替佐米 (Bortezomib)	0	51	43	44	50	100	114	27	14	3	3.9	29	31	0	8.3	100	93	43	15	9.4
顺铂(Cisplatin (cis-Diammineplati num(II) dichloride))	0	0	4.7	0	6.7	100	151	202	105	95	0	2.4	0.8	1.1	2.2	100	116	111	173	175
帕布昔利布盐 酸盐 (Palbociclib hydrochloride) (PD-0332991)	0	1	0	7.4	6.6	100	140	151	93	84	1.7	4.9	3.9	1	1.8	100	106	89	85	95
2-甲氧雌二醇 (2-Methoxyestradi ol)	0	1.7	14	13	14	100	121	112	107	70	1.7	3.3	5.4	11	9.6	100	85	72	56	47
伯舒替尼 (Bosutinib) (SKI-606)	0	44	100	0	0	100	39	0.8	0	0	3.3	19	0	0	0	100	97	2	0	0
千金藤素 (Cepharanthine)	5.3	0	0	0	0	100	42	11	0	0	6.9	46	0	0	0	100	46	1	0	0
甲氨蝶呤 (Abitrexate (Methotrexate))	0	2.4	7.6	23	31	100	145	91	55	15	0.9	0.7	1.4	5.3	4.5	100	128	130	54	42
紫杉醇 (Paclitaxel (Taxol))	0	13	3.7	24	23	100	120	161	86	63	2.7	5.4	10	18	16	100	99	87	58	49
尼拉帕尼 (Niraparib)	0	0	1.9	2.6	10	100	136	68	100	90	1.1	0	0	0	0	100	148	142	151	157

(MK-4827)																				
盐酸柔红霉素 (Daunorubicin hydrochloride)	0	5 0	0	0	0	10 0	2. 9	0	0	0	4. 3	3. 5		0	0	10 0	83	0	0. 7	2. 2
5-氟脲嘧啶 (Adrucil (Fluorouracil))	0	0	2. 7	0	5. 5	10 0	14 8	90	13 3	89	2. 9	0	1. 1	1. 8	4. 6	10 0	12 3	13 4	16 0	15 6
双氢青蒿素 (Dihydroartemi sinin)	0	3. 1	3. 3	1. 4	1. 3	10 0	15 9	20 2	23 8	25 1	2. 5	2. 1	1	0. 3	1	10 0	11 7	16 5	25 0	33 2
多柔比星（阿 霉素） (Doxorubicin (Adriamycin))	0	1 2	26	5 2	7 5	10 0	12 1	82	40	3. 6	0	1 2	2 3	4 6	53	10 0	12 1	10 7	45	28
甲磺酸伊马替 尼(Imatinib Mesylate)	0	0	2. 2	0	1	10 0	15 2	85	12 2	18 7	1. 2	1. 5	1. 3	0	0	10 0	16 1	18 1	25 7	31 1
THZ2	0	1 4	2. 2	9. 1	2 1	10 0	11 7	12 3	73	45	1. 1	4. 5	2. 6	1 9	7. 4	10 0	12 4	87	60	30
氟达拉滨 (Fludarabine (Fludara))	0	5. 5	6. 7	7	1 5	10 0	15 9	74	54	29	1. 1	3. 4	1. 9	2. 9	0	10 0	16 2	60	38	29
达鲁舍替 (Danusertib) (PHA-739358)	0	4. 2	12	0	5. 6	10 0	10 8	85	66	61	3. 8	0. 8	2. 1	1. 6	0	10 0	11 5	92	11 8	13 8
卡莫氟 (Carmofur)	0	0. 7	1. 2	5. 6	1 4	10 0	19 1	11 3	17 2	15 2	2. 1	0	0	0. 4	0. 8	10 0	11 8	16 8	19 0	17 6
阿司匹林（乙 酰水杨酸） (Aspirin (Acetylsalicylic acid))	0	1. 2	4. 9	2 0	3 1	10 0	17 4	10 5	21 2	17 9	1. 5	2. 2	0. 7	2	2. 6	10 0	13 4	20 4	18 7	17 1
多西他赛 (Docetaxel (Taxotere))	0	4. 2	15	1 7	1 9	10 0	10 2	90	11 2	66	1	2. 8	6. 3	1 3	20	10 0	10 3	91	64	53
氟尿苷 (Flouxuridine)	0	1. 3	2. 9	2. 9	2. 2	10 0	17 1	11 8	15 6	15 4	0	0	0	0	0	10 0	14 3	17 8	21 1	22 4
盐酸吉西他滨 (Gemcitabine Hydrochloride)	0	0	7. 7	1 1	8. 5	10 0	13 7	88	95	80	1. 6	1. 5	0	2. 9	10	10 0	11 0	10 4	84	85
伏立诺他 (Vorinostat (SAHA))	2. 5	2 2	4. 8	3 8	0	10 0	17 4	10 5	10	0	0	1 7	1 1	3 8	33	10 0	10 1	40	7	2. 6
恩比兴 (Mechlorethami ne HCL)	0	1	4. 7	6. 9	5. 3	10 0	14 4	91	11 4	10 7	0. 8	1. 9	0. 6	1. 6	0. 4	10 0	12 3	12 8	15 1	17 9
达沙替尼 (Dasatinib)	0	2. 6	3. 8	1 4	2 4	10 0	14 0	63	59	30	0	0. 8	8. 7	0	0	10 0	11 2	78	61	56
塞卡替尼 (Saracatinib)	0	1. 8	16	4. 9	1 0	10 0	12 5	10 4	89	66	0	0	0	0	0	10 0	10 0	14 2	15 2	14 6
斑蝥素 (Cantharidin)	0	2 8	40	2 9	1 3	10 0	15 6	10 7	40	17	3. 7	9. 1	2 3	5 3	60	10 0	13 4	74	23	6. 1
三尖杉宁碱 (Cephalomanni ne)	0	8. 9	11	3 6	2 2	10 0	10 7	11 0	74	39	1	1. 8	5. 3	1. 6	2. 2	10 0	11 0	14 8	12 4	90
罗米地辛 (Romidepsin) (FK228)	0	8 0	0	0	0	10 0	7. 8	0	0	0	2. 1	6 0		0	0	10 0	5. 3	0	0	0
依托泊苷 (Etoposide) (VP-16)	0	1. 6	24	3 1	2 7	10 0	13 4	73	66	24	0. 8	1. 4	2. 2	6	6. 5	10 0	11 6	11 0	13 4	12 2
克唑替尼 (Crizotinib) (PF-02341066)	0	1. 6	2. 4	2. 6	4. 7	10 0	10 3	34	33	36	0. 9	1. 1	0	0	0	10 0	80	83	71	10 3
卡博替尼(XL- 184) (Cabozantinib)	2. 1	0. 8	4	0	0	10 0	12 5	10 4	58	42	4. 3	1. 6	0	0	0	10 0	10 6	15 2	10 6	12 4
帕纳替尼 (Ponatinib) (AP24534)	2. 2	7. 4	0. 8	1 0	1 1	10 0	11 7	13 4	43	38	2	3. 4	0	0. 7	0	10 0	98	11 6	97	11 4
4-氨基-5-氟-3- [5-(4-甲基哌嗪 -1-基)-1H-苯并	0	0	0	0	0	10 0	13 3	96	64	96	0	0	0	0	0	10 0	13 3	33	4. 3	0

咪唑-2-基]喹啉-2(1H)-酮 (Dovitinib)(TKI-258)																			
---	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

表 3 PANC1-C3 和 A549-C3 的测试结果

Drug	PANC1-C3										A549-C3									
	0d	1d	2d	3d	4d	0d	1d	2d	3d	4d	0d	1d	2d	3d	4d	0d	1d	2d	3d	4d
	凋亡细胞 %					细胞数量 %					凋亡细胞 %					细胞数量 %				
色瑞替尼 (Ceritinib) (LDK378)	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0
米托蒽醌 (Mitoxantrone)	53	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	8.3	0	0	0
奥西替尼 (Osimertinib) (AZD9291)	80	0	0	0	0	100	20	0	0	0	8.2	2.5	0	0	0	100	13	0	0	0
苹果酸舒尼替尼 (Sunitinib Malate (Sutent))	0	0	0	0	0	100	63	0	0	0	4	2.3	0	0	0	100	39	1	0	0
他莫昔芬柠檬酸盐 (Tamoxifen citrate)	34	0	0	0	0	100	4.9	7.3	0	0	4.7	2.9	4	0	0	100	81	5.8	0	0
长春瑞滨 (Vinorelbine (Navelbine))	4.2	5.8	0	0	0	100	73	7	0	0	0	0	0	0	0	100	7.5	0	0	0
达克替尼 (Dacomitinib) (PF299804,PF-00299804)	7.7	44	50	0	0	100	13.8	31	7.7	7.7	1.7	4.0	0	0	0	100	5.7	0	0	0
马赛替尼 (Masitinib)	4.4	8.8	23	44	100	100	84	10.1	57	8.8	3	1.1	0	0	0	100	14.7	8.9	0	0
10-脱乙酰基巴卡丁(10-DAB (10-Deacetylba- ccatin))	9.3	21	16	20	5	100	96	91	56	37	0	7.9	4.2	0	0	100	64	4.1	6.8	0
培美曲塞二钠 (Pemetrexed disodium)	5	4.3	7.6	2.2	0	100	11.5	16.5	11.3	80	0	0	0	0	0	100	2.1	1.1	0	0
盐酸伊达比星 (Idarubicin hydrochloride)	16	38	0	0	0	100	86	0	0	0	0.7	0	0	0	0	100	70	2.5	2.8	2.1
克拉屈滨 (Cladribine)	1.5	15	25	31	38	100	15.1	15.4	12.5	57	0	6	0	8.3	4.0	100	11.0	5.2	2.2	3
凡德他尼 (Vandetanib (Zactima))	0	30	0	0	0	100	83	0	0	0	0.6	1.2	0	0	0	100	85	3.4	6.8	3.1
来那替尼 (Neratinib)	15	44	0	0	20	100	81	17	2.1	10	7.5	2.3	0	0	0	100	19	1.0	2.2	4
索拉非尼 (Sorafenib (Nexavar))	11	13	20	0	0	100	51	11	4.3	0	3.2	1.8	0	0	0	100	10.8	3.5	9.5	4.8
阿法替尼 (Afatinib) (BIBW2992)	0	0		0	0	100	33	0	0	0	1.3	0	0	0	0	100	19	1.1	0	5.5
贝利司他 (Belinostat) (PXD101)	22	50	61	15	11	100	12.8	64	36	53	0	6.3	3.2	0	1.3	100	10.2	2.2	1.2	5.8
唑来膦酸 (Zoledronic acid)	0	5.3	9.7	0	0	100	12.1	66	30	11	0	1.5	1.1	0	0	100	11.3	5.3	3.1	6.9
托瑞米芬 (Toremifene)	2.3	9.5	18	22	17	100	95	11.6	10.5	95	1.1	1.4	1.	5.	2.9	100	11.0	1.3	6.2	7.

													6	2				3		4
青蒿琥酯 (Artesunate)	13	10	20	37	21	10 0	14 0	17 8	17 1	19 1	0	0	6 9	0	0	10 0	25	8 7	2 0	8
盐酸表柔比星 (Epirubicin hydrochloride)	4	27	22	33	0	10 0	82	64	6	8	0	5 5	5 1	0	0	10 0	84	4 5	2 9	9 2
磷酸氯喹 (Chloroquine phosphate)	0	3. 1	14	33	43	10 0	25 0	26 5	81	27	0	2 7	8 6	0	0	10 0	58	4 6	7 9	9 2
瑞格非尼 (Regorafenib) (BAY 73- 4506)	24	11	5. 1	9. 1	0	10 0	94	80	45	10	0	1 2	4 3	0	0	10 0	98	4 3	1 1	1 1
长春新碱 (Vincristine)	5. 8	20	46	40	22	10 0	15 6	13 5	92	62	0	8 2	0	1 8	3 3	10 0	65	1 6	1 5	1 2
硼替佐米 (Bortezomib)	17	69	46	0	0	10 0	68	17	8	8	1. 3	1 4	2 1	2	0	10 0	12 9	6 6	3 2	1 4
顺铂 (Cisplatin (cis- Diammineplat inum(II) dichloride))	3. 6	15	13	15	26	10 0	14 6	16 8	18 6	68	0	1 1	0	1 6	0	10 0	18 1	9 8	6 0	1 9
帕布昔利布 盐酸盐 (Palbociclib hydrochloride) (PD- 0332991)	0	14	2. 8	11	0	10 0	10 0	17 1	21 4	86	0	2 8	2 0	1 3	1 7	10 0	95	4 5	4 6	2 0
2-甲氧雌二醇 (2- Methoxyestra diol)	7. 9	17	23	29	10	10 0	84	12 4	71	32	0	6 5	4 3	1 2	1 9	10 0	83	9 3	3 3	2 1
伯舒替尼 (Bosutinib) (SKI-606)	38	33	20	0	0	10 0	13	7. 4	0	0	2. 5	9 1	0	0	0	10 0	28	3 3	7 8	2 5
千金藤素 (Cepharanthin e)	6	0	0	0	0	10 0	87	0	0	0	2 5	2 9	0	1 4	0	10 0	73	2 0	3 9	2 5
甲氨蝶呤 (Abitrexate (Methotrexate)	15	11	24	13	0	10 0	10 3	13 2	68	0	0	3 5	3 9	3 5	1 3	10 0	10 0	9 1	3 1	2 8
紫杉醇 (Paclitaxel (Taxol))	7. 4	17	27	23	18	10 0	89	91	72	41	0. 9	2 8	2 1	3 1	9 4	10 0	58	3 7	3 3	3 0
尼拉帕尼 (Niraparib) (MK-4827)	16	16	17	19	18	10 0	11 2	15 3	10 6	96	0	1 3	9 1	1 7	5 3	10 0	12 5	5 4	3 0	3 1
盐酸柔红霉 素 (Daunorubicin hydrochloride)	0	4. 8	0	0	0	10 0	12 0	0	0	0	6. 5	0	0	0	0	10 0	83	3 4	5 1	3 1
5-氟脲嘧啶 (Adrucil (Fluorouracil)	5. 8	3. 5	21	8. 7	5. 9	10 0	11 0	11 7	13 3	98	0	3 7	3	5 4	1 4	10 0	14 2	8 7	4 9	3 8
双氢青蒿素 (Dihydroarte misinin)	5. 4	7. 6	18	18	9. 7	10 0	99	11 9	16 6	17 7	0. 9	0	1 0	0	4 5	10 0	68	3 5	1 8	3 9
多柔比星 (阿霉素) (Doxorubicin (Adriamycin))	11	49	41	0	0	10 0	92	55	11	3. 8	0	1 5	0	2 7	2 8	10 0	76	4 9	4 3	4 1
甲磺酸伊马 替尼(Imatinib Mesylate)	2. 4	0	4	7. 7	4. 7	10 0	11 4	11 9	15 5	10 2	0	0	7 9	9 1	0	10 0	91	5 4	4 7	4 1
THZ2	23	39	34	55	0	10 0	88	68	39	7. 1	0	2 2	6 5	1 7	1 9	10 0	75	5 1	3 9	4 3

氟达拉滨 (Fludarabine (Fludara))	15	14	37	44	50	10 0	12 9	11 2	53	5 9	0	4 6	0	1 1	7 9	10 0	76	4 7	3 8	4 4
达鲁舍替 (Danusertib) (PHA- 739358)	17	11	64	50	67	10 0	54	36	17	4 3	5 6	0	1 7	5	0	10 0	46	2 2	3 7	4 4
卡莫氟 (Carmofur)	1. 4	3. 7	12	18	7. 5	10 0	11 7	19 6	23 3	22 9	0	2 6	2 6	3 6	6 7	10 0	16 1	1 1	5 7	4 6
阿司匹林 (乙酰水杨 酸) (Aspirin (Acetylsalicyli c acid))	10	18	20	4. 4	0	10 0	89	10 7	64	10	0	0	1 2	2 9	1 2	10 0	88	7 5	1 0	4 6
多西他赛 (Docetaxel (Taxotere))	9. 6	7. 8	17	38	45	10 0	98	10 0	62	38	0	0 9	0 7	3 3	6 2	10 0	13 2	8 7	3 7	4 9
氟尿苷 (Floxuridine)	4. 3	9. 1	7. 5	15	5. 6	10 0	11 7	17 0	20 4	15 1	0	0 4	1 2	3 4	4 5	10 0	19 2	1 2	4 5	5 0
盐酸吉西他 滨 (Gemcitabine Hydrochloride)	4. 7	8. 3	25	29	27	10 0	94	13 1	16 4	17 8	0	2 6	3 7	6 3	1 1	10 0	12 7	8 9	5 2	5 2
伏立诺他 (Vorinostat (SAHA))	23	53	0	0	0	10 0	79	11	0	0	0	5	0	7 1	0	10 0	72	2 5	1 7	5 4
恩比兴 (Mecloretha mine HCL)	6. 5	13	12	11	7. 7	10 0	12 0	13 0	16 3	19 8	1. 3	3 7	6 5	1 2	1 1	10 0	13 9	6 0	6 8	5 7
达沙替尼 (Dasatinib)	3. 6	34	27	18	3. 7	10 0	11 8	55	31	49	0	4 9	0	4	0	10 0	84	6 7	5 1	5 9
塞卡替尼 (Saracatinib)	0	22	17	21	19	10 0	64	81	67	44	0	4 9	4 2	0	4	10 0	12 3	8 5	3 5	6 0
斑蝥素 (Cantharidin)	5. 4	41	59	34	12	10 0	22 4	10 2	41	27	0	8 5	0	6 1	9	10 0	21	1 7	3 7	6 1
三尖杉宁碱 (Cephalomann ine)	0	11	33	11	4	10 0	23 3	20 0	18 0	16 7	0	1 5	2 9	9 3	1 2	10 0	76	7 7	6 1	6 7
罗米地辛 (Romidepsin) (FK228)	28	67	0	0	0	10 0	4. 9	0	0	0	0	0	0	0	0	10 0	18	5 4	5 8	7 4
依托泊苷 (Etoposide) (VP-16)	5. 9	5. 2	42	38	20	10 0	85	11 5	78	51	0	0	1 3	1 4	9 9	10 0	14 3	1 1	9 7	9 5
克唑替尼 (Crizotinib) (PF- 02341066)	6. 6	6. 6	8. 8	20	0	10 0	10 0	93	41	20	1. 9	8 7	8 2	0	0 5	10 0	72	5 3	6 5	1 1
卡博替尼 (XL-184) (Cabozantinib)	7. 7	9. 3	3. 6	7	0	10 0	66	12 9	10 9	10 8	0	1 9	9 4	2 2	3 2	10 0	82	6 3	9 0	1 2
帕纳替尼 (Ponatinib) (AP24534)	9. 8	7	6	8. 9	4. 6	10 0	84	16 5	17 6	12 7	2. 4	1 1	1 1	0	0 5	10 0	83	7 3	1 1	1 6
4-氨基-5-氟- 3-[5-(4-甲基 哌嗪-1-基)- 1H-苯并咪唑- 2-基]喹啉- 2(1H)-酮 (Dovitinib) (TKI-258)	0	0	0	0	0	10 0	13 6	17 7	28 1	23 6	0	0	0 3	0 3	0 6	10 0	17 7	1 9	1 6	1 6

表 4Hct116-C3 的检测结果

药物	Hct116-C3									
	0d	1d	2d	3d	4d	0d	1d	2d	3d	4d

	凋亡细胞 %					细胞数量 %				
阿法替尼(Afatinib) (BIBW2992)	9.69	9.43	15.38	0.00		100.00	18.34	4.50	0.35	0.00
达克替尼(Dacomitinib) (PF299804,PF-00299804)	11.07	0.00	0.00	0.00	0.00	100.00	5.00	0.00	0.00	0.00
盐酸伊达比星(Idarubicin hydrochloride)	0.40	0.73	0.00	0.00	0.00	100.00	110.00	0.40	0.00	0.00
米托蒽醌(Mitoxantrone)	5.56	0.00	0.00	0.00	0.00	100.00	0.00	0.00	0.00	0.00
苹果酸舒尼替尼(Sunitinib Malate (Sutent))	0.00	23.33	0.00	0.00	0.00	100.00	32.61	3.26	0.00	0.00
长春瑞宾(Vinorelbine (Navelbine))	15.09	67.78	29.41	0.00	0.00	100.00	169.81	32.08	0.00	0.00
索拉非尼(Sorafenib (Nexavar))	7.74	5.84	16.05	16.67	0.00	100.00	91.67	48.21	3.57	0.00
达鲁舍替(Danuserib) (PHA- 739358)	11.20	46.74	29.41	0.00	0.00	100.00	36.80	6.80	0.00	0.00
马赛替尼(Masitinib)	12.32	12.96	0.00	0.00	0.00	100.00	30.95	0.57	0.00	0.00
托瑞米芬(Toremifene)	10.67	23.40	41.94	0.00	0.00	100.00	105.62	52.25	3.93	0.00
凡德他尼(Vandetanib (Zactima))	9.49	17.86	44.44	16.67	0.00	100.00	18.98	3.05	2.03	0.68
硼替佐米(Bortezomib)	10.64	12.10	17.46	14.29	66.67	100.00	66.43	14.89	3.31	0.71
色瑞替尼(Ceritinib) (LDK378)	12.02	20.00	16.67	0.00	0.00	100.00	10.93	3.28	0.00	1.64
伯舒替尼(Bosutinib) (SKI-606)	10.34	10.87	9.09	28.57	60.00	100.00	35.25	4.21	2.68	1.92
斑蝥素(Cantharidin)	8.99	37.44	60.14	62.80	55.56	100.00	66.34	48.37	54.90	2.94
达沙替尼(Dasatinib)	7.45	15.79	40.00	0.00	33.33	100.00	10.11	10.64	2.13	3.19
克拉屈滨(Cladribine)	14.39	29.15	50.60	48.50	52.63	100.00	91.14	45.94	30.81	3.51
米替福新(Miltefosine (hexadecyl phosphocholine))	8.81	20.82	49.12	44.19	58.33	100.00	99.69	35.85	13.52	3.77
甲氨蝶呤(Abitrexate (Methotrexate))	4.73	14.29	20.69	33.33	62.50	100.00	16.57	17.16	10.65	4.73
阿司匹林(乙酰水杨酸) (Aspirin (Acetylsalicylic acid))	12.11	18.11	21.43	15.38	4.55	100.00	82.30	34.78	16.15	6.83
塞卡替尼(Saracatinib)	10.73	22.02	34.78	21.43	41.18	100.00	46.78	9.87	12.02	7.30
贝利司他(Belinostat) (PXD101)	9.02	71.40	101.94	90.00	90.32	100.00	110.82	39.95	15.46	7.99
多西他赛(Docetaxel (Taxotere))	9.49	21.54	33.72	24.24	42.42	100.00	70.46	23.31	17.89	8.94
THZ2	5.26	6.76	16.28	18.18	7.69	100.00	55.64	32.33	24.81	9.77
10-脱乙酰基巴卡丁(10-DAB (10-Deacetylbaicatin))	6.70	15.00	23.81	28.57	21.05	100.00	82.47	32.47	18.04	9.79
伏立诺他(Vorinostat (SAHA))	12.87	67.37	108.33	90.48	85.71	100.00	157.72	35.29	15.44	10.29
盐酸表柔比星(Epirubicin hydrochloride)	7.33	12.31	14.43	15.66	18.42	100.00	78.59	28.45	24.34	11.14
紫杉醇(Paclitaxel (Taxol))	15.98	23.66	48.65	49.18	70.37	100.00	59.82	33.79	27.85	12.33
瑞格非尼(Regorafenib) (BAY 73-4506)	9.13	15.00	24.57	28.70	18.87	100.00	18.74	40.98	26.93	12.41
盐酸柔红霉素(Daunorubicin hydrochloride)	0.51	4.35	0.00	3.51	0.00	100.00	82.14	19.90	29.08	12.76
奥西替尼(Osimertinib) (AZD9291)	22.73	0.00	0.00	0.00	0.00	100.00	63.64	9.09	0.00	13.64
培美曲塞二钠(Pemetrexed disodium)	9.20	16.67	26.90	24.56	18.46	100.00	91.03	39.31	26.21	14.94
来那替尼(Neratinib)	7.60	13.82	13.64	13.43	11.36	100.00	57.79	50.19	25.48	16.73
氟达拉滨(Fludarabine (Fludara))	10.96	30.51	49.53	62.41	42.53	100.00	86.35	41.15	51.15	16.73
三尖杉宁碱(Cephalomannine)	10.95	20.73	42.40	39.39	42.50	100.00	81.59	31.09	24.63	19.90
普拉曲沙(Pralatrexate)	12.76	12.75	22.22	52.13	47.56	100.00	88.01	48.21	23.98	20.92
卡博替尼(XL-184) (Cabozantinib)	11.43	10.48	12.28	8.33	2.70	100.00	60.00	32.57	20.57	21.14
5-氮杂胞苷(Azacitidine (Vidaza))	13.05	22.22	54.76	51.32	65.69	100.00	101.31	34.26	37.19	22.35

恩比兴(Mechlorethamine HCL)	8.52	15.56	23.86	26.09	20.00	100.00	80.72	39.46	30.94	22.42
恩杂鲁胺(MDV3100) (Enzalutamide)	14.32	23.53	41.43	31.45	31.25	100.00	85.20	33.41	29.59	22.91
艾曲波帕(Eltrombopag) (SB-497115-GR)	10.44	15.41	23.42	19.27	17.14	100.00	89.56	53.20	36.70	23.57
罗米地辛(Romidepsin) (FK228)	19.16	13.92	14.52	1.96	4.41	100.00	27.53	21.60	35.54	23.69
奥拉帕尼(Olaparib) (AZD2281, Ku-0059436)	10.29	22.14	33.62	19.27	24.32	100.00	90.03	37.30	35.05	23.79
奥沙利铂(Oxaliplatin (Eloxatin))	11.83	29.32	44.85	40.00	37.88	100.00	95.04	51.91	32.44	25.19
氟尿苷(Floxuridine)	7.29	17.10	32.07	35.34	27.38	100.00	117.33	55.93	35.26	25.53
5-氟尿嘧啶(Adrucil (Fluorouracil))	12.41	23.94	44.04	39.32	26.67	100.00	99.50	47.89	29.03	26.05
顺铂(Cisplatin (cis-Diammineplatinum(II) dichloride))	8.88	13.88	22.83	24.36	24.64	100.00	122.39	35.52	30.12	26.64
千金藤素(Cepharanthine)	10.81	0.00	0.00	0.00	0.00	100.00	43.24	2.70	18.92	27.03
伊立替康(Irinotecan)	13.25	31.95	56.80	23.86	26.02	100.00	90.51	45.47	38.85	27.15
6-巯基嘌呤(Mercaptopurine)	13.06	23.19	60.00	78.99	74.14	100.00	101.43	47.51	32.78	27.55
硫酸博莱霉素(Bleomycin sulfate)	9.80	26.84	46.90	31.52	33.06	100.00	75.50	32.29	36.75	27.62
帕纳替尼(Ponatinib) (AP24534)	7.35	10.43	13.95	9.72	8.70	100.00	66.53	35.10	29.39	28.16
2-甲氧雌二醇(2-Methoxyestradiol)	12.42	16.78	27.85	20.42	32.62	100.00	84.77	43.89	38.28	28.26
氯法拉滨(Clofarabine)	10.54	28.90	32.76	42.31	28.18	100.00	67.61	29.82	26.74	28.28
盐酸环胞苷(Ancitabine hydrochloride)	12.23	15.38	22.39	20.45	14.74	100.00	81.50	42.01	27.59	29.78
长春新碱(Vincristine)	11.53	16.33	43.25	40.44	37.70	100.00	36.84	63.16	56.39	30.58
氯尼达明(Lonidamine)	13.91	11.30	38.82	11.43	14.29	100.00	86.47	57.14	39.47	31.58
吉非替尼(Gefitinib (Iressa))	13.90	20.54	27.24	17.34	15.51	100.00	87.46	41.69	42.03	31.69
尼拉帕尼(Niraparib) (MK-4827)	10.03	23.08	48.53	47.18	33.33	100.00	53.69	40.12	41.89	31.86
N-(1,3-苯并二氧戊环-5-基甲基)-4-苯并呋喃并[3,2-D]嘧啶-4-基-1-哌嗪硫代甲酰胺(Amuvatinib) (MP-470)	12.36	14.94	33.00	16.00	23.24	100.00	90.39	45.77	45.77	32.49
4-氨基-5-氟-3-[5-(4-甲基哌嗪-1-基)-1H-苯并咪唑-2-基]喹啉-2(1H)-酮(Dovitinib) (TKI-258)	43.28	20.28	14.96	32.01	48.43	100.00	84.63	85.82	93.73	33.28
异环磷酰胺(Ifosfamide)	13.23	17.15	31.39	15.45	15.44	100.00	96.06	51.74	51.04	34.57
伊曲康唑(Itraconazole (Sporanox))	12.89	22.81	46.98	51.03	34.59	100.00	88.67	47.78	43.11	35.33
六甲蜜胺(Altretamine (Hexalen))	10.02	18.81	35.60	25.81	19.74	100.00	70.63	44.52	43.36	35.43
盐酸吉西他滨(Gemcitabine Hydrochloride)	9.95	16.76	30.28	40.00	22.22	100.00	89.05	54.23	29.85	35.82
醋酸甲地孕酮(Megestrol acetate)	12.68	22.49	37.59	25.38	29.14	100.00	119.14	63.64	62.20	36.12
阿糖胞苷(Cytarabine)	9.84	12.70	23.31	20.81	26.50	100.00	80.00	42.22	47.30	37.14
尼伐地平(Nilvadipine) (ARC029)	13.00	19.16	29.41	18.93	13.84	100.00	101.18	56.26	48.70	37.59
蒿甲醚(Artemether) (SM-224)	13.52	18.20	29.13	18.01	12.08	100.00	94.63	42.59	50.37	38.33
美司那(Mesna (Uromitexan, Mesnex))	11.67	15.90	29.55	18.64	17.14	100.00	96.11	48.89	49.17	38.89
盐酸甲烯土霉素(Methacycline hydrochloride (Physiomycine))	12.81	18.24	36.10	26.44	21.46	100.00	103.38	49.29	37.01	38.97
达卡巴嗪(Dacarbazine (DTIC-Dome))	12.57	17.24	37.32	47.74	49.29	100.00	105.31	58.38	43.30	39.11
阿那曲唑(Anastrozole (Arimidex))	9.28	17.76	22.02	18.58	12.32	100.00	88.12	48.70	53.04	40.00
阿西替尼(Axitinib)	13.76	15.73	23.48	11.93	15.28	100.00	92.91	37.45	59.43	42.70

卡莫氟(Carmofur)	16.79	27.73	45.73	43.15	30.83	100.00	91.43	41.79	43.04	42.86
盐酸帕唑帕尼(Pazopanib hydrochloride)	10.51	13.58	22.42	9.15	9.17	100.00	96.01	59.78	51.45	43.48
帕布昔利布盐酸盐(Palbociclib hydrochloride) (PD-0332991)	7.42	30.57	42.27	39.73	21.43	100.00	89.45	37.89	28.52	43.75
组胺二盐酸盐(Histamine dihydrochloride)	13.01	23.70	34.00	25.26	20.37	100.00	109.76	54.20	51.49	43.90
乙酸阿比特龙酯(Abiraterone acetate)	8.86	19.89	35.46	19.47	14.29	100.00	97.42	46.31	55.90	43.91
尼罗替尼(Nilotinib) (AMN-107)	12.45	15.53	21.74	10.43	7.27	100.00	85.48	47.72	47.72	45.64
甲磺酸伊马替尼(Imatinib Mesylate)	10.59	18.49	37.90	34.09	30.48	100.00	101.13	49.32	59.46	47.30
米托坦(Mitotane (Lysodren))	9.35	16.76	25.84	18.82	13.73	100.00	105.92	55.45	52.96	47.66
替莫唑胺(Methazolastone (Temozolomide))	10.59	17.46	25.27	14.46	17.83	100.00	105.30	57.94	51.71	48.91
依托泊苷(Etoposide) (VP-16)	13.51	22.06	21.09	16.78	10.85	100.00	78.76	49.42	55.21	49.81

备注：凋亡细胞 %为凋亡细胞百分比，是每个时间点凋亡细胞/细胞数的百分比；细胞数量 %为细胞数量百分比是每个时间点的细胞数量/0d 的细胞数量的百分比，后同。

对于以高效率杀死癌细胞的药物，使用较低剂量和较短时间点做了进一步测试，结果表明，细胞数量逐渐减少和细胞凋亡的增加（表 5~7）。

表 5 检测结果

药物	u M	231C3										HepG2-C3									
		0 h	6 h	12 h	24 h	48 h	0h	6h	12 h	24 h	48 h	0 h	6 h	12 h	24 h	48 h	0h	6h	12 h	24 h	48 h
		凋亡细胞 %					细胞数量 %					凋亡细胞 %					细胞数量 %				
阿法替尼 (Afatinib) (BIBW2992)	20	5.3	2.0	26	47	-	100	171	89	45	0	1.6	4.8	0	-	-	100	98	41	0	0
	10	0	3.9	23	22	7.7	100	98	119	94	50	3.8	0	4.9	15	0	100	115	117	88	23
	5	2	1.9	6	13	25	100	106	100	108	80	0	0	1.5	6.8	28	100	108	92	100	53
	3	0	1.8	0	5.1	5.5	100	106	91	146	135	1.4	1.3	0	0	5.2	100	116	100	139	141
伯舒替尼 (Bosutinib) (SKI-606)	20	12	8	61	52	80	100	85	69	49	7.5	0	2.7	10	31	33	100	89	83	57	3.6
	10	1.9	1.8	4.1	4.2	7.7	100	108	92	91	74	0	1.1	1.2	2	8.2	100	105	92	111	56
	5	0	2	0	0	2.3	100	98	83	117	85	1.2	0	0	0	3	100	149	143	109	81
	3	2.3	0	0	1.4	3	100	130	107	167	156	0	0	0	1.4	1.6	100	106	109	111	192
达克替尼 (Dacomitinib) (PF299804, PF-00299804)	20	7.1	2.5	-	-	-	100	43	0	0	0	1.4	0	-	-	-	100	7	0	0	0
	10	7	5.9	10	27	40	100	119	114	95	35	1.3	0	1.2	5.3	24	100	118	109	75	54
	5	2	4.9	4.1	4.8	2.8	100	80	96	124	141	0	0	0	0	0.8	100	132	90	146	179
	3	0	0	0	2.3	1	100	90	78	121	138	1.1	0	0	0	2.1	100	127	101	167	207
米托蒽醌 (Mitoxantrone)	20	7.1	4.8	48	67	-	100	95	64	21	0	1.3	1.4	7.3	93	-	100	95	71	19	0
	10	2.5	1.4	30	45	38	100	110	116	81	10	0	2.1	11	27	83	100	100	96	51	6.3
	5	0	7.7	17	48	25	100	87	105	90	33	0	1.2	5.3	13	45	100	105	97	87	63
	3	0	4.8	8	14	56	100	75	99	114	66	0	1.3	1.4	5.6	30	100	110	103	103	71
来那替尼 (Neratinib)	20	0	5.8	18	57	-	100	92	37	9.3	0	0	3.3	27	33	-	100	73	37	7.3	0
	10	0	0	1.8	2.1	10	100	105	85	72	62	0	0	0	0	4.4	100	174	127	158	128
	5	3.2	0	0	0	6.4	100	84	78	97	75	0	0	0.8	0	3	100	99	135	146	178
	3	0	0	0	0	2.7	100	107	80	104	82	0	0	0	0	0.7	100	104	113	123	173
苹果酸舒尼替尼 (Sunitinib)	20	1.6	2	50	46	0	100	73	61	21	4.8	0	7.3	17	50	-	100	86	45	3.1	0
	1	0	1.	1.	3	1.	100	12	14	15	18	0	1	3.	2.	4.	100	13	12	11	91

Malate (Sutent))	0		8	7		3	0	8	0	6	6			2	3	3	0	1	3	4	
	5	1. 2	1. 7	0. 8	0	0	10 0	13 7	13 8	17 1	22 4	0	0	0	0	0. 3	10 0	15 5	15 2	21 8	23 9
	3	0	0. 9	2. 4	0	0. 6	10 0	12 7	10 0	14 6	19 5	0	1	0	0	0	10 0	18 7	18 4	26 2	31 8
凡德他尼 (Vandetanib (Zactima))	2 0	8. 9	1 3	21	27	71	10 0	10 4	84	13 1	16	0	4. 7	2. 6	13	57	10 0	59	53	62	9. 6
	1 0	1 8	9. 1	7. 3	6. 5	10	10 0	10 0	12 5	10 5	11 1	0	0	0	1. 9	2. 1	10 0	98	96	11 3	10 0
	5	6. 4	5. 1	7	0	9. 3	10 0	12 6	12 1	14 3	91	0	0	0	0	1. 3	10 0	12 1	12 1	16 3	14 6
长春瑞滨 (Vinorelbine (Navelbine))	3	0	6. 9	5	8. 3	2. 4	10 0	85	11 8	10 6	12 4	0	0	0	0	1. 8	10 0	11 6	12 8	14 8	17 5
	2 0	0	1	1	16	5. 9	10 0	11 6	11 1	11 0	38	0	0	0	0	0	10 0	96	93	85	1. 5
	1 0	6. 5	2. 5	4. 3	17	19	10 0	12 8	12 4	11 1	86	1. 7	1. 7	5	0	4. 8	10 0	97	10 0	90	35
千金藤素 (Cepharanthine)	5	8	1. 1	6. 9	19	19	10 0	11 6	11 6	13 1	11 1	0	6. 6	1. 3	3	7. 3	10 0	16 2	16 8	14 0	11 7
	3	1 1	1 0	8. 3	23	19	10 0	12 1	12 6	11 4	95	0	3. 2	3. 4	8	9. 7	10 0	15 5	14 8	13 8	15 5
	2 0	2	1 3	35	0	-	10 0	80	41	2	0	0	0	0	-	-	10 0	13	1. 3	0	0
盐酸柔红霉素 (Daunorubicin hydrochloride)	1 0	4. 5	1. 4	3. 2	4. 1	7. 7	10 0	10 3	93	10 9	58	0	0	0	0	4. 8	10 0	12 0	12 2	14 8	46
	5	1. 7	1. 8	8. 2	4. 9	3. 9	10 0	95	83	10 3	12 9	1. 6	1. 4	0	0	0. 8	10 0	11 5	11 9	15 2	20 2
	3	4. 9	4. 1	2. 5	1. 7	0	10 0	12 0	13 1	97	14 9	0	1. 3	4. 9	0	0	10 0	32 1	33 8	40 8	49 6
色瑞替尼 (Ceritinib (LDK378))	2 0	0	0	-	-	-	10 0	8. 1	0	0	0	0	0	-	-	-	10 0	2. 2	0	0	0
	1 0	0	1 9	50	-	-	10 0	64	6. 2	0	0	0	0	-	-	-	10 0	13	0	0	0
	5	0	4. 6	20	58	0	10 0	10 8	10 5	10 3	5	0	0	5. 4	58	0	10 0	10 4	94	15	1. 3
奥西替尼 (Osimertinib (AZD9291))	3	2. 5	6. 1	15	57	44	10 0	10 1	13 8	10 2	11	0	3. 3	3. 3	19	0	10 0	10 3	10 2	54	1. 7
	2 0	1 8	2 0	-	-	-	10 0	18	0	0	0	0	-	-	-	-	10 0	0	0	0	0
	1 0	1 0	3 6	0	0	-	10 0	33	12	6. 1	0	0	-	-	-	-	10 0	0	0	0	0
罗米地辛 (Romidepsin (FK228))	5	1. 6	1. 4	4. 1	15	59	10 0	11 3	11 9	74	27	0	1. 1	10	39	-	10 0	10 4	11 5	25	0
	3	0	1. 4	3. 8	25	11	10 0	10 4	11 1	93	54	0	2. 7	14	25	-	10 0	10 9	11 8	60	0
	2 0	0	9. 1	45	50	0	10 0	86	77	6. 3	3. 1	0	3. 8	38	-	-	10 0	90	10 3	0	0
他莫昔芬 柠檬酸盐 (Tamoxifen citrate)	1 0	0	3. 8	16	33	80	10 0	11 0	96	13	6. 9	0	0. 8	10	50	-	10 0	12 6	11 5	4. 2	0
	5	1. 6	1. 4	4. 1	15	59	10 0	11 3	11 9	74	27	0	1. 1	10	39	-	10 0	10 4	11 5	25	0
	3	0	1. 4	3. 8	25	11	10 0	10 4	11 1	93	54	0	2. 7	14	25	-	10 0	10 9	11 8	60	0
他莫昔芬 柠檬酸盐 (Tamoxifen citrate)	2 0	1 4	5 0	10 0	-	-	10 0	19	4. 8	0	0	6. 4	1 6	-	-	-	10 0	17	0	0	0
	1 0	1. 7	1. 2	2. 7	3. 7	5	10 0	12 3	12 5	12 2	14 3	3. 7	1	1	0	0. 8	10 0	12 2	12 4	15 4	16 0
	5	0	1. 7	0	0	1. 3	10 0	10 0	10 8	11 8	12 5	1. 3	0	2. 2	0. 9	1. 6	10 0	11 2	12 0	15 6	16 5
	3	2. 1	0	0	1. 7	0	10 0	96	96	12 8	10 9	0	0	0	1. 1	0	10 0	12 5	11 5	12 0	11 6

表6 检测结果

药物	u M	Hct116-C3										PANC1-C3									
		0 h	6h	12 h	24 h	48 h	0h	6h	12 h	24 h	48 h	0 h	6h	12 h	24 h	48 h	0h	6h	12 h	24 h	48 h
		凋亡细胞 %					细胞数量 %					凋亡细胞 %					细胞数量 %				

阿法替尼 (Afatinib) (BIBW2992)	20	26	59	00	-	100	45	79	26	0	13	13	77	0	-	100	94	41	63	0
	10	37	21	11	23	25	100	43	42	56	22	43	10	16	87	67	100	85	96	49
	50	10	18	18	25	43	100	110	55	60	35	23	94	14	61	29	100	123	102	77
	37	71	31	11	16	23	100	82	72	113	56	67	76	16	10	23	100	110	115	80
伯舒替尼 (Bosutinib) (SKI-606)	20	0	14	27	58	0	100	58	63	108	83	58	48	88	13	-	100	96	65	44
	10	75	37	0	12	83	100	51	68	94	45	36	93	68	13	95	100	78	80	82
	50	83	0	56	0	34	100	50	60	65	48	59	98	114	44	110	100	80	110	88
	38	18	28	16	26	57	100	63	84	68	61	0	13	14	12	56	100	105	95	118
达克替尼 (Dacomitinib) (PF-299804, PF-00299804)	20	31	67	10	-	-	100	52	24	0	0	26	77	-	-	-	100	31	0	0
	10	11	47	38	17	28	100	113	139	187	121	615	13	33	33	100	61	58	54	27
	50	61	37	15	16	22	100	108	124	180	111	101	67	19	21	100	83	65	70	41
	30	0	0	0	19	17	100	139	161	139	139	597	377	83	15	100	79	76	71	59
米托蒽醌 (Mitoxantrone)	20	63	11	-	-	-	100	28	0	0	0	36	26	14	-	-	100	82	75	0
	10	13	53	64	0	-	100	79	58	29	0	77	57	26	0	33	100	67	60	23
	50	11	15	16	18	20	100	104	111	89	56	69	139	89	16	21	100	81	78	53
	35	7	21	32	40	30	100	94	169	151	160	29	12	19	17	25	100	74	62	68
来那替尼 (Neratinib)	20	1	0	14	10	-	100	97	20	19	0	0	71	27	67	-	100	102	37	73
	10	34	18	24	53	13	100	95	139	97	66	0	53	97	23	71	100	119	97	69
	50	16	11	13	31	15	100	121	100	111	121	67	42	41	42	83	100	107	109	107
	36	11	29	48	11	91	100	106	127	139	200	61	21	21	28	100	104	98	94	73
苹果酸舒尼替尼 (Sunitinib Malate (Sutent))	20	0	11	10	23	0	100	98	32	33	33	0	69	11	0	0	100	58	54	16
	10	24	39	27	13	10	100	82	84	55	98	16	92	12	18	22	100	103	95	87
	50	21	0	2	0	0	100	111	106	96	89	22	0	22	0	24	100	96	100	107
	30	0	48	13	63	26	100	91	104	139	165	0	15	0	16	16	100	127	123	111
凡德他尼 (Vandetanib (Zactima))	20	47	0	10	31	50	100	34	45	41	22	39	13	15	23	0	100	100	95	68
	10	58	0	15	14	29	100	42	63	96	60	69	81	19	13	59	100	85	74	54
	50	54	0	97	11	21	100	50	55	66	34	11	93	71	53	0	100	84	66	59
	36	10	0	0	0	71	100	47	55	47	22	82	88	55	0	0	100	116	86	78
长春瑞滨 (Vinorelbine (Navelbine))	20	15	67	14	68	29	100	113	134	170	32	42	59	95	58	0	100	96	89	73
	10	12	13	38	15	40	100	90	96	90	52	27	0	0	0	0	100	68	81	70
	50	75	32	11	22	35	100	78	163	138	50	77	43	59	79	56	100	108	78	58
	35	23	10	10	83	0	100	68	132	109	41	11	820	35	16	100	119	104	78	34
千金藤素 (Cepharanthine)	20	38	13	17	84	0	100	121	187	60	19	71	83	0	0	-	100	43	23	18
	10	37	93	22	41	10	100	159	133	181	63	59	88	71	87	14	100	67	55	45
	50	0	0	0	24	6	100	100	123	137	167	45	17	12	85	71	100	63	76	70
	35	13	61	10	75	53	100	143	130	230	248	29	0	11	0	53	100	100	82	74
盐酸柔红霉素 (Daunorubicin)	20	67	10	-	-	-	100	67	0	0	0	0	0	0	-	-	100	65	15	0
	10	19	0	0	0	0	100	19	38	19	77	0	0	0	0	-	100	58	18	5

icin hydrochloride)	5	2.8	6.5	4.2	30	-	100	149	33	14	0	0	0	1.9	3	-	100	74	80	51	0
	3	0	3	8.3	0	0	100	102	37	38	14	0	0	5	12	50	100	87	77	73	13
色瑞替尼 (Ceritinib) (LDK378)	20	0	-	-	-	-	100	0	0	0	0	7.1	0	-	-	-	100	9.5	0	0	0
	10	0	-	-	-	-	100	0	0	0	0	0	0	10	0	-	100	78	17	3.4	0
	5	2.4	3.2	4.2	0	-	100	76	59	7.3	0	4.9	3.2	7.4	0	-	100	76	66	20	0
	3	3.1	0	0	2.3	0	100	119	147	134	9.4	6.6	5.5	12	42	-	100	90	82	51	0
奥西替尼 (Osimertinib) (AZD9291)	20	0	-	-	-	-	100	0	0	0	0	20	100	-	-	-	100	20	0	0	0
	10	4.2	-	-	-	-	100	0	0	0	0	7	12	33	-	-	100	46	5.3	0	0
	5	3.7	8.3	20	0	-	100	133	189	15	0	5.4	27	25	33	-	100	107	141	16	0
	3	5.1	15	64	100	-	100	51	264	7.7	0	7.5	12	18	10	-	100	123	140	25	0
罗米地辛 (Romidepsin) (FK228)	20	8.8	13	34	35	0	100	111	181	30	1.8	1.9	13	47	0	-	100	75	62	1.9	0
	10	7.8	2.9	39	71	0	100	135	239	75	3.9	1.1	13	29	0	-	100	86	60	5.7	0
	5	1.9	19	42	30	20	100	133	269	219	14	0	3.2	41	50	-	100	86	75	5.6	0
	3	7.1	3.4	8.5	46	27	100	104	211	86	54	1.9	6.5	14	0	-	100	88	54	17	0
他莫昔芬柠檬酸盐 (Tamoxifen citrate)	20	4.1	-	-	-	-	100	0	0	0	0	2.3	8.3	0	-	-	100	39	6.5	0	0
	10	4.2	1.9	4.7	32	41	100	110	133	158	92	4.8	7.9	10	3	0	100	90	71	79	24
	5	7.9	2.4	2.7	7.7	3.8	100	111	134	171	137	2.7	8.8	9.4	3.2	20	100	92	86	84	41
	3	0	2.3	1.7	6.6	8.8	100	100	132	139	130	2.6	9.7	12	6.1	13	100	82	87	87	61

表 7 检测结果

药物	uM	A549-C3									
		0h	6h	12h	24h	48h	0h	6h	12h	24h	48h
		凋亡细胞 %					细胞数量 %				
阿法替尼 (Afatinib) (BIBW2992)	20	1.8	26	19	-	-	100	116	46	0	0
	10	5.3	5.2	9.4	8.3	0	100	103	43	16	12
	5	0	4.7	5.3	0	0	100	98	86	23	9.1
	3	1.5	4	2.4	2.5	7.1	100	115	63	62	65
伯舒替尼 (Bosutinib) (SKI-606)	20	5.1	15	9.7	64	33	100	62	23	18	6.6
	10	4.8	7.1	0	5	7.5	100	67	48	63	63
	5	3.1	6.1	0	0	5	100	77	73	70	63
	3	3.4	1.9	0	0	2.6	100	91	88	55	66
达克替尼 (Dacomitinib) (PF299804,PF-00299804)	20	12	48	77	89	-	100	82	78	12	0
	10	0	3	7.4	3.3	5.2	100	116	117	105	133
	5	3.3	7.4	1.5	1.5	2.9	100	89	111	111	113
	3	0	0	0	6.3	4.7	100	103	100	94	126
米托蒽醌 (Mitoxantrone)	20	5.2	3.1	9.7	67	0	100	192	160	2.6	0.9
	10	15	1.4	2.5	3.3	19	100	109	120	139	48
	5	6.1	11	2.7	1.8	0	100	96	153	229	120
	3	3.2	5.6	2.4	0	2.1	100	116	137	144	153
来那替尼 (Neratinib)	20	1.9	9	32	50	-	100	97	54	1.3	0
	10	0	0	1.4	1.8	2.2	100	109	152	120	98
	5	0	1.7	2.2	1.3	0	100	79	62	108	101
	3	3.6	4.6	1.9	2.3	3.3	100	116	95	157	107
苹果酸舒尼替尼 (Sunitinib)	20	4	22	26	23	0	100	126	101	39	1
	10	0	6.5	0	23	8.7	100	96	79	46	48

Malate (Sutent))	5	0	2.9	1.7	0	3.3	100	149	128	57	130
	3	0	2	1.9	0	0	100	84	91	71	100
凡德他尼 (Vandetanib (Zactima))	20	7.1	3.6	6.9	25	17	100	79	41	23	8.6
	10	2.9	5.2	2.1	2.3	6.9	100	83	67	63	124
	5	2.2	6	0	0	0	100	183	148	128	135
	3	3.4	9.5	9	0	0	100	217	307	124	69
长春瑞宾 (Vinorelbine (Navelbine))	20	3	3.6	6.4	2.4	33	100	125	163	61	27
	10	6.7	2.6	4.5	20	0	100	87	49	67	20
	5	1.7	0	7.5	8.1	19	100	108	88	62	27
	3	1.9	5.4	3.2	2.8	0	100	140	177	206	47
千金藤素 (Cepharanthine)	20	1.8	7.5	11	20	28	100	140	195	44	32
	10	2	4.3	5.7	10	0	100	90	104	57	25
	5	1.9	0	2.9	3.1	0	100	73	67	62	56
	3	0	2.7	0	0	3.8	100	77	77	65	54
盐酸柔红霉素 (Daunorubicin hydrochloride)	20	56	-	-	-	-	100	0	0	0	0
	10	13	0	0	-	-	100	27	6.7	0	0
	5	19	22	16	-	-	100	104	39	0	0
	3	19	46	27	7.1	22	100	198	54	15	9.5
色瑞替尼 (Ceritinib (LDK378))	20	0	60	33	-	-	100	83	50	0	0
	10	6.3	32	100	-	-	100	69	3.1	0	0
	5	3.3	52	63	-	-	100	70	27	0	0
	3	7.3	3.1	2.3	29	0	100	78	105	68	4.9
奥西替尼 (Osimertinib (AZD9291))	20	14	0	0	-	-	100	114	86	0	0
	10	9.1	5.6	6.3	0	0	100	82	73	50	36
	5	8.8	3.8	2.4	17	2.7	100	115	125	194	54
	3	3.1	5.2	15	0	0	100	180	161	9.4	13
罗米地辛 (Romidepsin (FK228))	20	0	3.2	2.3	5.3	0	100	66	91	40	47
	10	5.7	6.9	2	5.6	-	100	191	94	68	0
	5	2	2.1	6.5	0	0	100	92	61	12	2
	3	2.3	1.5	0	1.7	0	100	152	100	132	32
他莫昔芬柠檬酸盐 (Tamoxifen citrate)	20	4.7	7.1	11	2.9	4	100	98	81	81	58
	10	0	0	2.1	2.6	0	100	82	72	58	57
	5	0	0	0	0	2.4	100	92	76	82	82
	3	1.7	0	0	0	2.5	100	88	64	50	69

对于不能达到 IC50 的药物, 就不再继续在三维肿瘤片中使用。通过这种方式, 旨在快速评估这些药物对所测试癌细胞的功效, 并选择最佳候选药物在三维肿瘤片模型中进行进一步测试。

基于在体外传感器 C3 标记的癌细胞系的高通量、延时药物筛选结果, 随后评估了这些高效药物在三维肿瘤片模型中的药敏试验结果。为了在三维肿瘤片平台中筛选药物, 用药物来处理 231-C3 和 HepG2-C3 细胞的三维肿瘤片。结果发现, 在体外诱导细胞凋亡的药物同样能够以不同的效率在三维肿瘤片模型中引起细胞凋亡 (图 7 中 A-B)。

监测患者来源的三维肿瘤片对化疗药物的反应。

接着用三维肿瘤片模型来评估患者来源的肿瘤片的药物疗效。用在 C3 标记的结肠癌和乳腺癌细胞中表现出很强的凋亡诱导能力的药物进行处理从病人结肠癌和乳腺癌样本中提取的肿瘤片 (图 7 中 C-H)。在 4 天的处理后检测了个体癌症样本对药物处理的细胞活力变化。

对于结肠癌 (结肠病例 1), 替加氟 (ftorafur)、盐酸柔红霉素和奥希替尼显著抑制细胞活力 (图 7 中 D), 而对于结肠病例 2, 顺铂、多柔比星、伊立替康、来那替尼、瑞戈非尼和盐酸柔红霉素都显著抑制细胞活力 (图 6 中 E)。结肠病例 3 样品对 adrucil、多柔比星、来那替尼、色瑞替尼、盐酸柔红霉素和奥希替尼表现出很强的敏感性, 导致 ≤ 多柔比星的细胞活力 (图 7 中 F)。

然后通过 MTT 法测定在两个人乳腺癌样本中测量药物功效, 表明两者都非常敏感 (图 7 中 G-H)。尽管测试的 11 种药物中有 9 种导致乳腺癌病例 1 样品的细胞活力 ≤ 品的细, 但只有盐酸表柔比星的作用具有统计学意义 (图 7 中 G)。对于乳腺癌病例 2, 10 种药物 (来那替尼除外) 导致 ≤ 药物 (来的细胞活力, 其中 8 种 (阿杜西、顺铂、多西他赛、多柔比星、盐酸表柔比星、米托蒽醌、盐酸帕博西尼和柠檬酸他莫昔芬) 具有统计学意义 (图 7 中 H)。这些数据凸显了精准医疗中个性化药物测试的必要性, 三维肿瘤片模型可能起到特别有用的作用。

实施例 4

监测三维肿瘤片对免疫检查的抑制剂的敏感性。

为了测试三维肿瘤片的免疫治疗效果，在三维肿瘤片模型中检测了 PD-1 和 PD-L1 抗体处理原发性小鼠和人类来源的肿瘤片的药物反应。

该实验使用 IgG 抗体作为治疗对照。在来自基因工程小鼠模型的肝癌切片中，除了三种肝癌肿瘤（597-T1、T2 和 T3）外，在用 α PD-1（图 8 中 A）或 α PD-L1（图 8 中 B）抗体处理后发现细胞活力降低。PD-L1 抗体组化染色显示，这些肿瘤中 PD-L1 的表达水平范围为 17%-71%（图 8 中 C）。这些数据表明，PD-L1 在一定水平的表达，即使在大约 17% 的细胞水平，也可以使 PD-1/PD-L1 抗体对癌细胞敏感性的起到杀伤力，而即使高达约 50% 的细胞表达 PD-L1 在一些肿瘤中，例如 597-T1-3 和 607，它们的敏感性仍然很低。这一观察结果强调了在临床治疗前进行药物敏感测试的必要性。

同时，还评估了 PD1 抗体或 PD-L1 抗体对源自病人结肠癌的三维肿瘤片的药物敏感性反应。这些肿瘤以低水平（范围为 2%-11%）表达 PD-L1，并且对 PD-1/PD-L1 抗体的敏感性也低于早期测试的小鼠肿瘤（图 8 中 D-F）。结肠病例 4 以约 11% 的细胞表达 PD-L1 水平，并且比其他以较低水平表达 PD-L1 的癌症表现出更高的敏感性。总而言之，数据表明，尽管有一些例外，癌细胞中 PD-L1 的较高表达水平通常会使癌症对药物具有更高的敏感性。在此也测试了 α PD-1 抗体和 IL-2 在三维肿瘤片模型中的药物组合处理效果（图 8 中 G）。数据表明，对源自小鼠 BRCA1 突变体（MK3941）的三维肿瘤片，该突变体对 α PD-1 抗体不敏感，而使用 α PD-1 和 IL-2 的组合治疗具有显著的统计学响应。这些实验原则上表明，可以使用三维肿瘤片系统测试各种药物组合的潜在影响。

实施例 5：基于无标记荧光成像技术实时监测三维肿瘤片对化疗和免疫治疗药物的敏感反应。

与荧光染料标记相比，无标记光学方法允许对组织形态和代谢状态进行快速、无创和时程监测，这在临床和/或商业努力中具有重要的适用性。使用尼康 AIR Ti2-E 多光子倒置显微镜评估三维肿瘤片模型在药物处理的动力学特征。除了作为细胞氧化代谢指标的黄素外，选择性地 1040 nm 处激发了脂褐素（Lipofuscin）的红色 600 nm 自发荧光（图 9 中 A 的光谱验证）。

紧接着制备了带 GFP 的小鼠肿瘤片，证实了三维肿瘤片治疗过程中脂褐素荧光强度的增加和 GFP 阳性细胞数量的减少（图 9 中 B）。接下来，进行了 PI 染色（图 10 中 A）和 MTT 法测定（图 10 中 B，C）并确认所有三种药物诱导的荧光增加与细胞死亡有关性。

作为平行验证，用 25 μ M 顺铂、2.5 μ g/mL α PD-1 或 2.5 μ g/mL α PD-L1 处理后，使用三维肿瘤片在 4 天内观察到小鼠肿瘤样品中脂褐素荧光强度显著增加（图 11 中 A）。然后根据细胞中胶原蛋白（Collagen）、黄素和应激诱导的脂褐素的分子成像对非荧光对应物进行双光子显微镜检查，证实双光子荧光成像系统可以监测源自小鼠非荧光标记肿瘤的三维肿瘤片中药物诱导的细胞凋亡（图 11 中 B-C）。在对病人来源的三维肿瘤片样品的快速演示中（图 11 中 D-G），在用 10 μ g/mL α PD-L1 抗体处理 7 天后，病人来源的结肠癌三维肿瘤片中的脂褐素荧光强度也显著增加。对于鼻咽癌样本，来自两名患者的鼻咽癌三维肿瘤片对免疫抗体治疗表现出不同的反应。在 α PD1/ α PD-L1 抗体处理的患者 11（结肠病例 11）的三维肿瘤片中发现脂褐素荧光强度略有增加。相比之下，在用 10 μ g/mL α PD1 治疗 3 天后，来自患者 12（结肠病例 12）的三维肿瘤片的脂褐素荧光有明显增强。这些结果表明，脂褐素荧光可以作为一种有价值的光学报告器，用于无标记实时监测三维肿瘤片中的药物反应，并可能转化为临床实践。

以上所述仅为本公开的可选的实施例而已，并不用于限制本公开，对于本领域的技术人员来说，本公开可以有各种更改和变化。凡在本公开的精神和原则之内，所作的任何修改、等同替换、改进等，均应包含在本公开的保护范围之内。

工业实用性

本公开提供了一种药物的筛选方法以及三维肿瘤切片模型的培养方法，本公开结合无标记技术和/或细胞凋亡报告物质的延时成像方法，实现了对药物的高通量筛选，并在一周内取得针对特定癌症样本的高效药物。三维肿瘤切片模型的培养完整保留了原始肿瘤的免疫成分，这使得用免疫检查点抑制剂成功实现免疫检查点阻断试验成为可能。该技术为抗癌药物发现提供了一个廉价、快速和简单的平台，加速了精准抗癌治疗，具有优异的工业实用性能。

权利要求书

- 1.一种药物的筛选方法,其特征在于,其包括以下步骤:对三维肿瘤切片模型进行三维培养;其中,所述三维肿瘤切片模型的制备方法包括:将标记有细胞凋亡报告物质的肿瘤组织进行切片处理,获得所述三维肿瘤切片模型;采用候选药物对三维培养中的三维肿瘤切片模型进行处理,基于所述凋亡细胞报告物质的信号筛选候选药物。
- 2.根据权利要求1所述的药物的筛选方法,其特征在于,所述三维肿瘤切片模型的厚度为200~300 μm ;
优选地,所述切片处理的方法如下:采用凝胶对肿瘤组织进行包裹后切片;
优选地,所述三维培养的条件如下:采用插入式细胞培养皿对三维肿瘤切片模型进行三维培养,采用的培养液中包含体积分数为15%~20%的胎牛血清以及40~60 $\mu\text{g/ml}$ 庆大霉素。
- 3.根据权利要求1或2所述的药物的筛选方法,其特征在于,所述细胞凋亡报告物质包括:用于检测细胞凋亡的传感器;
优选地,所述传感器包括caspase-3传感器。
- 4.根据权利要求1~3中任一所述的药物的筛选方法,其特征在于,所述细胞凋亡报告物质包括:SCAT3或zipGFP。
- 5.根据权利要求3或4所述的药物的筛选方法,其特征在于,标记有细胞凋亡报告物质的肿瘤组织的获取方法如下:将所述标记有细胞凋亡报告物质的细胞或其培养物导入动物或动物模型的皮下组织,以形成所述肿瘤组织。
- 6.根据权利要求1~5任一项所述的药物的筛选方法,其特征在于,在采用三维肿瘤切片模型对候选药物进行筛选前,所述筛选方法还包括:采用标记有细胞凋亡报告物质的肿瘤细胞模型对药物进行预筛选,以获得所述候选药物。
- 7.根据权利要求1~6任一项所述的药物的筛选方法,其特征在于,在采用三维肿瘤切片模型进行药物筛选后,所述筛选方法还包括:对临床肿瘤切片样本进行三维培养,将候选药物或经三维肿瘤切片模型筛选后的药物对三维培养中的临床肿瘤切片样本进行处理,基于临床肿瘤切片样本中的内源性荧光物的信号筛选药物。
- 8.根据权利要求7所述的药物的筛选方法,其特征在于,所述内源性荧光物包括:脂褐素、黄素、芳香族氨基酸和NADH中的至少一种;
优选地,当所述内源性荧光物为脂褐素时,内源性荧光物的荧光检测条件如下:单光子的激发波长为488~570nm,双光子的激发波长为970~1140nm,发射波长为550~700nm。
- 9.根据权利要求1~8任一项所述的药物的筛选方法,其特征在于,所述候选药物包括抗癌药物;
优选地,所述抗癌药物包括免疫检查点抑制剂和抗肿瘤药物中的任意一种;
更优选地,所述肿瘤包括乳腺癌、结肠癌、卵巢癌、子宫癌、肝癌、胃癌、肺癌和鼻咽癌中的任意一种。
- 10.一种三维肿瘤切片模型的培养方法,其特征在于,其包括:对三维肿瘤切片模型进行三维培养;其中,所述三维肿瘤切片模型的制备方法包括:将标记有细胞凋亡报告物质的肿瘤组织进行切片处理,获得所述三维肿瘤切片模型;
优选地,所述三维肿瘤切片模型的厚度为200~300 μm ;
优选地,所述切片处理的方法如下:采用凝胶对肿瘤组织进行包裹后切片;优选地,所述三维培养的条件如下:采用插入式细胞培养皿对三维肿瘤切片模型进行三维培养,采用的培养液中包含体积分数为15%~20%的胎牛血清以及40~60 $\mu\text{g/ml}$ 庆大霉素。
- 11.一种用于筛选药物的方法,其特征在于,其包括以下步骤:对临床肿瘤切片样本进行三维培养,将候选药物对三维培养中的临床肿瘤切片样本进行处理,基于临床肿瘤切片样本中的内源性荧光物的信号进一步筛选药物。
- 12.一种实时预测药物反应的方法,其特征在于,其包括:对三维肿瘤切片模型进行三维培养;其中,所述三维肿瘤切片模型的制备方法包括:将标记有细胞凋亡报告物质的肿瘤组织进行切片处理,获得所述三维肿瘤切片模型;采用候选药物对三维培养中的三维肿瘤切片模型进行处理,基于所述细胞凋亡报告物质的信号实时预测候选药物的反应。
- 13.一种药物的筛选体系,其特征在于,所述筛选体系包括:
经三维培养的三维肿瘤切片模型;
候选药物;
所述三维肿瘤切片模型通过将标记有细胞凋亡报告物质的肿瘤组织进行切片处理获得;
所述筛选体系采用所述候选药物对经三维培养的三维肿瘤切片模型进行处理,基于所述凋亡细胞报告物质的信号筛选候选药物。
- 14.根据权利要求13所述的药物的筛选体系,其特征在于,所述三维肿瘤切片模型的厚度为200~300 μm ;
优选地,所述切片处理的方法如下:采用凝胶对肿瘤组织进行包裹后切片;
优选地,所述三维培养的条件如下:采用插入式细胞培养皿对三维肿瘤切片模型进行三维培养,采用的培养液中包含体积分数为15%~20%的胎牛血清以及40~60 $\mu\text{g/ml}$ 庆大霉素;
优选地,所述细胞凋亡报告物质包括:用于检测细胞凋亡的传感器;
优选地,所述传感器包括caspase-3传感器。

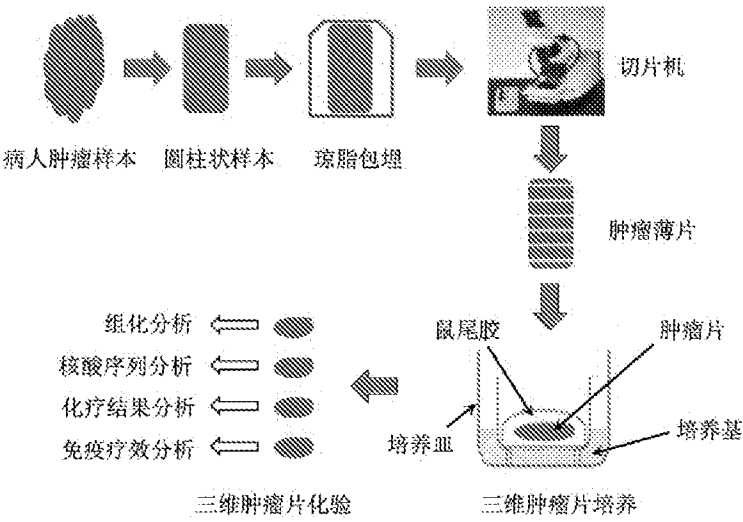


图 1

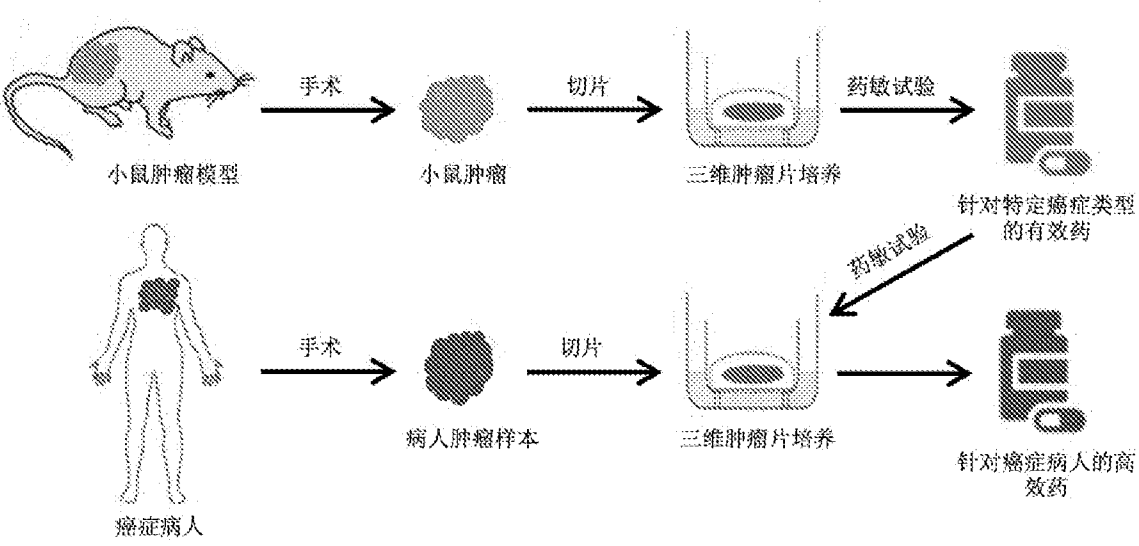


图 2

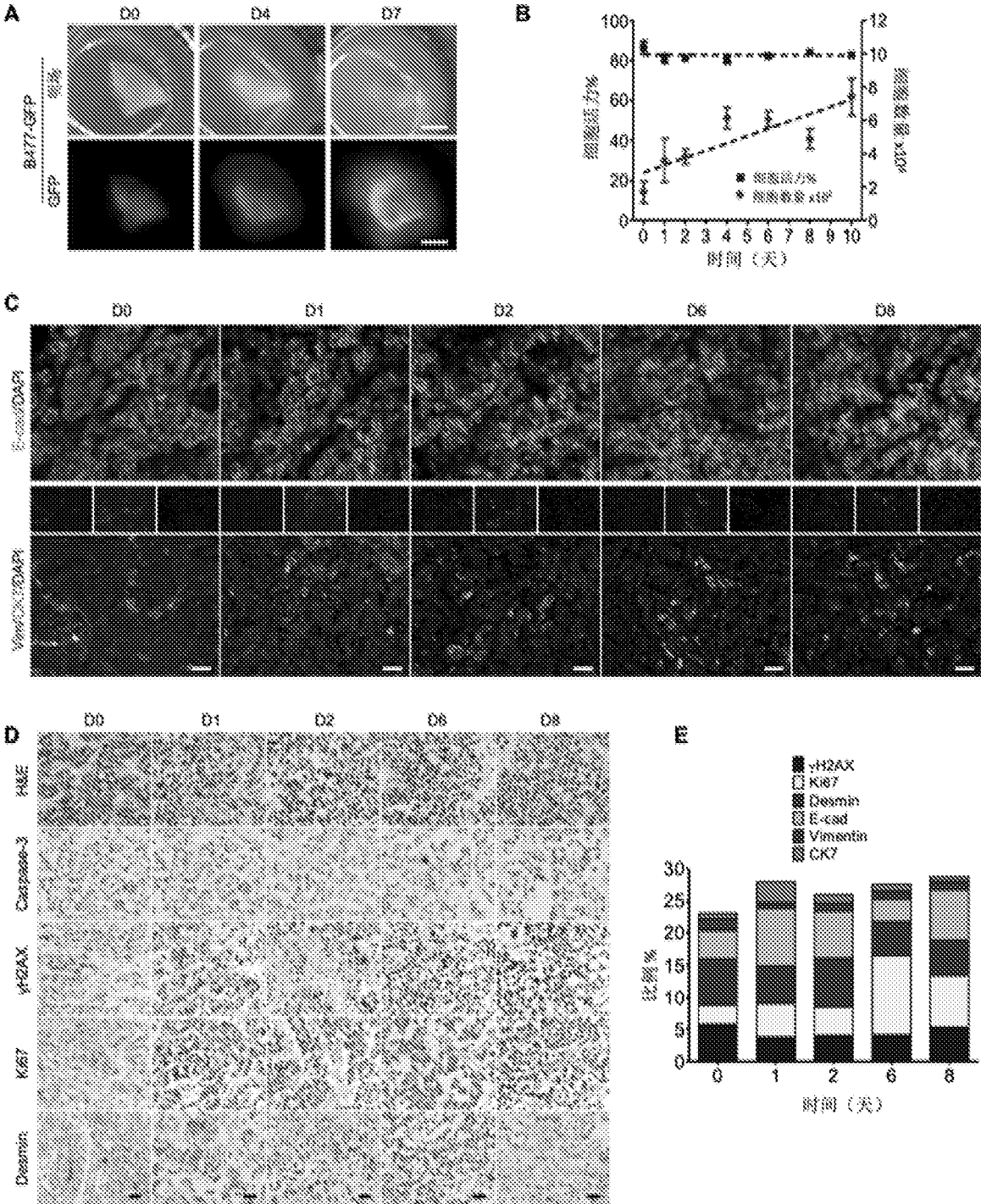


图 3

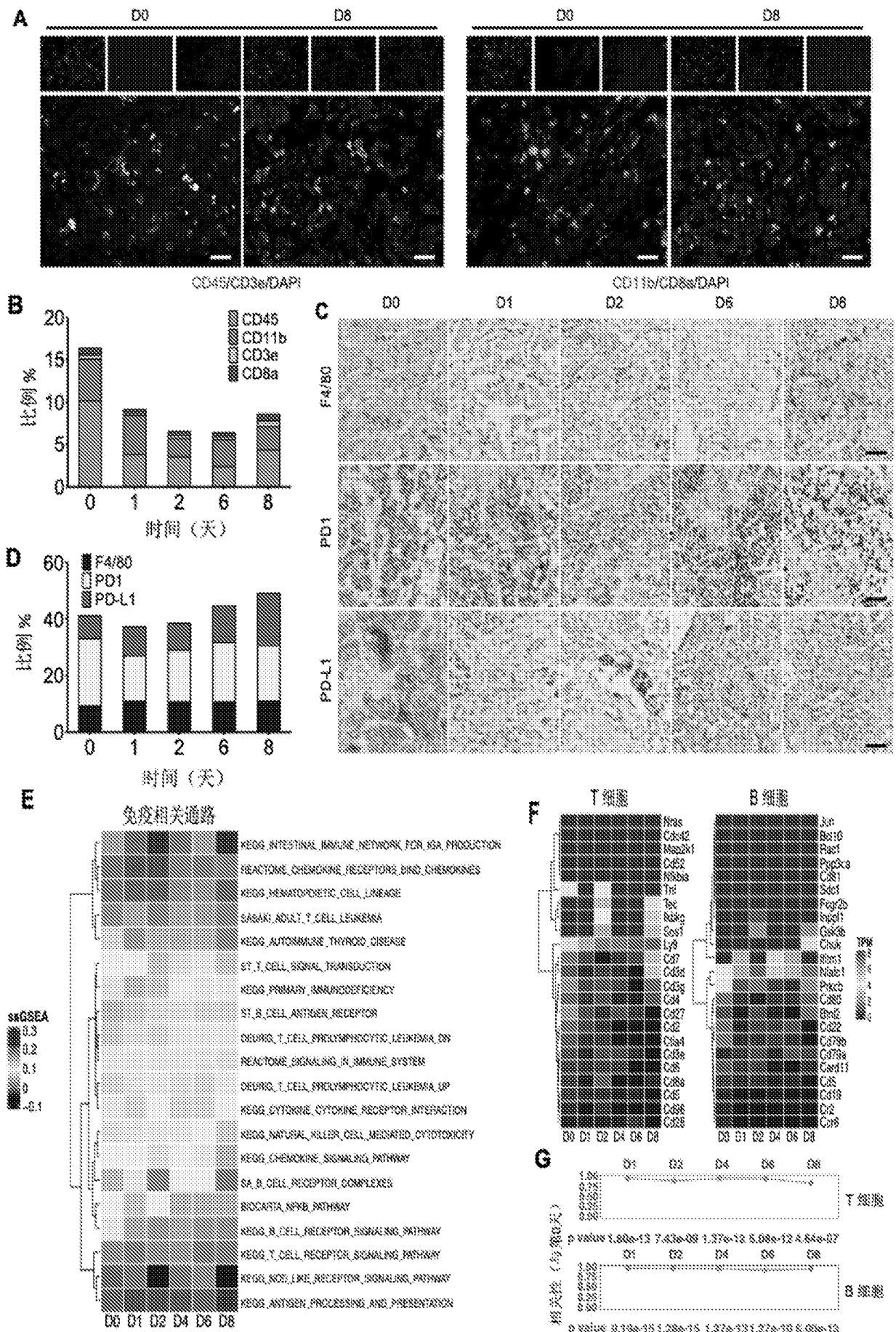


图 4

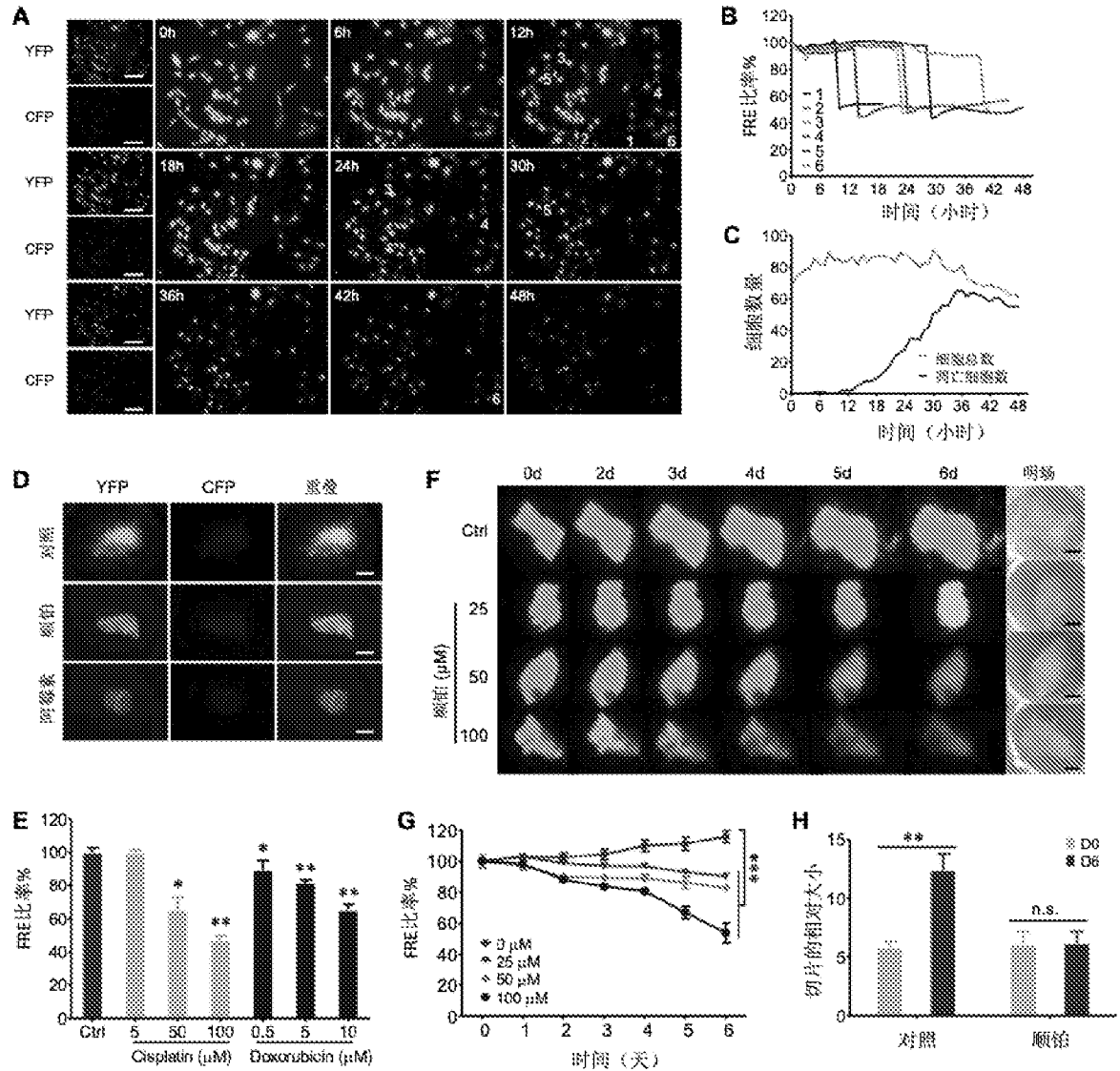


图 5

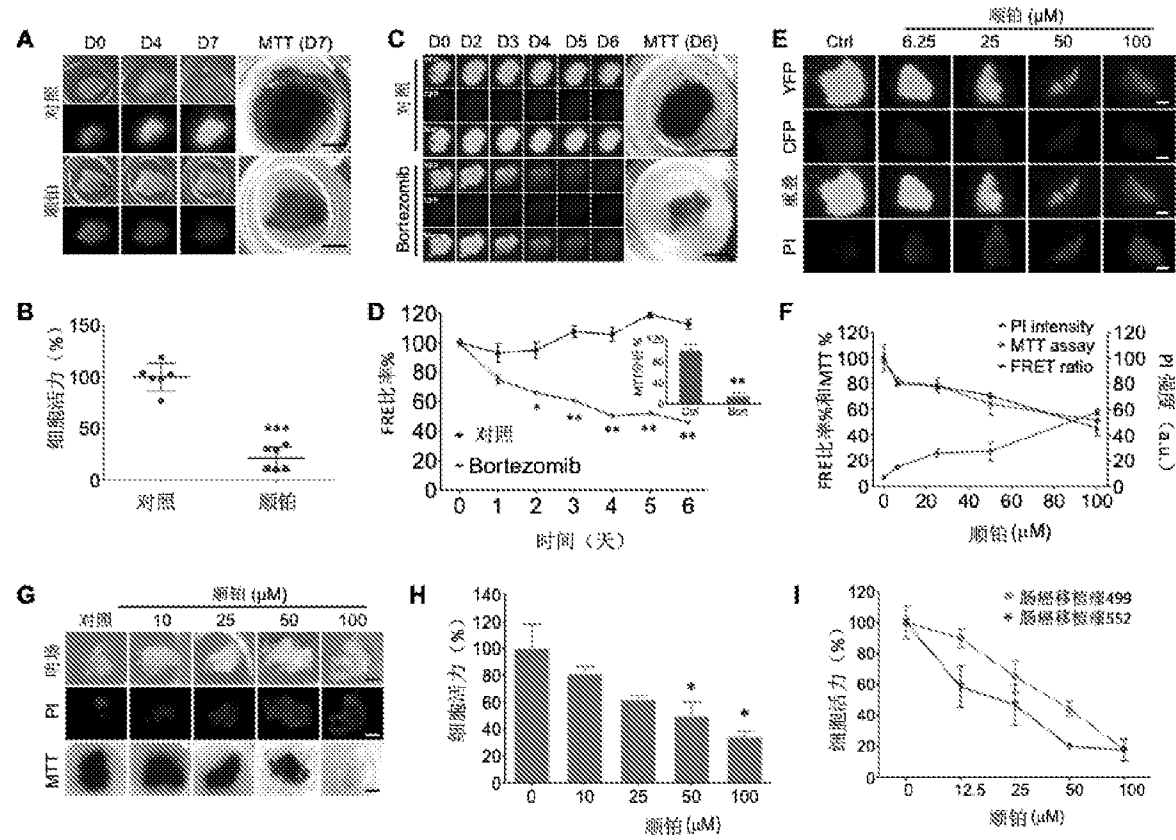


图 6

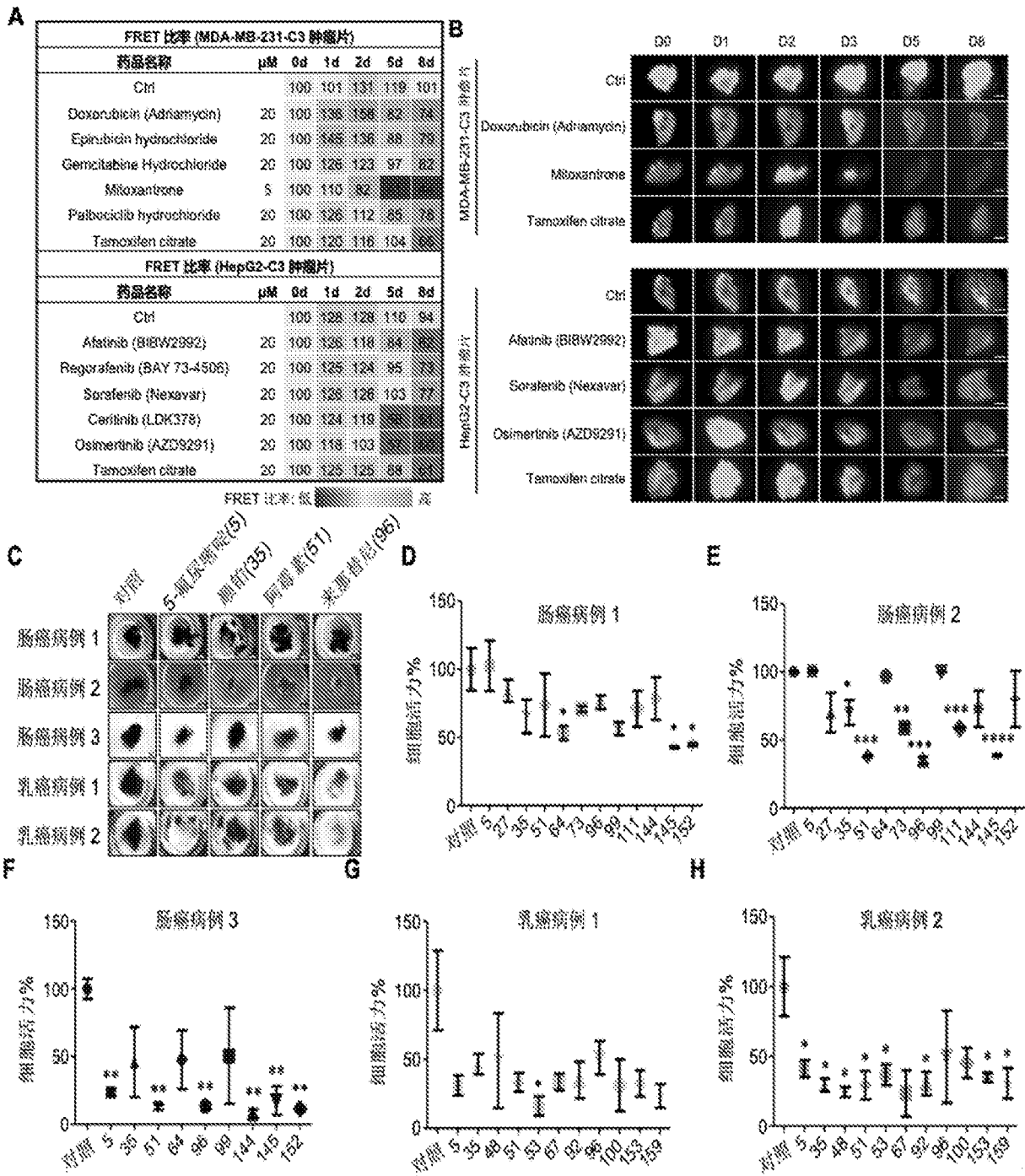


图 7

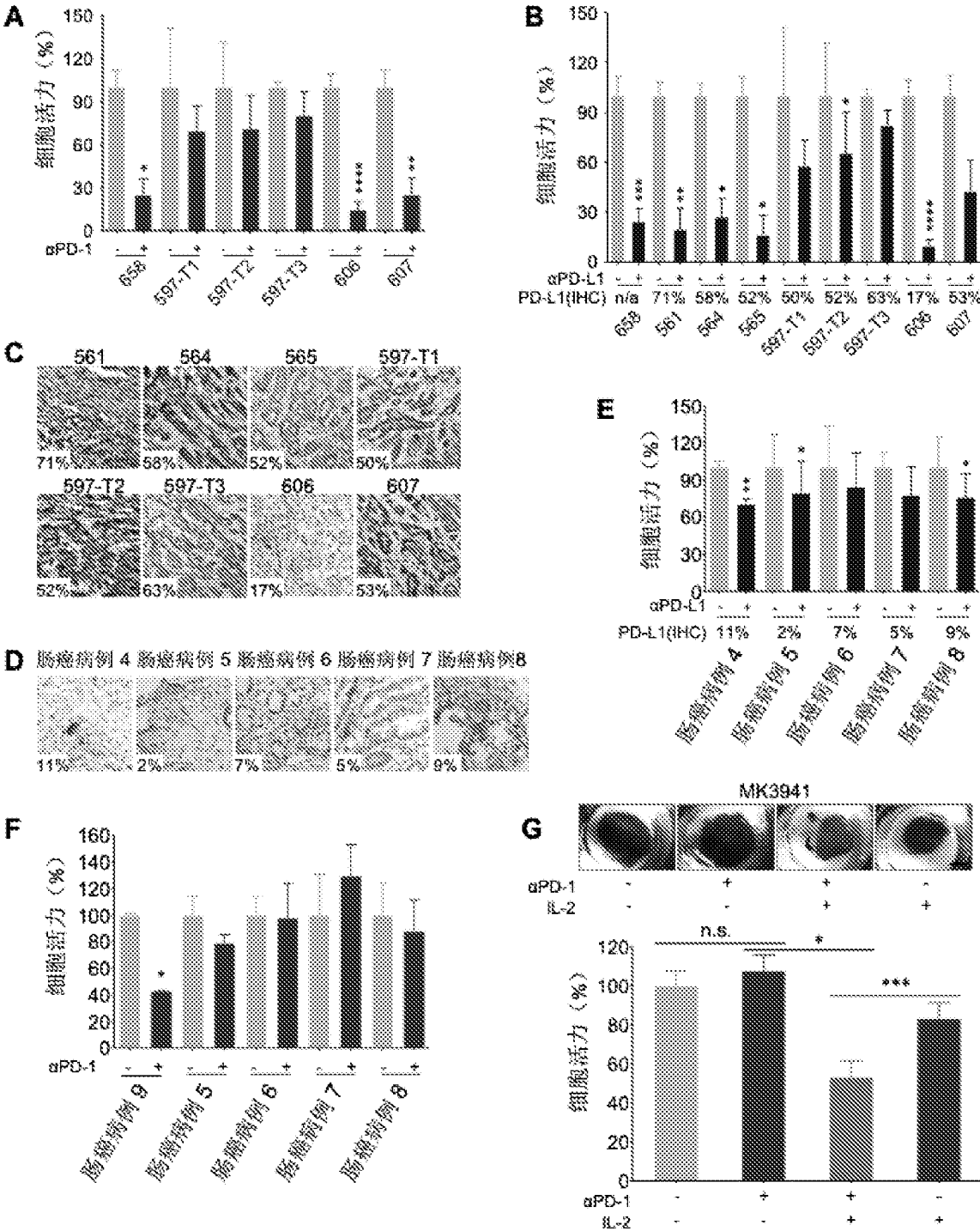


图 8

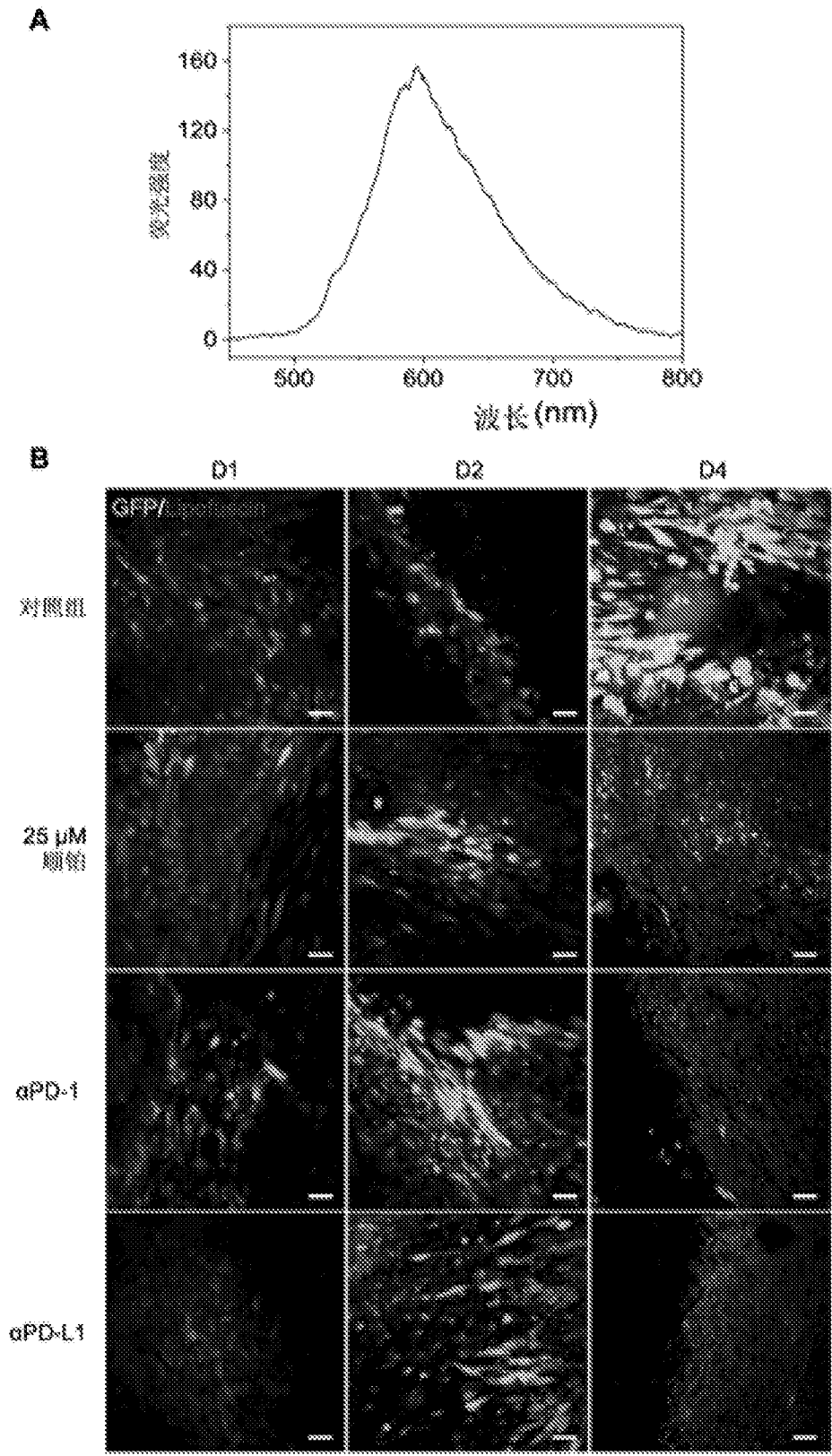


图 9

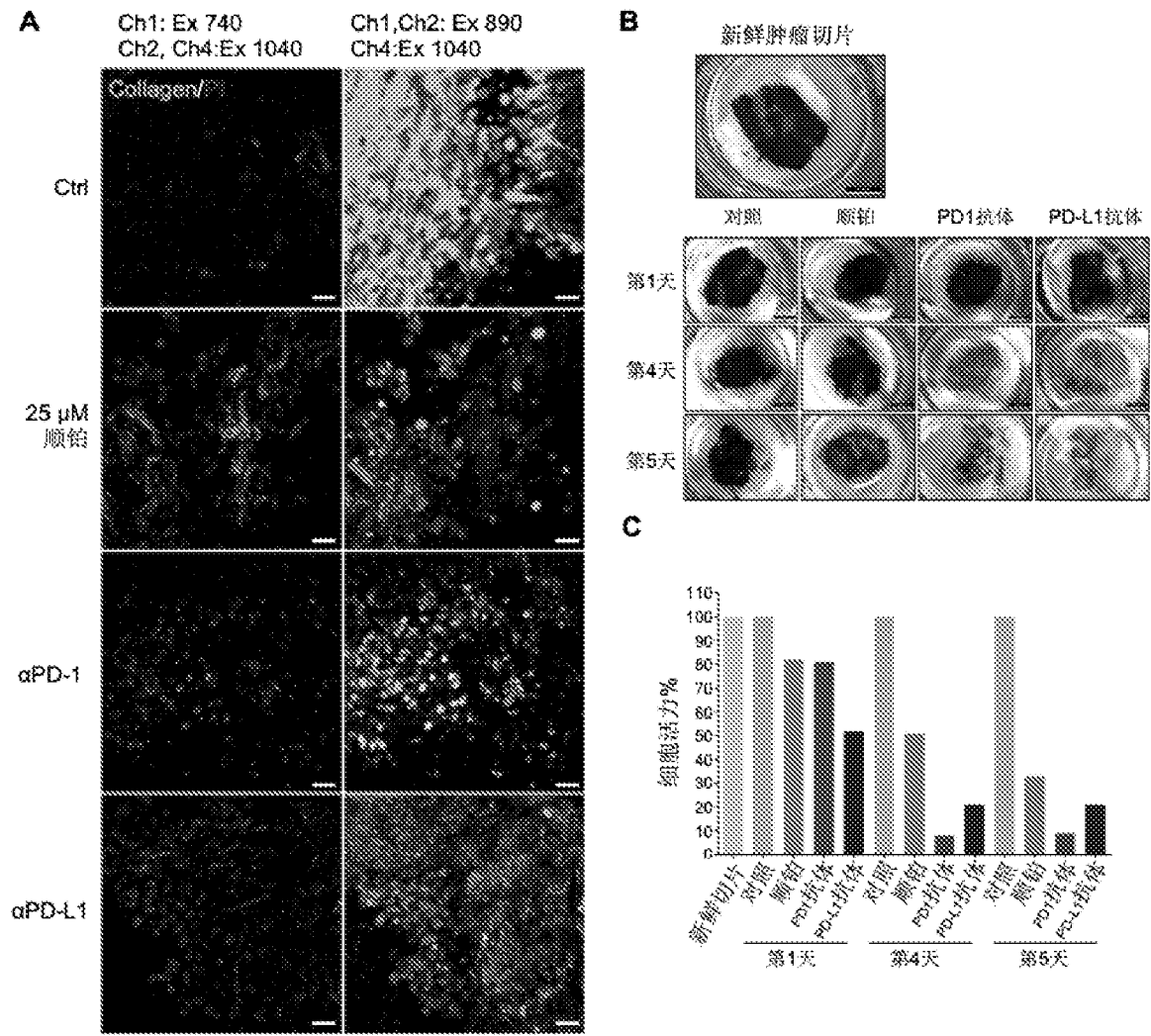


图 10

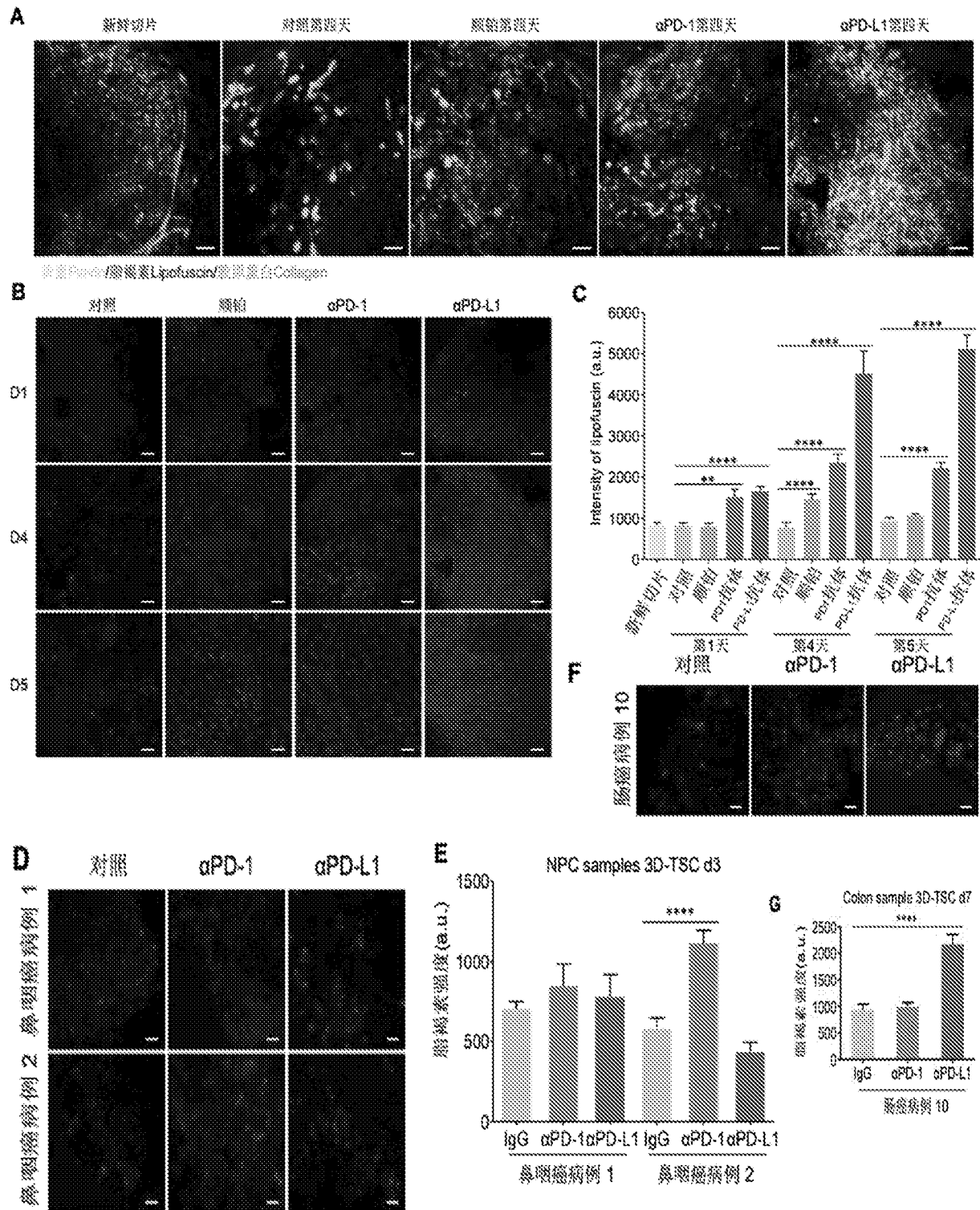


图 11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/104365

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q 1/02(2006.01)i; C12N 5/09(2010.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12Q; C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNTEXT, WPABS, WPABSC, ENTXTC, CJFD, CNKI, 万方数据资源系统, WANFANG, PubMed, ScienceDirect: 申请人/发明人: 三维, 肿瘤模型, 肿瘤切片, 筛选, 药物, 报告基因, 细胞凋亡, 生物传感器, 内源性荧光, 自发荧光, 抗癌, 癌症, 免疫检查点, caspase-3, SCAT3, zipGFP, 芳香族氨基酸, NADH, 黄素, 脂褐素, 3D tumor, slice, drug, response, reporter, C3 sensor, checkpoint, flavins, lipofuscin, label free, unlabeled, native fluorescence, reduced pyridine nucleotides, aromatic amino acid residues, anti-cancer, PD1, PD-L1.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 113832211 A (UNIVERSITY OF MACAU; SOUTHERN UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) 24 December 2021 (2021-12-24) claims 1-10	1-14
X	WEBER, P. et al. "Monitoring of Apoptosis in 3D Cell Cultures by FRET and Light Sheet Fluorescence Microscopy" <i>International Journal of Molecular Sciences</i> , Vol. 16, No. 3, 09 March 2015 (2015-03-09), 5375-5385	1-14
X	XING, Fuqiang et al. "Accelerating precision anti-cancer therapy by time-lapse and label-free 3D tumor slice culture platform" <i>THERANOSTICS</i> , Vol. 11, No. 19, 13 September 2021 (2021-09-13), 9415-9430	1-14
Y	CN 111690616 A (PHARMALEGACY LABORATORIES (SHANGHAI) CO., LTD.) 22 September 2020 (2020-09-22) embodiment 1	1-14

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

22 September 2022

Date of mailing of the international search report

10 October 2022

Name and mailing address of the ISA/CN

China National Intellectual Property Administration (ISA/CN)

No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088, China

Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/104365**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CN 102558310 A (LI BINGHUI) 11 July 2012 (2012-07-11) embodiment 1	1-14
Y	US 2020143531 A1 (XU MIN) 07 May 2020 (2020-05-07) paragraphs 68-69 and 84-86	7-8, 11
A	CN 1396265 A (HONG KONG UNIVERSITY OF SCIENCE & TECHNOLOGY) 12 February 2003 (2003-02-12) entire document	1-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2022/104365

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	113832211	A	24 December 2021	None			
CN	111690616	A	22 September 2020	None			
CN	102558310	A	11 July 2012	None			
US	2020143531	A1	07 May 2020	WO	2017012555	A1	26 January 2017
				CN	107847145	A	27 March 2018
CN	1396265	A	12 February 2003	US	7354735	B2	08 April 2008

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2022/104365

A. 主题的分类

C12Q 1/02 (2006.01) i; C12N 5/09 (2010.01) i

按照国际专利分类 (IPC) 或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献 (标明分类系统和分类号)

C12Q; C12N

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库 (数据库的名称, 和使用的检索词 (如使用))

CNXT, WPABS, WPABSC, ENTXTC, CJFD, CNKI, 万方数据资源系统, PubMed, ScienceDirect: 申请人/发明人: 三维, 肿瘤模型, 肿瘤切片, 筛选, 药物, 报告基因, 细胞凋亡, 生物传感器, 内源性荧光, 自发光, 抗癌, 癌症, 免疫检查点, caspase-3, SCAT3, zipGFP, 芳香族氨基酸, NADH, 黄素, 脂褐素, 3D tumor, slice, drug, response, reporter, C3 sensor, checkpoint, flavins, lipofuscin, label free, unlabeled, native fluorescence, reduced pyridine nucleotides, aromatic amino acid residues, anti-cancer, PD1, PD-L1.

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
PX	CN 113832211 A (澳门大学 南方科技大学) 2021年12月24日 (2021 - 12 - 24) 权利要求1-10	1-14
X	WEBER, P. 等. "Monitoring of Apoptosis in 3D Cell Cultures by FRET and Light Sheet Fluorescence Microscopy" INT. J. MOL. SCI., 第16卷, 第3期, 2015年3月9日 (2015 - 03 - 09), 5375-5385	1-14
X	XING, F. Q等. "Accelerating precision anti-cancer therapy by time-lapse and label-free 3D tumor slice culture platform" THERANOSTICS., 第11卷, 第19期, 2021年9月13日 (2021 - 09 - 13), 9415-9430	1-14
Y	CN 111690616 A (澎立生物医药技术上海有限公司) 2020年9月22日 (2020 - 09 - 22) 实施例1	1-14
Y	CN 102558310 A (李兵辉) 2012年7月11日 (2012 - 07 - 11) 实施例1	1-14

☒ 其余文件在C栏的续页中列出。☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件 (如具体说明的)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

2022年9月22日

国际检索报告邮寄日期

2022年10月10日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中国国家知识产权局 (ISA/CN)

中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

传真号 (86-10)62019451

授权官员

高雅

电话号码 86-(10)-53961943

C. 相关文件		
类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
Y	US 2020143531 A1 (XU, M.) 2020年5月7日 (2020 - 05 - 07) 第68-69、84-86段	7-8, 11
A	CN 1396265 A (香港科技大学) 2003年2月12日 (2003 - 02 - 12) 全文	1-14

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2022/104365

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	113832211	A	2021年12月24日	无			
CN	111690616	A	2020年9月22日	无			
CN	102558310	A	2012年7月11日	无			
US	2020143531	A1	2020年5月7日	WO	2017012555	A1	2017年1月26日
				CN	107847145	A	2018年3月27日
CN	1396265	A	2003年2月12日	US	7354735	B2	2008年4月8日