



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 102460165 B

(45)授权公告日 2016.08.17

(21)申请号 201080031427.8

(22)申请日 2010.05.19

(30)优先权数据

61/179,685 2009.05.19 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2012.01.11

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2010/035474 2010.05.19

(87)PCT国际申请的公布数据

W02010/135468 EN 2010.11.25

(73)专利权人 维维雅生物技术公司

地址 西班牙马德里

(72)发明人 胡安·巴勒斯特若斯

特里萨·班尼特 丹尼尔·普瑞莫

艾伯特·奥夫奥 考伊特·杰克逊

圣地亚哥·莱格

玛利亚·马特塞斯

莉莉亚·苏莱兹 桑德拉·萨皮亚

安德鲁·博桑基特

朱利安·高若查特奎

康斯埃洛·图德拉

佩勒·荷南德兹

刘易斯·艾格纳西欧·卡威达

(74)专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理
有限责任公司 11204

代理人 王达佐 洪欣

(51)Int.Cl.

G01N 33/50(2006.01)

(56)对比文件

US 2008/0318252 A1, 2008.12.25,

WO 2006/031867 A2, 2006.03.23,

WO 2007/015926 A2, 2007.02.08,

CN 101044249 A, 2007.09.26,

US 5474909 A, 1995.12.12,

US 2002/0068316 A1, 2002.06.06,

CN 101351563 A, 2009.10.21, (续)

审查员 赵晓明

权利要求书2页 说明书57页 附图35页

(54)发明名称

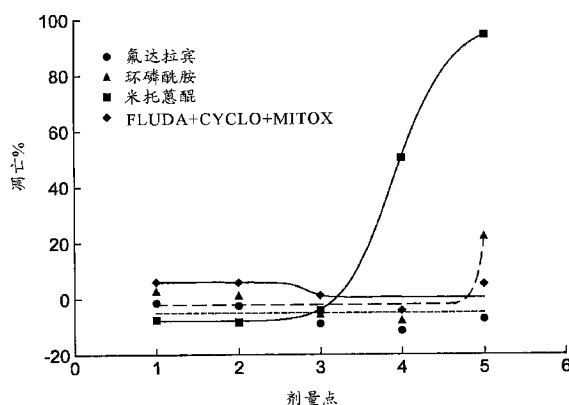
用于为血液肿瘤提供离体个体化药物测试的方法

(57)摘要

在此描述的是提供用于血液肿瘤个体化药物测试的方法、装置和组合物。在一些实施方案中,所述方法包括测量使用许多潜在的可供选择的联合药物治疗选择性地诱导恶性细胞凋亡的效力。在一些实施方案中,使用最近提取的患者血液样品测量离体测试。在其它实施方案中,使用自动流式细胞术平台离体测量所述效力。例如,通过利用自动流式细胞术平台,可以离体进行数百甚至数千种药物和组合物的评估。因而,可以研究可选择的多药疗法治疗。令人惊奇的是,非细胞毒性药物能选择性地诱导离体恶性细胞的凋亡。在一些实施方案中,在此描述的方法

包括评估非细胞毒性药物。

(μ M)	氟达拉滨	环磷酰胺	米托蒽醌
1	1	30	1
2	0.33	10	0.33
3	0.11	3.33	0.11
4	0.037	1.11	0.037



[转续页]

[接上页]

(56)对比文件

Janet Clarke,et al..Evaluation of a surrogate antibody for preclinical safety testing of an anti-CD11a monoclonal antibody.《Regulatory Toxicology and Pharmacology》.2004,第40卷(第3期),219-226.

徐志学,田和平.全血快速免疫学试验.《武汉医学杂志》.1994,第18卷(第3期),181-182.

Teresa A Bennett,et al..UTILIZING

CELL-BASED SCREENING TO IDENTIFY NOVEL USES FOR EXISTING DRUGS: INDUCING SPECIFIC APOPTOSIS OF B-CELL LYMPHOCYTES.《HAEMATOLOGICA-THE HEMATOLOGY JOURNAL》.2009,第94卷175.

Bennett T,et al..PERSONALIZED MEDICINE TEST FOR HAEMATOLOGICAL MALIGNANCIES.《HAEMATOLOGICA-THE HEMATOLOGY JOURNAL》.2009,571.

1. 用于非诊断目的的分析细胞对药物响应性的方法,其包括:

从已离开患者的血液肿瘤中获得全骨髓样品,其中所述全骨髓样品基本上保持了原始细胞微环境;

将所述全骨髓样品等分成至少35份等分试样,其中全骨髓等分试样包含500或更多个肿瘤细胞;

将至少35份全骨髓等分试样与药物组合物结合;以及

测量至少35份全骨髓等分试样每一份中的所述患者至少一种细胞群的细胞消除,其中所述细胞消除相对于没有药物组合物的对照等分试样,对在全骨髓等分试样中不再存活的细胞进行计数。

2. 用于非诊断目的的分析患者肿瘤细胞对药物响应的方法,其包括:

从患者采集的血液肿瘤获得全骨髓样品,其中所述全骨髓样品基本上保持了原始细胞微环境;

将所述全骨髓样品分成至少35份等分试样,其中全骨髓等分试样包含500或更多个肿瘤细胞;

将至少35份全骨髓等分试样与药物组合物结合,其中每一全骨髓等分试样中的药物组合物与所有其它全骨髓等分试样中的药物组合物在药物特性、浓度或它们的组合中的至少一种有所不同,并且其中所述药物组合物均包含至少一种非细胞毒性药物;

孵育与药物组合物结合的全骨髓等分试样;以及

对于各孵育的全骨髓等分试样,通过测量细胞消除来分析至少一种类型的肿瘤细胞对所述药物组合物的响应性,其中所述细胞消除相对于没有药物组合物的对照等分试样,对在全骨髓等分试样中不再存活的细胞进行计数。

3. 如权利要求1或2所述的方法,其中所述分析在将全骨髓等分试样与药物组合物结合72小时以内完成。

4. 如权利要求1或2所述的方法,其中与药物组合物结合的全骨髓等分试样的数量为至少96份。

5. 如权利要求1或2所述的方法,其中至少一种药物组合物包含多种药物。

6. 如权利要求1或2所述的方法,其中至少一种药物组合物包含多种非细胞毒性药物。

7. 如权利要求1或2所述的方法,其中至少一种药物组合物包含与已经给予患者的药物相同的或处于相同治疗类别中的非细胞毒性药物。

8. 如权利要求1或2所述的方法,其中至少一种药物组合物结合有非细胞毒性药物和细胞毒性药物。

9. 如权利要求1或2所述的方法,其中所述全骨髓样品包含指征选自以下血液肿瘤的细胞:慢性淋巴细胞白血病、成人急性淋巴细胞白血病、小儿急性淋巴细胞白血病、多发性骨髓瘤、骨髓增生异常综合征、非M3型急性髓细胞白血病、M3型急性髓细胞白血病、非霍奇金淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤和慢性髓性白血病。

10. 如权利要求9所述的方法,其中所述测量在将全骨髓等分试样与药物组合物结合24小时内完成。

11. 如权利要求9所述的方法,其中所述测量在将全骨髓等分试样与药物组合物结合48小时内完成。

12. 如权利要求9所述的方法,其中所述测量在将全骨髓等分试样与药物组合物结合72小时内完成。

13. 如权利要求9所述的方法,其中全骨髓等分试样包含5,000或更多个肿瘤细胞/孔。

14. 如权利要求9所述的方法,其中全骨髓等分试样包含10,000或更多个肿瘤细胞/孔。

15. 如权利要求9所述的方法,其中全骨髓等分试样包含20,000或更多个肿瘤细胞/孔。

16. 如权利要求9所述的方法,其中全骨髓等分试样包含40,000或更多个肿瘤细胞/孔。

用于为血液肿瘤提供离体个体化药物测试的方法

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求于2009年5月19日提交的美国临时专利申请系列号61/179685的优先权,其通过引用全文并入本文。

[0003] 发明背景

[0004] 本发明涉及筛选平台在使用癌症患者标本来确定多种药物和药物组合的细胞毒性药物敏感性特征中的应用。在此描述了通过流式细胞术将自动样品制备和自动评估相结合的基于细胞的筛选平台,由于其快速的数据采集、分析和报告结果,甚至是在极其大量的药物和药物组合时,因此该筛选平台可用于个体化药物测试。还公开了可用于治疗增殖性淋巴疾病的特定药物组合。

[0005] 相关技术描述

[0006] 可利用许多方法评估从癌症患者取得的离体样品中肿瘤细胞的细胞毒性药物的敏感性特征。在过去的40年里,已开发了用于检测血液肿瘤中的细胞死亡的离体测定,导致产生很多用于鉴定化学敏感性的测定。最近提议将术语个体化肿瘤响应测试/测试(ITRT)用于这些方法来描述“抗癌治疗对从癌症患者新鲜分离的完整活肿瘤细胞的影响”(Bosanquet et al., G.J. Kaspers, B. Coiffier, M.C. Heinrich 和 E.H. Estey. New York, NY, 2008, Informa Healthcare: 23-44)。最初设计用于研究药物减缓或阻止肿瘤细胞生长(例如克隆生成测定)能力的ITRT不起作用。然而,二十世纪八十年代中,开发了许多始终可显示测定结果和临床结果之间良好比较(即临床相关性)的细胞死亡的ITRT。

[0007] 即使具有良好的临床相关性,但目前可利用的细胞死亡的ITRT遭受限制其用作个体化药物测试的不期望的限制。例如,克隆生成测定通常需要几周而不是几天来产生结果,这限制了它们的临床用途(Hamburger et al., Science 1911, 197: 461-463; Marie et al., Br J Haematol 1983, 55: 427-437; Selby et al., New Engl J Med 1983, 308: 129-134)。同样地,大部分ITRT测量总的细胞死亡来评估用药物孵育离体样本的作用。测量总的细胞死亡限制了ITRT区分药物对肿瘤细胞的影响和对正常细胞的影响之间的能力。目前可利用的ITRT彼此之间的区别主要是关于在测试结束时所使用的确定活细胞或活肿瘤细胞百分比的方法。

[0008] 虽然一些ITRT直接测量细胞,但是大多数ITRT使用替代标记物间接评估细胞死亡。例如,MTT(甲基噻唑基四唑)测定法通过测量线粒体将MTT还原成甲臞所引起的可以使用分光光度计进行定量的颜色变化来估计活细胞数量(Pieters et al., Blood 1990, 76: 2327-2336; Sargent et al., Br J Cancer 1989, 60: 206-210; Carmichael et al., Cancer Res 1987, 47: 936-942)。其它ITRT利用荧光素的二乙酸酯水解(例如,微培养细胞毒荧光分析(FMCA))或作为细胞活力间接标记物的细胞ATP水平(Rhedinet al., Leuk Res 1993, 17: 271-276; Larsson et al., Int J Cancer 1992, 50: 177-185)。DiSC(细胞毒性差异染色(Differential Staining cytotoxicity))试验和最近的TRAC(肿瘤对抗肿瘤化合物的响应)试验,利用染色法通过显微镜来确定活肿瘤细胞(Bosanquet et al., Br J Haematol 2009, 146: 384-395; Bosanquet et al., Leuk Res 1996, 20: 143-153; Weisenthal et al.,

Cancer Res 1983,43:749-757)。

[0009] 上述ITRT需要将患者的肿瘤细胞与细胞毒性药物一起孵育至少4至5天的时间。然而,血液细胞在人体外仅24至48小时就开始失去重要的特性。较短的孵育时间将允许在患者治疗开始之前评估离体细胞毒性特征,从而增加它们的临床效用并允许作为个体化药物测试的更为有效的应用。

[0010] 已证实细胞毒性药物可通过诱导凋亡来消除恶性细胞(Aragane et al., J Cell Biol 1998,140:171-182;Hannun et al., Blood 1997,89:1845-1853)。凋亡是一类细胞死亡,通常在本领域内被称为“程序性细胞死亡”,其在领域内根据形态学和抗原性特征来定义。凋亡通常在药物与靶细胞接触的几小时内开始(Del Bino et al., Cell Prolif 1999, 32:25-37)。有许多基于反映凋亡过程不同方面的标记物的凋亡测定,如:1)利用DiOC6或JC-I改变线粒体膜电位(Tabrizi et al., Leukemia 2002,16:1154-1159;Liu et al., Leukemia 2002,16:223-232);2)利用电泳或用吖啶橙标记(Tabrizi et al., Leukemia 2002,16(6):1154-9;Kim et al., Exp Mol Med 2000,32:197-203;Konstantinov et al., J Cancer Res Clin Oncol 2002,128:271-278;Ofir et al., Cell Death Differ 2002, 9:636-642),通过末端脱氧核苷酸转移酶(TUNEL)测定中的Tdt鉴别核小体间DNA的片段化(Liu et al., Leukemia 2002,16:223-232);或者3)利用特异性抗体,鉴别多聚-ADP-核糖聚合酶(PARP)或半胱氨酸蛋白酶-3的蛋白水解片段(Konstantinov et al., J Cancer Res Clin Oncol 2002,128(5):271-8;Ofir et al., Cell Death Differ 2002,9(6):636-42;Byrd et al., Blood 2002,99:1038-1043;Hasenjäger et al., Oncogene 2004,23: 4523-4535;Prokop et al., Oncogene 2003,22:9107-9120)。

[0011] 另一种凋亡测定是基于利用流式细胞术对与荧光标记物(即荧光染料)缀合缀合的Annexin V的检测。Annexin V与仅出现在经历凋亡的细胞的膜表面的表面化磷脂酰丝氨酸残基结合(Tabrizi et al., Leukemia 2002,16(6):1154-9;Nimmanapalli et al., Cancer Res 2002,62:5761-5769)。凋亡的测量可以根据结合Annexin V-荧光缀合缀合物的细胞百分比来评估,如通过流式细胞术所检测的。此外,本领域内已知用于鉴别肿瘤细胞(相对正常细胞)的几种单克隆抗体组合。表1总结了不同的单克隆抗体组合,当与荧光染料缀合缀合时,利用不同的光谱检测法可以用于鉴别血液肿瘤细胞。

[0012] 表1:用于肿瘤细胞鉴别的单克隆抗体组合

[0013]

血液肿瘤	AcM-荧光染料缀合物
ALL, CLL, NHL	CD19-PE, CD45-APC
MM	CD38-PE, CD45-APC
AML	CD34-PE, CD45-APC

[0014] ALL=急性淋巴细胞白血病;CLL=慢性淋巴细胞白血病;NHL=非霍奇金淋巴瘤;MM=多发性骨髓瘤;AML=急性髓细胞白血病

[0015] 一些ITRT,特别是DiSC和TRAC测定,允许同时测量肿瘤细胞和正常细胞中的细胞毒性,从而允许确定治疗指数(Bosanquet et al., Leuk. Res. 1996;20:143-53;Bosanquet et al., J Exp Ther Oncol 2004;4:145-54)。

[0016] 研究人员在几篇科学综述中已证实了ITRT的预测能力。血液恶性肿瘤中1929例临

床相关性的综述(Bosanquet et al.in Kaspers et al.(eds.),2008)和其他综述(例如,Kaspers GJ.,Methods MoI Med.2005;110:49-57)显示高百分比的阳性预测效力,特别是关于药物抗性。结合多篇文章的结果(表2),Nagourney发现关于药物敏感性的阳性预测效力是81.8%,而关于药物抗性的阴性预测效力是83.3%(引自<http://www.rationaltherapeutics.com/physicians/content1.aspx?rid=35>及其参考书目(2010年5月7日访问))。

[0017] 表2:发表的支持ITRT预测能力的临床相关性列表

[0018]

血液肿瘤	N	TP	TN	FP	FN	Ref.
ALL	3	2	1	0	0	1
ALL	17	14	2	1	0	2
ALL	25	16	3	5	1	3
ALL	130	90	18	20	2	4
ALL	58	40	6	0	12	5
ALL	4	1	2	1	0	6
ALL	4	3	1	0	0	7
ALL	29	18	5	2	4	8
ALL	2	2	0	0	0	9
ALL/CLL	55	38	7	10	0	10
AML	4	0	1	2	1	2
AML	11	6	5	0	0	11
AML	21	11	8	2	0	6
AML	83	74	9	0	0	12
AML	27	6	13	0	8	13
AML	21	10	9	2	0	14
AML	33	11	8	4	10	15
AML/ALL/NHL	73	45	16	9	3	16

[0019]

AML	12	7	3	2	0	17
AML	14	9	1	2	2	3
AML	14	9	2	1	2	4
AML	17	11	4	1	1	7
AML	27	12	12	2	1	18
AML	34	20	11	2	1	19
CLL	80	12	48	18	2	2
CLL	34	26	6	2	0	20
CLL	1	1	0	0	0	6
CLL	15	11	3	0	1	21
CLL	15	9	4	1	1	8
CLL	3	2	1	0	0	9
CLL / ALL / NHL	226	102	76	41	7	22
CLL (母细胞性)	9	2	6	1	0	8
NHL	1	1	0	0	0	17
NHL	10	3	3	3	1	2
NHL	3	2	0	1	0	1
NHL	50	27	10	11	2	23
NHL	10	6	3	1	0	8
NHL	3	0	3	0	0	9
总计	1178	659	310	147	62	

[0020] N=病例数量;TP=真阳性;TN=真阴性;FP=假阳性;FN=假阴性;Ref.=参考目录(参见说明书末尾的文献);ALL=急性淋巴细胞白血病;CLL=慢性淋巴细胞白血病;AML=急性髓细胞白血病;NHL=非霍奇金淋巴瘤

[0021] 目前在英国利用大量慢性淋巴细胞白血病患者进行预期性的随机对照临床试验(UK LRF CLL4试验,Catovsky et al.,Lancet 2007,370:230-39)。研究使得作为患者对治疗响应相关的结果要素的ITRT的评估成为必需(Bosanquet et al:ASH Annual Meeting Abstracts Blood,2006108:94a:Abstract 303)。试验开始于1999年,包括777名以前未治疗过CLL的患者。用苯丁酸氮芥(Ch1)或氟达拉滨+/-环磷酰胺(Flu或FluCy)治疗患者。在这项研究中,使用TRAC测定来评估患者治疗之前对药物的离体敏感性。为了分析,根据患者的ITRT结果将他们分成三组:药物抗性的(DR)、药物敏感性的(DS)或药物中间的(DI)。表3总结了结果。

[0022] 表3患有慢性淋巴细胞白血病患者中的ITRT结果(DS、DI和DR)与对相同药物响应的
的相关性

[0023]

结果	Ch1	Flu	FluCy	
DS	85.1(94)	90.7(54)	95.7(70)	89.9(218)
DI	66.3(92)	79.2(53)	97.3(37)	76.4(182)
DR	37.6(24)	21.4(14)	25.0(4)	31.0(42)
总计	71.5(210)	77.7(121)	93.7(111)	78.7(442)

[0024] 结果表示为患者(括号内为患者数量)对各种药物(Ch1和Flu)和对药物组合(FluCy)响应的%

[0025] 如表3所示,ITRT结果与患者临床响应具有良好的相关性。在49%的DS患者中,他们大部分(90%)响应于化疗治疗,而在9.5%的DR患者中,仅31%响应于化疗。对于Ch1是DR的24名患者中,71%对于Flu是DS或DI,并且所有对于FluCy组合都显示为DS或DI。对于Flu是DR的14名患者中,仅36%对于FluCy组合是DS或DI。这些结果表明,利用ITRT结果可以指导更有效的治疗,得到更好的临床效果。

[0026] 考虑到个体化药物测试的惊人的治疗潜力,本领域内存在利用较短的孵育时间开发ITRT的迫切需要。使用辅助治疗选择的这种测定可能会提高响应速率、无进展的存活时间和受癌症折磨患者的总存活时间。优选地,所述测定将利用流式细胞术,以允许评估个体的肿瘤细胞死亡并减少测定孵育时间以在短时间内获得细胞毒性特征。同样期望的是ITRT将提供关于单独或联合用药时可能有效力的大量药物和药物浓度的更广泛的信息。

[0027] 发明概述

[0028] 本发明涉及为患者开发个体化药物测试。在总的实施方案中,本发明涉及利用离体测定来分析细胞对药物响应的组合物、方法和系统。在此描述的是分析全血样品、处理大量的变量并且快速完成分析的方法。

[0029] 在实施方案中,提供了用于分析细胞对药物响应性的方法,所述方法包括:从已离开患者的血液肿瘤获得组织样品;将所述组织样品分成至少35份等分试样;将所述至少35份等分试样各自与药物组合物结合;以及测量所述至少35份等分试样每一份中的至少一种细胞群的凋亡。在一个实施方案中,来自血液肿瘤的组织是选自外周血、骨髓、淋巴结和脾的组织。在另一实施方案中,所述样品为冷冻或冷藏样品,并且在将所述样品分成至少35份等分试样之前,将所述冷冻或冷藏样品解冻。在另一实施方案中,在将等分试样与药物组合物结合72小时以内完成测量。在另一实施方案中,在将等分试样与药物组合物结合48小时以内完成测量。在另一实施方案中,在将等分试样与药物组合物结合24小时以内完成测量。在另一实施方案中,使用流式细胞仪进行测量。在另一实施方案中,具有独特药物组合物的等分试样的数量为至少约96份。在另一实施方案中,至少两种药物组合物包含不同浓度的相同药物。在另一实施方案中,至少一种药物组合物包含多种药物。在另一实施方案中,至少一种药物组合物包含多种非细胞毒性药物。在另一实施方案中,至少一种药物组合物包含与已经给予患者的药物相同的或处于相同治疗类别中的非细胞毒性药物。在另一实施方案中,至少一种药物组合物结合有非细胞毒性药物和细胞毒性药物。在另一实施方案中,选择性测量特定细胞群的凋亡。在另一实施方案中,测量指征血液肿瘤的细胞群的凋亡。在另一实施方案中,血液肿瘤选自:慢性淋巴细胞白血病、成人急性淋巴细胞白血病、小儿急性淋巴细胞白血病、多发性骨髓瘤、骨髓增生异常综合征、非M3型急性髓细胞白血病、M3型急

性髓细胞白血病、非霍奇金淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤和慢性髓性白血病。在另一实施方案中,至少一种药物组合物包含氟达拉滨(fludarabine)或苯丁酸氮芥与舍曲林(sertraline)、帕罗西汀(paroxetine)或氟西汀(floxetine)的组合。在另一实施方案中,至少一种药物组合物包含氟达拉滨和环磷酰胺。在另一实施方案中,所述方法还包括:将来自血液肿瘤组织样品的细胞注射给小鼠;允许注射的细胞在小鼠内增殖足够的时间;以及从小鼠内移出增殖的细胞,其中所述注射、增殖和出在将等分试样与药物组合物结合之前进行。在另一实施方案中,所述方法还包括准备总结测量步骤结果的报告。在另一实施方案中,所述方法还包括将报告提供给患者医疗护理的参与方。在另一实施方案中,所述药物组合物包含选自以下的化合物:5-氮杂胞苷(5-Azacitidine)、阿仑单抗(alemtuzumab)、氨嘌呤(aminopterin)、氨茶非特(Amonafide)、安吡啶(Amsacrine)、CAT-8015、贝伐单抗(Bevacizumab)、ARR Y520、三氧化二砷、AS1413、全反式维甲酸(Atra)、AZD 6244、AZD1152、巴诺蒽醌(Banoxantrone)、依诺他宾(Behenoylara-C)、苯达莫司汀(Bendamustine)、博莱霉素(Bleomycin)、兰妥莫单抗(Blinatumomab)、硼替佐米(Bortezomib)、白消安(Busulfan)、卡铂(carboplatin)、CEP-701、苯丁酸氮芥、氯脱氧腺苷、克拉屈滨(Cladribine)、克罗拉滨(clofarabine)、CPX-351、环磷酰胺、环孢素(Cyclosporine)、阿糖胞苷(Cytarabine)、胞嘧啶阿拉伯糖苷、达沙替尼(Dasatinib)、柔红霉素(Daunorubicin)、地西他滨(decitabine)、去糖基化-蓖麻蛋白-A链-缀合的抗-CD19/抗-CD22免疫毒素、地塞米松(Dexamethasone)、多柔比星(Doxorubicine)、艾西拉滨(Elacytarabine)、恩替诺特(entinostat)、依帕珠单抗(epratuzumab)、Erwinase、依托泊甙(Etoposide)、依维莫司(everolimus)、甲磺酸依沙替康(Exatecan mesilate)、夫拉平度(flavopiridol)、氟达拉滨(fludarabine)、forodesine、吉西他滨(Gemcitabine)、吉妥单抗-奥唑米星(Gemtuzumab-ozogamicin)、高三尖杉酯碱(Homoharringtonine)、氢化可的松(Hydrocortisone)、羟基脲(Hydroxycarbamide)、伊达比星(Idarubicin)、异环磷酰胺(Ifosfamide)、伊马替尼(Imatinib)、干扰素 α -2a、碘I 131单克隆抗体BC8、异环磷酰胺(Iphosphamide)、异维甲酸(isotretinoin)、拉莫司汀(Laromustine)、L-门冬酰胺酶、来那度胺(Lenalidomide)、来他替尼(Lestaurtinib)、马磷酰胺(Maphosphamide)、美法仑(Melphalan)、巯基嘌呤(Mercaptopurine)、氨甲喋呤(Methotrexate)、甲基泼尼松龙(Methylprednisolone)、甲基泼尼松(Methylprednisone)、米唑妥林(Midostaurin)、米托蒽醌(Mitoxantrone)、奈拉滨(Nelarabine)、尼罗替尼(Nilotinib)、奥利默森(Oblimersen)、紫杉醇(Paclitaxel)、帕比司他(panobinostat)、培门冬酶(Pegasparase)、喷妥司汀(Pentostatin)、吡柔比星(Pirarubicin)、PKC412、泼尼松龙(Prednisolone)、泼尼松(Prednisone)、PSC-833、雷帕霉素(Rapamycin)、利妥昔单抗(Rituximab)、利巴韦林(Rivabirin)、沙帕他滨(Sapacitabine)、Dinaciclib、索拉非尼(Sorafenib)、索拉非尼(Sorafenib)、STA-9090、他克莫司(tacrolimus)、坦螺旋霉素(tanespimycin)、西罗莫司脂化物(temsirolimus)、替尼泊甙(Teniposide)、特拉罗考(Terameprocol)、沙利度胺(Thalidomide)、硫鸟嘌呤(Thioguanine)、噻替哌(Thiotepa)、替吡法尼(Tipifarnib)、拓扑替康(Topotecan)、曲丁磺酯(Treosulfan)、曲沙他滨(Troxacitabine)、长春花碱(Vinblastine)、长春新碱(Vincristine)、长春地辛(Vindesine)、长春瑞滨(Vinorelbine)、伏利拉辛(Voreloxin)、伏立诺他(Vorinostat)、依

托泊甙、唑喹达(Zosuquidar)。在另一实施方案中,所述药物组合物包含选自以下的化合物:水合氧化铝、劳拉西泮(Lorazepam)、阿米卡星(Amikacine)、美罗培南(Meropenem)、头孢吡肟(Cefepime)、万古霉素(Vancomycin)、替考拉宁(Teicoplanin)、恩丹西酮(Ondansetron)、地塞米松、两性霉素B(Amphotericin B,脂质体)、卡泊芬净(Caspofugin)、伊曲康唑(Itraconazole)、氟康唑(Fluconazole)、伏立康唑(Voriconazole)、甲氧苄啶(Trimetoprim)、磺胺甲噁唑(sulfamethoxazole)、G-CSF、雷尼替丁(Ranitidine)、拉布立酶(Rasburicase)、对乙酰氨基酚(Paracetamol)、安乃近(Metamizole)、氢氯酸吗啡(Morphinechloride)、奥美拉唑(Omeprazole)、帕罗西汀、氟西汀、舍曲林。

[0030] 在另一实施方案中,提供了用于分析肿瘤细胞对药物响应的方法,其包括:从患者采集的血液肿瘤获得组织样品;将所述组织样品分成至少35份等分试样;将所述至少35份等分试样与药物组合物结合,其中每一等分试样中的药物组合物与所有其它等分试样中的药物组合物在药物特性、浓度或它们的组合中的至少一种有所不同,并且所述药物组合物均包含至少一种非细胞毒性药物;孵育与药物组合物结合的等分试样;以及对于每一孵育的等分试样,分析至少一种类型的肿瘤细胞对药物组合物的响应性。在一个实施方案中,所述组织选自外周血、骨髓、淋巴结、和脾。在另一实施方案中,所述样品为冷冻或冷藏样品,并且在将所述样品分成至少35份等分试样之前将所述冷冻或冷藏样品解冻。在另一实施方案中,在将等分试样与药物组合物结合72小时以内完成分析。在另一实施方案中,在将等分试样与药物组合物结合48小时以内完成分析。在另一实施方案中,在将等分试样与药物组合物结合24小时以内完成分析。在另一实施方案中,所述方法还包括准备总结分析步骤结果的报告。在另一实施方案中,所述方法还包括将报告提供给患者医疗护理的参与方。在另一实施方案中,与药物组合物结合的等分试样数量为至少约96份。在另一实施方案中,使用流式细胞仪进行测量。在另一实施方案中,所述肿瘤细胞是血液肿瘤的指征。在另一实施方案中,所述血液肿瘤选自:慢性淋巴细胞白血病、成人急性淋巴细胞白血病、小儿急性淋巴细胞白血病、多发性骨髓瘤、骨髓增生异常综合征、非-M3型急性髓细胞白血病、M3型急性髓细胞白血病、非霍奇金淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤和慢性髓性白血病。在另一实施方案中,所述方法还包括:将来自组织样品的肿瘤细胞注射给鼠;允许注射的肿瘤细胞在小鼠内增殖足够的时间;以及从小鼠内移出增殖的肿瘤细胞,其中所述注射、增殖和移出在将等分试样与药物组合物结合之前进行。在另一实施方案中,所述药物组合物包含选自以下的化合物:5-氮杂胞苷、阿仑单抗、氨喋呤、氨茶非特、安吡啶、CAT-8015、贝伐单抗、ARR Y520、三氧化二砷、AS1413、全反式维甲酸、AZD 6244、AZD1152、巴诺萘醌、依诺他宾、苯达莫司汀、博莱霉素、兰妥莫单抗、硼替佐米、白消安、卡铂、CEP-701、苯丁酸氮芥、氯脱氧腺苷、克拉屈滨、克罗拉滨、CPX-351、环磷酰胺、环孢素、阿糖胞苷、胞嘧啶阿拉伯糖苷、达沙替尼、柔红霉素、地西他滨、去糖基化-蓖麻蛋白-A链-缀合的抗-CD19/抗-CD22免疫毒素、地塞米松、多柔比星、艾西拉滨、恩替诺特、依帕珠单抗、Erwinase、依托泊甙、依维莫司、甲磺酸依沙替康、夫拉平度、氟达拉滨、forodesine、吉西他滨、吉妥单抗-奥唑米星、高三尖杉酯碱、氢化可的松、羟基脲、伊达比星、异环磷酰胺、伊马替尼、干扰素 α -2a、碘I 131单克隆抗体BC8、异环磷酰胺、异维甲酸、拉莫司汀、L-门冬酰胺酶、来那度胺、来他替尼、马磷酰胺、美法仑、巯基嘌呤、氨甲喋呤、甲基泼尼松龙、甲基泼尼松、米诺妥林、米托蒽醌、奈拉滨、尼罗替尼、奥利默森、紫杉醇、帕比司他、培门冬酶、喷妥司汀、吡柔比星、PKC412、泼尼松龙、泼尼松、PSC-833、

雷帕霉素、利妥昔单抗、利巴韦林、沙帕他滨、Dinaciclib、索拉非尼、索拉非尼、STA-9090、他克莫司、坦螺旋霉素、西罗莫司脂化物、替尼泊忒、特拉罗考、沙利度胺、硫鸟嘌呤、噻替哌、替吡法尼、拓扑替康、曲丁磺酯、曲沙他滨、长春花碱、长春新碱、长春地辛、长春瑞滨、伏利拉辛、伏立诺他、依托泊忒、唑啶达。在进一步的实施方案中,所述药物组合物包括选自以下的化合物:水合氧化铝、劳拉西泮、阿米卡星、美罗培南、头孢吡肟、万古霉素、替考拉宁、恩丹西酮、地塞米松、两性霉素B(脂质体)、卡泊芬净、伊曲康唑、氟康唑、伏立康唑、甲氧苄啶、磺胺甲噁唑、G-CSF、雷尼替丁、拉布立酶、对乙酰氨基酚、安乃近、氢氯酸吗啡、奥美拉唑、帕罗西汀、氟西汀、舍曲林。

[0031] 在另一实施方案中,提供了用于促进患者中血液肿瘤治疗的方法,其包括:提供从患者获得的包含肿瘤细胞的组织样品;将所述样品的至少6个部分各自用不同的药物或药物组合孵育;分析所述样品的各部分以确定在所述部分中肿瘤细胞的凋亡程度;以及形成来自分析步骤结果的显示具有最大程度凋亡的至少一部分、药物或药物组合的打印或电子报告。在一个实施方案中,所述结果报告显示来自多种药物或药物组合的结果。在另一实施方案中,所述分析和孵育步骤还包括与其它部分的药物浓度不同的额外的部分。

[0032] 在另一实施方案中,提供了用于分析肿瘤细胞对潜在的药物治疗响应的装置,其包括多个腔室;以及所述多个腔室的每一腔室中的不同药物或药物组合,其中所述腔室均包括:至少一个包含多种药物的腔室;至少一个包含细胞毒性药物的腔室;和全部腔室中总共至少10种不同的药物。在一个实施方案中,所述装置还包括至少一个包括非细胞毒性药物的腔室。在另一个实施方案中,所述装置还包括至少一个包含细胞毒性药物和非细胞毒性药物的腔室。在另一实施方案中,所述装置还包括至少两个包含不同浓度的相同药物的腔室。在另一实施方案中,至少一个腔室包含氟达拉滨或苯丁酸氮芥与舍曲林、帕罗西汀或氟西汀的组合。在另一实施方案中,至少一个腔室包含氟达拉滨和环磷酰胺。在另一实施方案中,至少10种不同的药物组合物中的一种或多种选自:5-氮杂胞苷、阿仑单抗、氨喋呤、氨茶非特、安吡啶、CAT-8015、贝伐单抗、ARR Y520、三氧化二砷、AS1413、全反式维甲酸、AZD 6244、AZD1152、巴诺萘醌、依诺他宾、苯达莫司汀、博来霉素、兰妥莫单抗、硼替佐米、白消安、卡铂、CEP-701、苯丁酸氮芥、氯脱氧腺苷、克拉屈滨、克罗拉滨、CPX-351、环磷酰胺、环孢素、阿糖胞苷、胞嘧啶阿拉伯糖苷、达沙替尼、柔红霉素、地西他滨、去糖基化-蓖麻蛋白-A链-缀合的抗-CD19/抗-CD22免疫毒素、地塞米松、多柔比星、艾西拉滨、恩替诺特、依帕珠单抗、Erwinase、依托泊忒、依维莫司、甲磺酸依沙替康、夫拉平度、氟达拉滨、forodesine、吉西他滨、吉妥单抗-奥唑米星、高三尖杉酯碱、氢化可的松、羟基脲、伊达比星、异环磷酰胺、伊马替尼、干扰素 α -2a、碘I 131单克隆抗体BC8、异环磷酰胺、异维甲酸、拉莫司汀、L-门冬酰胺酶、来那度胺、来他替尼、马磷酰胺、美法仑、巯基嘌呤、氨甲喋呤、甲基泼尼松龙、甲基泼尼松、米唑妥林、米托蒽醌、奈拉滨、尼罗替尼、奥利默森、紫杉醇、帕比司他、培门冬酶、喷妥司汀、吡柔比星、PKC412、泼尼松龙、泼尼松、PSC-833、雷帕霉素、利妥昔单抗、利巴韦林、沙帕他滨、Dinaciclib、索拉非尼、索拉非尼、STA-9090、他克莫司、坦螺旋霉素、西罗莫司脂化物、替尼泊忒、特拉罗考、沙利度胺、硫鸟嘌呤、噻替哌、替吡法尼、拓扑替康、曲丁磺酯、曲沙他滨、长春花碱、长春新碱、长春地辛、长春瑞滨、伏利拉辛、伏立诺他、依托泊忒、唑啶达。在另一实施方案中,至少10种不同的药物组合物中的一种或多种选自:水合氧化铝、劳拉西泮、阿米卡星、美罗培南、头孢吡肟、万古霉素、替考拉宁、恩丹西酮、地塞米松、两性霉素B

(脂质体)、卡泊芬净、伊曲康唑、氟康唑、伏立康唑、甲氧苄啶、磺胺甲噁唑、G-CSF、雷尼替丁、拉布立酶、对乙酰氨基酚、安乃近、氢氯酸吗啡、奥美拉唑、帕罗西汀、氟西汀、舍曲林。在另一实施方案中,所述肿瘤细胞是多发性骨髓瘤(MM)的指征,并且其中至少一个腔室包含选自以下的至少一种药物组合:伊达比星+阿糖胞苷+VP-16、柔红霉素+阿糖胞苷、伊达比星+阿糖胞苷、脂质体柔红霉素+阿糖胞苷、米托蒽醌+阿糖胞苷+VP-16、全反式维甲酸+伊达比星、阿糖胞苷+米托蒽醌+全反式维甲酸。在另一实施方案中,所述肿瘤细胞是慢性淋巴细胞白血病(CLL)的指征,并且其中至少一个腔室包含选自以下的至少一种药物组合:环磷酰胺+多柔比星(Doxorubicin)+长春新碱(Vincristin)+泼尼松龙、环磷酰胺+多柔比星+泼尼松龙、氟达拉滨+环磷酰胺+利妥昔单抗、喷妥司汀+环磷酰胺+利妥昔单抗、氟达拉滨+环磷酰胺+奥法木单抗(Ofatumumab)、喷妥司汀+环磷酰胺+奥法木单抗、氟达拉滨+环磷酰胺+阿托珠单抗(Afutuzumab)、喷妥司汀+环磷酰胺+阿托珠单抗。在另一实施方案中,所述肿瘤细胞是急性淋巴细胞白血病(ALL)的指征,并且其中至少一个腔室包含选自以下的至少一种药物组合:长春新碱+柔红霉素+泼尼松(Prednisona)、长春新碱+泼尼松+米托蒽醌+阿糖胞苷、氨甲喋呤+阿糖胞苷+氢化可的松、地塞米松+长春新碱+氨甲喋呤+阿糖胞苷+L-门冬酰胺酶+6-巯基嘌呤(6-Mercaptopurina)、环磷酰胺+多柔比星+长春新碱+地塞米松+柔红霉素+环磷酰胺+L-门冬酰胺酶、长春新碱+泼尼松、氨甲喋呤+依托泊甙+阿糖胞苷+硫鸟嘌呤、氨甲喋呤+6-巯基嘌呤、长春新碱+柔红霉素+L-门冬酰胺酶+环磷酰胺+泼尼松、替尼泊甙+阿糖胞苷、长春新碱+柔红霉素+环磷酰胺+L-门冬酰胺酶+地塞米松、长春新碱+L-门冬酰胺酶、长春新碱+柔红霉素+阿糖胞苷+L-门冬酰胺酶+伊马替尼+泼尼松、米托蒽醌+阿糖胞苷+伊马替尼、氨甲喋呤+伊马替尼+6-巯基嘌呤、替尼泊甙+阿糖胞苷+伊马替尼、长春新碱+柔红霉素+环磷酰胺+L-门冬酰胺酶+地塞米松+伊马替尼。在另一实施方案中,所述肿瘤细胞是非霍奇金淋巴瘤(NHL)的指征,并且其中至少一个腔室包含选自以下的至少一种药物组合:环磷酰胺+多柔比星+长春新碱+泼尼松、环磷酰胺+多柔比星+长春新碱+泼尼松+利妥昔单抗、环磷酰胺+多柔比星+长春地辛+泼尼松、环磷酰胺+多柔比星+长春地辛+泼尼松+干扰素- α 、环磷酰胺+长春新碱+泼尼松、环磷酰胺+长春新碱+泼尼松+利妥昔单抗、米托蒽醌+苯丁酸氮芥+泼尼松龙、米托蒽醌+苯丁酸氮芥+泼尼松龙+利妥昔单抗、氟达拉滨+利妥昔单抗、环磷酰胺+多柔比星+长春地辛(Vindesina)+泼尼松+博来霉素、氨甲喋呤+依托泊甙+异环磷酰胺+阿糖胞苷、氨甲喋呤+长春新碱+泼尼松、多柔比星+环磷酰胺+泼尼松+、长春新碱+博来霉素+泼尼松+、地塞米松+阿糖胞苷+顺铂+、氟达拉滨+环磷酰胺+米托蒽醌、环磷酰胺+多柔比星+长春新碱+地塞米松、氨甲喋呤+氢化可的松+阿糖胞苷+地塞米松+环磷酰胺、苯达莫司汀+米托蒽醌、异环磷酰胺+卡铂+依托泊甙+利妥昔单抗、依托泊甙+泼尼松+长春新碱+环磷酰胺+多柔比星+利妥昔单抗。在另一实施方案中,所述肿瘤细胞是急性髓性白血病(AML)的指征,并且其中至少一个腔室包含选自以下的至少一种药物组合:伊达比星+阿糖胞苷+VP-16、柔红霉素+阿糖胞苷、伊达比星+阿糖胞苷、脂质体柔红霉素+阿糖胞苷、米托蒽醌+阿糖胞苷+VP-16、全反式维甲酸+伊达比星、阿糖胞苷+米托蒽醌+全反式维甲酸、柔红霉素+阿糖胞苷+硫鸟嘌呤、柔红霉素+阿糖胞苷+VP-16、氟达拉滨+伊达比星+阿糖胞苷+G-CSF、氟达拉滨+阿糖胞苷+G-CSF、高剂量阿糖胞苷+VP-16+柔红霉素、吉妥单抗奥唑米星+伊达比星+阿糖胞苷、吉妥单抗奥唑米星+阿糖胞苷、克罗拉滨+阿糖胞苷、克罗拉滨+阿糖胞苷+伊达比星、安吡啶+阿糖胞苷+VP-16、米托蒽醌+VP-16、伊达比星+阿糖胞苷+

FLT3抑制剂、阿糖胞苷+FLT3抑制剂、阿糖胞苷+极光激酶抑制剂、伊达比星+阿糖胞苷+帕比司他、氟达拉滨+伊达比星+阿糖胞苷+G-CSF+吉妥单抗、克拉屈滨+伊达比星+阿糖胞苷、地西他滨+丙戊酸、Genasense+氟达拉滨+阿糖胞苷、Genasense+柔红霉素+阿糖胞苷、Genasense+阿糖胞苷、Genasense+吉妥单抗奥唑米星、PSC833+柔红霉素+阿糖胞苷、PSC833+伊达比星+阿糖胞苷、PSC833+柔红霉素+阿糖胞苷+VP-16、硼替佐米+伊达比星+阿糖胞苷。

[0033] 在另一实施方案中,提供了用于治疗慢性淋巴细胞白血病(CLL)的组合物,其包含氟达拉滨或氟达拉滨的药学上可接受的盐和舍曲林或舍曲林的药学上可接受的盐。

[0034] 一实施方案提供了用于分析细胞对药物响应性的方法,其包括:从已离开患者的血液肿瘤获得组织样品;将所述组织样品分成至少35份等分试样;将所述至少35份等分试样各自与药物组合物结合;以及测量所述至少35份等分试样每一份中的至少一种细胞群的凋亡。

[0035] 另一实施方案提供了用于分析肿瘤组织对药物响应的方法,其包括:从患者采集的血液肿瘤获得组织样品,其中所述组织样品包含肿瘤细胞;将所述组织样品分成至少35份等分试样;将所述至少35份等分试样与药物组合物结合,其中每一等分试样中的药物组合物与所有其它等分试样中的药物组合物在药物特性、浓度或它们的组合中的至少一种有所不同,并且所述药物组合物均包含至少一种非细胞毒性药物;将与药物组合物结合的等分试样孵育;以及对于每一孵育的等分试样,分析至少一种类型的肿瘤细胞对药物组合物的响应性。

[0036] 来自血液肿瘤的组织可以不同。例如,所述组织可以选自外周血、骨髓、淋巴结和脾。为了简化,在此针对血液样品进行描述,但是本领域技术人员应当理解的是,相同原理可应用于来自包含肿瘤细胞的参与血液肿瘤的组织任何样品。

[0037] 在一个实施方案中,用于分析细胞对药物响应性的方法包括:在第一时间点获得已离开患者的血液样品;将所述血液样品的单独等分试样与几种药物组合物结合;以及分析各等分试样中至少一种细胞群的凋亡。在一些实施方案中,在一方将血液样品发送给另一方用于分析时获得样品。在优选的实施方案中,用于分析肿瘤血液细胞对细胞毒性药物、非细胞毒性药物和它们的组合物响应的方法,包括以下步骤:a)在第一时间点获得已离开患者的血液样品;b)将所述样品分成至少5、10、15、20、35、50或100份等分试样;c)将各等分试样与各自的药物组合物结合;d)将所述等分试样与药物组合物一起孵育;e)分析所述等分试样中的至少一种肿瘤血液细胞类型对该等分试样中的药物组合物的响应性;以及f)从获得患者血液样品的时间点起48小时之内完成该方法。在另一实施方案中,与各等分试样结合的药物组合物在药物特性、浓度或其组合中的至少一种有所不同。

[0038] 对于诸如在临床上起作用的个体化药物测试的方法而言,所述方法优选在短时间内完成。特别地,在短时间内完成所述方法的时间是相对于孵育样品的时间而言的。在一实施方案中,从患者取得样品的时间起约120小时之内完成分析。在另一实施方案中,从患者取得样品的时间起约96小时之内完成分析。在另一实施方案中,从患者取得样品的时间起约72小时之内完成分析。在进一步的实施方案中,从患者取得样品时间起约48小时之内完成分析。在另一实施方案中,从患者取得样品的时间起约24小时之内完成分析。然而,例如,当样品是冷冻的或当细胞被注射给小鼠以增殖时的其它方法,可能会延长完成分析的时间。在一实施方案中,在将等分试样与药物组合物结合120小时之内完成测量。在另一实施

方案中,在将等分试样与药物组合物结合96小时之内完成测量。在另一实施方案中,在将等分试样与药物组合物结合72小时之内完成测量。在另一实施方案中,在将等分试样与药物组合物结合48小时之内完成测量。在另一实施方案中,在将等分试样与药物组合物结合24小时之内完成测量。

[0039] 从患者获得细胞样品的方法是本领域内所熟知的。在一个实施方案中,所述细胞样品从全血获得。在另一实施方案中,所述细胞样品是全血。在另一实施方案中,所述细胞样品是外周血全血。在另一实施方案中,所述细胞样品从骨髓获得。在另一实施方案中,所述细胞样品从淋巴结获得。在另一实施方案中,所述细胞样品从脾获得。在另一实施方案中,所述细胞样品从参与血液恶性肿瘤的任何其它组织获得。可以在获得细胞样品之后马上进行分析,或者可以用化学药品处理细胞样品以避免凝固并在随后的时间点进行分析。在一个实施方案中,用肝素处理血液样品以避免凝固。在另一实施方案中,用肝素处理骨髓样品以避免凝固。在另一实施方案中,用EDTA处理血液或骨髓样品以避免凝固。在另一实施方案中,用抗凝剂处理血液或骨髓样品以避免凝固,所述抗凝剂包括但不限于凝血酶抑制剂。优选的是,使用未进行纯化或分离步骤的样品,以便细胞环境与体内环境更相似。

[0040] 可以从数千种药物组合物取样。在此描述的方法能够以等分试样的形式分析大量的不同浓度的药物组合物组合,从而评估用于个体化药物方案的大量变量。在一个实施方案中,所述方法分析约5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、100、200、500或更多份等分试样(任选每种药物组合物),或者由前述任意两个值所限定的范围。在另一实施方案中,所述方法分析约96或更多份等分试样。此外,药物组合物的数量可以随着等分试样的数量而变化。在一个实施方案中,等分试样的数量和不同药物组合物的数量各自都多于约5、10、15、20、25、30、35或40份(种),或者由前述任意两个值所限定的范围。在另一实施方案中,等分试样的数量和不同药物组合物的数量各自都多于约50份(种)。在另一实施方案中,等分试样的数量和不同药物组合物的数量各自都多于约96份(种)。

[0041] 本发明人意外发现,相当数量的非细胞毒性化合物可以诱导细胞的凋亡。虽然已知在少数情况下非细胞毒性药物能够在肿瘤细胞中诱导凋亡,但是这一一直被认为是罕见的事件。本发明人发现相当数量比例的非细胞毒性药物能在来自特定血液肿瘤的恶性细胞中诱导凋亡。此外,在此描述的方法意外地显示某些非细胞毒性化合物可以增强细胞毒性化合物诱导凋亡的能力。因此,不同类型的多种药物的多药疗法组合可能具有有益的治疗效果。在一个实施方案中,在此描述的方法分析细胞对包含一种或多种细胞毒性化合物的药物组合物的响应。在另一实施方案中,在此描述的方法分析细胞对包含一种或多种非细胞毒性化合物的药物组合物的响应。在另一实施方案中,在此描述的方法分析细胞对包含一种或多种细胞毒性化合物和一种或多种非细胞毒性化合物的药物组合物的响应。在另一实施方案中,在此描述的方法分析一种或多种这样的药物组合物,该药物组合物包含一种或多种与已经给予患者的药物相同的或处于相同的治疗类别中的非细胞毒性药物。另一实施方案中,在此描述的方法分析一种或多种这样的药物组合物,该药物组合物包含一种或多种与已经给予患者的药物不在同一治疗类别中的非细胞毒性药物。在一个实施方案中,所述药物组合物包含几种具有不同药物浓度的相同药物的组合物。在另一实施方案中,所述药物组合物包含几种不同的药物混合物。在另一实施方案中,所述药物组合物均包含至少5种不同的药物。

[0042] 在给予患者之前,为了细胞毒性效力,可以优化潜在的药物方案。由在此描述的方法对各种药物组合形成的剂量响应曲线显示较低剂量的高毒性药物可以达到最佳效力,这表明这些药物之间有协同作用。出乎意料地是,一些两种细胞毒性药物的组合比单独的一种药物更低效,这表明这些细胞毒性药物在某些组合中可能表现为细胞保护药物(即负协同)。在一实施方案中,在此描述的方法利用最佳效力为患者选择药物浓度。在另一实施方案中,在此描述的方法利用EC₉₀或EC₅₀为患者选择药物浓度。

[0043] 除了各自的药效外,可以利用药物相互作用的详细分析,包括联合指数(Combination Index)和剂量减少指数(Dose Reduction Index),来鉴别有效的多药疗法方案。可以用基于Chou和Talalay所描述的中效(MedianEffect)方法(Chou et al., Adv Enzyme Regul 1984, 22:27-55)的精确代数估算法(即蒙特卡罗模拟, Monte Carlo simulations)来计算两种指数的精确估计值。联合指数(CI)是药物在累加效应方面相互作用程度的定量尺度,其中CI<1指示协同作用,CI~1指示累加效应,CI>1指示拮抗作用。剂量减少指数(DRI)是在给定效应水平时,与每种药物的单独剂量相比,协同组合中的各药物的剂量可以减少多少的尺度。最近,对于估计药物相互作用指数,已建议用MixLow方法(Boik et al., BMC Pharmacol 2008, 8:13; Boik, Stat Med 2008, 27(7):1040-61)替代Chou和Talalay的中效方法(Chou et al., Adv Enzyme Regul 1984, 22:27-55)。MixLow方法的一个优点在于用于估计浓度-响应曲线参数的非线性混合效应模型可以提供比中效方法中所用的对数线性化和最小二乘分析更精确的参数估计值。本领域技术人员将认识到,可以使用这些计算和相关方法分析在此所描述的用于混合药物治疗的药物相互作用。在一些实施方案中,评估多于一种药物的组合的增强作用、协同作用或剂量减少。在一些实施方案中,选择已确定证明药物相互作用的组合用于治疗。

[0044] 可从患者提取的样品量的受限限制了个体化药物测试可以测试的药物组合物的数量。然而,最近的发展已提供了通过变成患者细胞连续来源的多发性小鼠,可以增殖患有血液恶性肿瘤的患者的原代细胞的小鼠模型(Pearson et al., Curr Top Microbiol Immunol. 2008, 324:25-51; Ito et al., Curr Top Microbiol Immunol. 2008, 324:53-76)。这些模型可以使得离体取样比最近提取的患者样品经历更多的药物组合物尤其是药物组合。可预期的是,这些模型可以用于在此描述的方法中。例如,可以从诸如小鼠模型的动物模型取得样品。特别地,这些模型可能能够探索给予患者的伴随或辅佐药物的效力,以减轻化疗的作用。这些模型还可能能够探索已批准的非细胞毒性安全药物的潜在效力,所述药物将来可能添加到用于个体患者的治疗,以提高治疗效力的概率。此外,利用直接来自患者样品或由鼠模型增殖的人患者细胞离体测试鉴别的药物组合物的任何药物联合用药的效力可以在鼠模型体内测试。

[0045] 作为个体化药物测试,期望的是向患者和护理者提供细胞对药物和药物组合响应的概要。在一个实施方案中,所述方法包括准备总结分析步骤结果的报告。在另一实施方案中,所述方法包括将报告提供给患者。在另一实施方案中,所述方法包括将报告提供给负责患者医疗护理的一方。在另一实施方案中,所述方法包括将报告提供给负责解释分析步骤的一方。

[0046] 本公开还包括例如可用于治疗AML、ALL、CLL和NHL的特定药物组合,以及那些药物组合在治疗淋巴增殖性疾病中的用途。

[0047] 一实施方案提供了用于分析肿瘤细胞对潜在的药物方案响应的装置,其包括多个腔室和在多个腔室的每一腔室中的不同药物或药物组合。在一实施方案中,所述腔室均包括至少一个包含多种药物的腔室,至少一个包含细胞毒性药物的腔室,和全部腔室中总共至少10种不同的药物。在一实施方案中,至少一个腔室包含非细胞毒性药物。在一实施方案中,至少一个腔室包含细胞毒性药物和非细胞毒性药物。在一实施方案中,至少两个腔室包含不同浓度的相同药物。

[0048] 在此描述的任何特征或特征组合均包括在本发明的范围内,倘若任何这种组合中所包括的特征并非相互不一致,从上下文、本说明书和本领域技术人员知识来看,这也将是显而易见的。本发明的其它优点和方面将在以下详细地描述中显现。

[0049] 附图简要说明

[0050] 图1描述了利用荧光素标记的Annexin V进行凋亡细胞上磷脂酰丝氨酸表达的流式细胞术检测。

[0051] 图2描述了显示BCR/ABL基因重排的前体B-ALL成人病例[t(9;22)阳性],以及利用定量流式细胞术在CD 19阳性细胞中检测白血病细胞和正常细胞。

[0052] 图3显示用于离体评估来自慢性淋巴细胞白血病(CLL)患者样品的外周血(PB)或骨髓(BM)的方案。

[0053] 图4描述了9名不同的患者对目前已批准用于CLL治疗的几种药物的离体响应。

[0054] 图5描述了优化用于个体患者治疗的个体化药物测试所期望的药物组合物的数量。

[0055] 图6描述了以与已批准用于CLL治疗的细胞毒性药物(即氟达拉滨、苯丁酸氮芥和米托蒽醌)相似的效力诱导恶性CLL样品凋亡的几种非细胞毒性药物(即帕罗西汀、氟西汀、舍曲林、胍那苄(guanabenz)和阿司咪唑(astemizole))。

[0056] 图7描述了帕罗西汀在来自CLL患者的全血样品中的剂量-响应曲线,并且比较了帕罗西汀对白血病细胞、T细胞和NK细胞的凋亡效应。

[0057] 图8描述了舍曲林和目前CLL治疗所用的三种药物(即氟达拉滨、苯丁酸氮芥和米托蒽醌)在CLL患者全血样品中诱导凋亡的动力学差异。

[0058] 图9描述了与帕罗西汀在相同药理学分类中的化合物(即SSRI)在诱导CLL样品凋亡中的效力差异。

[0059] 图10描述了击中(hit)频率,其表示为总共23份患者样品中非细胞毒性药物以与已批准的细胞毒性药物相同的效力消除白血病CLL细胞的患者样品数量,并且显示大部分非细胞毒性药物在极少数患者中有效。

[0060] 图11描述了非细胞毒性药物舍曲林增强已批准的细胞毒性药物苯丁酸氮芥的效力。

[0061] 图12描述了由细胞毒性药物长春新碱、米托蒽醌和环磷酰胺(在CLL治疗中使用)诱导的Annexin V阳性细胞的百分比,以及由非细胞毒性药物奥美拉唑和无环鸟苷(acyclovir)(常常开方治疗由化疗引起的副作用)诱导的Annexin V阳性细胞的百分比。

[0062] 图13A-C显示用于患有CLL的患者的个体化药物测试的96-孔板设计。

[0063] 图14A-F显示用于患有多发性骨髓瘤的患者的个体化药物测试的96-孔板设计。

[0064] 图15显示用于患有急性淋巴细胞白血病(ALL)的患者的个体化药物测试的96-孔

板设计,包括在PETHEMA治疗方案中给予的细胞毒性和非细胞毒性药物。MTX:氨甲喋呤;6MP:6-巯基嘌呤;ARA-C:阿糖胞苷;DNR:柔红霉素;ADRIA:阿霉素(adriamycin);M:米托蒽醌;VP-16:依托泊甙;VM-26:替尼泊甙;CF:环磷酰胺;IFOS:异环磷酰胺;V:长春新碱;VIND:长春地辛;L-ASA:门冬酰胺酶;EVIAT:伊马替尼;R:利妥昔单抗;P:泼尼松;HC:氢化可的松;DXM:地塞米松;Foli:亚叶酸(leucovorin);美司钠:Mesna;Om:奥美拉唑;O:恩丹西酮;Alop:别嘌醇(allopurinol);GCSF:非格司亭(filgrastim)。

[0065] 图16显示用于患有骨髓增生异常综合征的患者的个体化药物测试的96-孔板设计,包括在PETHEMA治疗方案中给予的细胞毒性和非细胞毒性药物。

[0066] 图17显示用于患有急性髓细胞白血病(非M3型)的患者的个体化药物测试的96-孔板设计,包括在PETHEMA治疗方案中给予的细胞毒性和非细胞毒性药物。Dauno:柔红霉素;Ida:伊达比星;ARA-C:阿糖胞苷;Mitox:米托蒽醌;VP16:依托泊甙;Fluda:氟达拉滨;GCSF:非格司亭;Ondans:恩丹西酮;Cotri:复方磺胺甲噁唑;AcF:叶酸;Alop:别嘌醇;Om:奥美拉唑;Carbop:卡铂;Dauno lipo:脂质体柔红霉素(Daunoxome®);AMSA:安吡啶;G0:吉妥单抗奥唑米星。

[0067] 图18显示用于患有M3型急性髓细胞白血病(早幼粒细胞的)的患者的个体化药物测试的96-孔板设计,包括在PETHEMA治疗方案中给予的细胞毒性和非细胞毒性药物。ATRA(全反式维甲酸):维甲酸;Ida:伊达比星;Mitox:米托蒽醌;ARA-C:阿糖胞苷;6-MP:6-巯基嘌呤;MTX:氨甲喋呤;Ondans:恩丹西酮;Alop:别嘌醇;Om:奥美拉唑;Dexa:地塞米松;VP-16:依托泊甙;Fluda:氟达拉滨;Carbop:卡铂;Dauno lipo:脂质体柔红霉素;Dauno:柔红霉素;Cotri:复方磺胺甲噁唑;FAc:叶酸。

[0068] 图19描述了舍曲林对TOM-1和MOLT-4细胞系中细胞增殖抑制的效应。

[0069] 图20描述了在24小时时舍曲林对TOM-1和MOLT-4细胞系中凋亡诱导的效应。

[0070] 图21描述了在24小时时舍曲林对TOM-1和MOLT-4细胞系中活性半胱氨酸蛋白酶-3的凋亡诱导效应。

[0071] 图22描述了单独的药物(即利妥昔单抗、氟达拉滨、米托蒽醌和环磷酰胺(马磷酰胺)),以及用这些单独药物的组合的大部分抗性和敏感性多药疗法在CLL样品中的离体效力。

[0072] 图23描述了图22相同试验的结果,用5-点响应曲线表征氟达拉滨、环磷酰胺(马磷酰胺)及其组合的离体效力。

[0073] 图24描述了图24相同试验的结果,用5-点响应曲线表征氟达拉滨、环磷酰胺(马磷酰胺)、米托蒽醌及其组合的离体效力。

[0074] 图25描述了图24相同试验的结果,用5-点响应曲线表征氟达拉滨、环磷酰胺(马磷酰胺)、利妥昔单抗及其组合的离体效力。

[0075] 图26描述了单独的氟达拉滨和马磷酰胺以及氟达拉滨和马磷酰胺的组合以五种不同的浓度在两名患者P2.0144(左)和P2.0149(右)的临床方案中的效应。

[0076] 图27描述了使用Chou和Talalay方法(Chou et al.,Eur J Biochem 1981,115(1):207-16;Chou et al.,Adv Enzyme Regul 1984,22:27-55),对氟达拉滨和马磷酰胺(环磷酰胺)在来自图26的CLL患者P2.0149中所建立的协同作用进行的计算。

[0077] 图28描述了孵育时间(药物接触时间(0.5、4和8小时)和总体孵育时间(24或48小

时))对氟达拉滨和舍曲林诱导CLL样品中恶性细胞的凋亡效力的影响。

[0078] 图29描述了2种药物组合的矩阵。

[0079] 图30描述了3种药物组合的矩阵。

[0080] 图31描述了4种药物组合的矩阵。

[0081] 图32描述了利用细胞示踪染料的3色复合的外周血白细胞。

[0082] 图33描述了用CLL样品复孔中的荧光色素染料来区分恶性细胞并用Annexin V检测凋亡。

[0083] 优选实施方案详述

[0084] 本发明提供了利用筛选平台,用于评估多种药物组合的离体凋亡效力的组合物、系统和方法。具体地,本发明提供了进行基于细胞的筛选的方法,所述方法通过流式细胞术将自动样品制备和自动评估相结合,适合快速的数据获取、分析和报告结果。流式细胞术方法的使用允许评估个体细胞的死亡,其单细胞分辨率可允许缩短离体检测的孵育时间,由此提供细胞毒性特征分析中的更快周转。所述基于细胞的筛选平台还可以用于在24至72小时内从样品提取物完成所有筛选和验证试验。该时间安排使得在血液肿瘤上进行诊断之后和开始治疗之前能够将结果报告给医生。因此,在此描述的方法可以用于个体化医疗和鉴别已批准药物潜在的新的适应症。

[0085] 为了可以更容易地理解本发明,首先定义某些术语。其它定义在详细说明中列出。

[0086] 本文所用的“EC₅₀”和“EC₉₀”分别指引起最大凋亡的50%和90%所需的药物浓度。

[0087] 本文所用的“离体”是指体外的原代人类患者细胞,其中所述细胞可以是最近提取的、为保存其状态而冷藏或冷冻的。在一些实施方案中,将这些细胞解冻用于体外评估药物效应。

[0088] 本文所用的“离体治疗指数”是指肿瘤细胞死亡与健康细胞死亡之间的比率。

[0089] 本文所用的“Exvitech”是指并入自动样品制备、用于自动输入流式细胞仪的EPS系统和自动生物信息学分析的综合平台。

[0090] 本文所用的“血液肿瘤”,又被称为“血液恶性肿瘤”,是指根据世界卫生组织分类定义的一组疾病(Swerdlow SH,Campo E,Harris NL,Jaffe ES,Pileri S,Stein H,Thiele J,Vardiman JW(Eds):WHO Classification of Tumors of Hematopoietic and Lymphoid Tissues(造血和淋巴组织肿瘤的WHO分类).International Agent for Research of Cancer(IARC),Lyon.4th Edition.Lyon 2008)。

[0091] 本文所用的个体化肿瘤响应测试(ITRT)是指描述抗癌治疗对从癌症患者新鲜移除的整个活肿瘤细胞的影响的方法。

[0092] 本文所用的“多药疗法”是指用多种药物治疗患者。

[0093] 本文所用的“非细胞毒性”化合物或药物是指并未被机构批准为细胞毒性试剂、化疗试剂或抗肿瘤试剂的化合物或药物。

[0094] 本文所用的“等分试样”是指可处于单独的容器或孔内或可以形成于试管或其它介质中的样品或样品的一部分,其中即使是在一致的样品中仍可以保持药物含量、药物特性或药物浓度的差异,无论样品是连续的,还是由气体或不溶合的液体(如油)分离的。

[0095] 本文所用的“药物组合物”是指给予等分试样用于分析或给予患者用于治疗的单一药物及其各种浓度,或者药物组合及其各种浓度。

[0096] 本文所用的“药学上可接受的盐”是指不会对其给予的有机体引起明显刺激并且不会去掉化合物生物活性和特性的化合物制剂。可以通过常规实验获得药物的盐。

[0097] 本文所用的“孔”或“腔室”是指具有保持足以进行在此描述的方法的样品的容量的任何结构。本领域技术人员应当理解的是，“孔”或“腔室”可以包括，例如平板上的凹进处，由表面张力在载玻片上形成的斑点，或者微流体装置的区域。

[0098] 现在将详细地参考本发明目前的优选实施方案，其实例提供于附图中。在可能的情况下，附图和说明书中所涉及的相同或相似部分使用相同或类似的附图标记。应注意的是，附图是简化形式，并且不是精确的比例。虽然在此的公开涉及某些示例性实施方案，但是应当理解的是这些实施方案仅以实例的方式而不是限制的方式提出。虽然讨论示例性实施方案，但是以下的详细描述意图解释为涵盖可落入由所附权利要求所限定的本发明的实质和范围内的实施方案的变化体、替代物和等同物。所公开的方法可以与本领域内常规的各种医学程序联合使用。

[0099] 所公开的方法具有优于在此描述的现有技术的几个优点。一个优点在于所述方法可以分析细胞对大量变量(包括多种药物组合物和不同的孵育时间)的响应。另一个优点是所述方法分析细胞对药物响应的速度。另一个优点是分析全血，并因而更严密地模拟患者的体内环境的能力。此外，本方法能够对大量药物和药物组合物形成剂量响应曲线。总的来说，这些方法提供开发多药疗法方案来治疗患者的优点。在具体的实施方案中，所述方法促进开发多药疗法方案，以便治疗患有血液病症的患者。

[0100] 所公开的方法适用于各种类型的仪器，包括用于分析细胞对药物组合物的响应性的一种或多种样品制备自动机和一种或多种流式细胞仪。流式细胞术允许以远远超过本领域内任何其它单细胞分析技术的速度进行单细胞分析。这使得能够比使用其它备选技术更快地对统计学上显著数量的细胞进行分析。在一个实施方案中，将流式细胞术用于分析细胞对药物组合物的响应性。在一个实施方案中，所述分析在获得样品时间起约96小时内完成。在另一实施方案中，所述分析在获得样品时间起约72小时内完成。在另一实施方案中，所述分析在获得样品时间起约48小时内完成。在另一实施方案中，所述分析在获得样品时间起约24小时内完成。用于在此所描述方法的流式细胞仪的一个实例在美国专利号7,459,126中提供，通过引用将其全文内容并入本文，并且为了所有目的，包括但不限于描述流式细胞仪的目的。

[0101] 样品制备自动机和流式细胞仪可以彼此结合，或者样品制备自动机和流式细胞仪可以不用彼此结合。在一个实施方案中，使用流式细胞仪而未使用样品制备自动机。在具体的实施方案中，使用CYAN™细胞仪(Beckman Coulter, Fullerton, CA)而未使用样品制备自动机。本领域内已知有许多不同类型的样品制备自动机和流体处理器。在一个实施方案中，流式细胞仪与本领域内已知的任何合适的样品制备自动机或流体处理器一起使用。在另一实施方案中，CYAN™细胞仪(Beckman Coulter, Fullerton, CA)与被称为EPS的小型流体处理器相结合，以使样品被自动递送到细胞仪。在具体的实施方案中，所述EPS为Tecan360流体处理器(Tecan, Mannedorf, Switzerland)。在另一实施方案中，所述EPS与注射泵和接口切换阀一起定制，使得各孔的内容物通过固定端抽吸，传输到容纳环(holding loop)，并注入细胞仪。在另一实施方案中，样品制备和化合物装载可以用BIOMEK®3000流体处理器(Beckman Coulter, Fullerton, CA)来完成。可以使用任何数量孔的平板，并且特别有用

的孔板是96孔板。还可以考虑其它各种平板尺寸,包括那些具有24、48、384、1536、3456或9600孔的平板。所述样品制备单元可以装入流动隔间,该流动隔间允许操作时保持化合物和样品无菌。当测定设置完成时,可以将平板装入样品分析系统。

[0102] CYANTM细胞仪(Beckman Coulter, Fullerton, CA)是3个激光器,9个检测器的仪器,本领域内已知的方法已发展成能充分利用该现代流式细胞仪的多激光器以及因而是多参数测量能力。在一个实施方案中,将单激光流式细胞仪用于分析步骤。在另一实施方案中,将多激光流式细胞仪用于分析步骤。大量荧光染料和缀合化学的发展和优化允许将各种配体,如免疫球蛋白和小分子,连接于荧光染料。具有放射线范围由光谱紫外到红外区的激光器可以激发这些荧光染料。因此,为了用基于荧光的装置如流式细胞仪进行研究,可以使用大量的光谱不同的试剂标记细胞。这些试剂在本领域内是已知的。在一个实施方案中,在分析步骤期间使用一种或多种荧光染料。在一些实施方案中,在分析细胞对药物组合物的响应中使用一种或多种染色。

[0103] 本领域内已知有数种方法可以在分析之前将样品在试管中的无意混合降至最低。已知在离体测定期间将样品无意混合降至最低的一种方法是让全部试管在孔之间清洗以消除细胞转移的正位移泵(positivedisplacement pump)。另一种用于将样品无意混合降至最低的方法是终点测定(endpoint assay)。终点测定是有利的,因为化合物转移并不是问题。在一个实施方案中,所述测定包括终点测定。

[0104] 本领域内已知有几种方法可以收集和存储从使用流式细胞仪的测定获得的数据。在一个实施方案中,与EPS结合的软件记录各孔注射和孵育时间的计时信息。当运行筛选测定时,可以收集两个采集文件。在一个实施方案中,位于细胞仪软件中的一个文件,包含仪器分析各细胞的真实数据。在另一实施方案中,第二个文件是计时文件,位于EPS软件或细胞仪软件中,其包含仪器分析各细胞的真实数据。这些文件各自可以根据在测定运行开始时扫描孔板(如96孔板)的条形码来命名。

[0105] 使用者可以将所有文件从两个仪器下载到分析软件程序,如EPS分析仪。该程序被设计成将从细胞仪获取的数据分组,并且制定与各组中细胞结合的化合物的孔数。该程序的另一用途涉及基于荧光读数选通个体群,以便可以单独分析每个个体群。还评估测定设置中所包括的分析标记物。在一个实施方案中,为了筛选和验证测定,使用与荧光团缀合的凋亡标记物Annexin V FITC来从进入凋亡通路的那些细胞中区分活细胞。

[0106] 完成分析之后,将文件上传到数据库。在一个实施方案中,所述数据库是来自IDBS (Guildford, UK)的ACTIVITYBASETM。上传文件到数据库允许快速评估数据以确定对各患者样品有活性的化合物。随着数据积累,可以构建和开发生物信息学工具,以促进数据解释。作为实例,来自获取数据的药理学标准如EC₅₀、EC₉₀、最大凋亡等可以与许多患者样品交叉比较以及与免疫表型分析结果和遗传信息相关联。考虑到用各测定筛选所获取的大量数据,灵活的数据库管理系统对于筛选过程来说是至关重要的。

[0107] 这种系统可以通过测量药物组合物诱导凋亡的能力来确定离体治疗指数。图1和图2描述了利用流式细胞术检测凋亡细胞以及区分正常表型和肿瘤表型的能力。在一个实施方案中,所述方法利用流式细胞术来区别正常表型和肿瘤表型。在另一实施方案中,所述方法利用流式细胞术和单克隆抗体来区别正常表型和肿瘤表型。在另一实施方案中,所述方法利用流式细胞术来检测凋亡的细胞。在具体实施方案中,所述方法利用异硫氰酸荧光

素(FITC)连接的Annexin V来检测凋亡细胞上表达的磷脂酰丝氨酸。同时使用单克隆抗体和多参数分析策略的合适组合可以允许从患有血液病症的患者样品中所存在的残留正常细胞区别出白血病细胞。在一个实施方案中,所述方法允许区别血液或骨髓样品中的恶性细胞和正常细胞。在另一实施方案中,血液或骨髓中恶性细胞和正常细胞的区别根据由Euroflow标准最近开发的方法来进行(EuroFlowConsortium,Cytometry A.2008Sep;73(9):834-46;van Dongen et al.,14thEHA Congress,Berlin,DE 4June 2009:将在Leukemia 2010(正在评论中)中出版)。

[0108] 用于药物组合物的离体筛选过程示意性地示于图3中。在图3中,所述样品由肝素防止凝固,进行免疫表型分析并计数。接着将样品稀释以使白血病细胞浓度达到约4,000细胞/ μL 。将45 μL 细胞悬浮液添加到包含5种不同浓度的药剂的96-孔板。将药物和药物组合物与样品一起孵育大约48小时之后,裂解并且洗掉红细胞,以浓缩包含恶性细胞的白细胞。通过大幅度减小需要由流式细胞仪评估的体积和细胞数量来加速筛选过程。添加荧光标记的抗体来从健康细胞中区分恶性细胞,并且添加荧光标记的Annexin V来测量各细胞群内的凋亡水平,如恶性细胞内的凋亡水平。然后,进行筛选,测定各药物组合物的活性,并分析和报告结果。

[0109] 在一个实施方案中,所述方法包括将样品分成等分试样,并且将所述等分试样分配到孔板内。这些孔板包含多种浓度的单独的药物或药物组合。在一个实施方案中,在引入细胞样品之前,所述孔板就包含多种浓度的单独的药物或药物组合。在另一实施方案中,在引入多种浓度的单独的药物或药物组合之前,将细胞样品引入到孔内。在另一实施方案中,可以使用大量的化合物库,包括约20、30、50、75、100、200、300、500、700、1000或2000种化合物,由前述任意两个值限定的范围,或者更多的化合物。

[0110] 在一些实施方案中,每孔中的等分试样包含可检测的患病细胞。在一个实施方案,每孔中的等分试样包含约500或更多个患病细胞或肿瘤细胞。在另一实施方案中,每孔中的等分试样包含约5,000或更多个患病细胞或肿瘤细胞。在另一实施方案中,每孔中的等分试样包含约10,000或更多个患病细胞或肿瘤细胞。在另一实施方案中,每孔中的等分试样包含约20,000或更多个患病细胞或肿瘤细胞。在另一实施方案中,每孔中的等分试样包含约40,000或更多个患病细胞或肿瘤细胞。可以平行进行样品测试。在一个实施方案中,至少平行测试二份等分试样,以允许进行免疫表型鉴别。此外,可以包括没有任何药物的对照孔(未示出)来鉴别与药物处理无关的自发凋亡水平。在一个实施方案中,所述方法利用对照孔来鉴别样品中的自发凋亡水平。

[0111] 用等分试样孵育不同药物组合物的时间可以改变。在一个实施方案中,所述时间多达约24小时。在另一实施方案中,所述时间多达约48小时。在另一实施方案中,所述时间多达约72小时。在另一实施方案中,所述时间多达约96小时。在另一实施方案中,所述时间多达约120小时。孵育指定时间之后,可以用缓冲液处理暴露于药物组合物的样品等分试样,以裂解红细胞群并浓缩白细胞群。在一个实施方案中,使用本领域内已知的缓冲液来裂解红细胞群。然后将各孔用试剂孵育,以便使用流式细胞术来检测凋亡。在一个实施方案中,所述试剂为Annexin V。

[0112] 利用流式细胞术来评估各种药物对每种细胞类型的效应和对由各种药物诱导的选择性细胞死亡的水平进行定量是可能的。接着可以评估结果,并且如果需要,可以用其它

样品或等分试样开始新的测试,以便更详细地证实最相关的结果,如以前鉴别的10种最好的药物组合物和浓度。对患者样品进行测定之后,可以选择能选择性诱导诸如白血病细胞的肿瘤细胞凋亡的适当的药物或药物组合物。在一个实施方案中,鉴别并用新鲜样品重复测试了约5-20种药物组合物。在具体的实施方案中,鉴别并用新鲜样品重复测试了5种最好的药物组合物。在另一具体的实施方案中,鉴别并用新鲜样品重复测试了10种最好的药物组合物。在另一具体的实施方案中,鉴别并用新鲜样品重复测试了20种最好的药物组合物。

[0113] 在此提供的方法已被用于在各类患者中分析目前已批准用于慢性淋巴细胞白血病(CLL)的几种药物。例如,图4中提供了单独批准的细胞毒性药物诱导离体患者样品的恶性细胞凋亡的效力。图4表明,图4表明在药物响应中存在个体间的高度可变性,这突出了在此描述的方法作为个体化药物测试的潜力。

[0114] 在一个实施方案中,所述方法鉴别在患者样品中诱导大于90%的凋亡的药物组合物。在另一实施方案中,所述方法鉴别在患者样品中诱导大于75%的凋亡的药物组合物。在另一实施方案中,所述方法鉴别在患者样品中诱导大于50%的凋亡的药物组合物。

[0115] 图4表明在此描述的方法还可以检测通常在患者样品中不诱导凋亡的药物组合物。不能诱导凋亡可能是由于患者对药物抗性的遗传倾向或者肿瘤对药物固有的抗性。无论哪种原因,需要预测药物组合物不能诱导凋亡的能力。在一个实施方案中,所述方法鉴别在患者样品中诱导小于90%的凋亡的药物组合物。在另一实施方案中,所述方法鉴别在患者样品中诱导小于75%的凋亡的药物组合物。在另一实施方案中,所述方法鉴别在患者样品中诱导小于50%的凋亡的药物组合物。在另一实施方案中,所述方法鉴别在患者样品中诱导小于30%的凋亡的药物组合物。

[0116] 使用新近获得并用肝素处理以避免凝固,以及按需要进行稀释的全样品(如全外周血或骨髓样品)是在此描述方法的有利要素。在一个实施方案中,在此描述的方法使用血液样品。在另一实施方案中,在此描述的方法使用全血样品。在另一实施方案中,在此描述的方法使用全外周血样品。在另一实施方案中,在此描述的方法使用骨髓样品。在一实施方案中,在此描述的方法使用已离开动物模型的样品。在一实施方案中,在此描述的方法使用已离开小鼠模型的样品。全样品是有利的,因为通常体外测定仅分离包含肿瘤细胞的单核部分而通过清洗丢弃相应的多形核淋巴细胞、红细胞、蛋白和其它血浆成分。这严重改变了评估药物效应的生物环境。相反地,在此描述的方法可以保留血浆中的红细胞以及通常与约90%至98%的各药物结合的蛋白,如白蛋白。

[0117] 因而,可以认为在此描述的在测定中使用的药物浓度更接近患者血浆中存在的实际药物浓度。使用全样品同样是重要的,因为它促进人们观察抗体(如Campath或利妥昔单抗)对诱导肿瘤细胞凋亡的影响。不同的度量如细胞耗竭百分比而不是凋亡百分比同样是重要的。虽然两种度量都测量凋亡,但是细胞耗竭将相对于没有药物的对照等分试样不再存活的细胞计算在内。直接的凋亡检测将在测量时经历凋亡的细胞计算在内。区别是凋亡之后进入坏死并且流式细胞仪无法再检测的细胞数量。根据测量的时间,这两种测定可以报告不同的结果。例如,在较短的检测时间(例如24小时)时,细胞耗竭和细胞凋亡是相似的。然而,在更长的检测时间(例如48至72小时)时,这些测量相异,因为首次经历凋亡且变得不再可检测的细胞数量增加。对于利妥昔单抗诱导凋亡而言,其需要单核部分中存在的补体,而该补体在一般的体外测定中被排除。因此,在此描述的方法允许很大程度上保持分

析样品中的原始细胞微环境条件。在一个实施方案中,在此描述的方法基本上保持了原始细胞微环境。

[0118] 在此描述的自动流式细胞术平台是首次能够在离体患者血液样品中筛选大量药物组合物变量的平台。该平台能够探索用于在个体患者中诱导凋亡的多种药物组合。由于血液学家通常仅利用在治疗方案中正式批准的药物和药物组合(例如通过临床试验批准),所以在此描述的方法和装置优选包括评估现有治疗方案中的药物和药物组合。这些治疗方案可以包括特定国家认可的方案。这些治疗方案还可以包括更早批准的方案,即使它们不再是优选的治疗方案。还包括更新的实验方案(例如仍然处于临床试验的那些方案),包括已批准的药物或仍然处于II或III期临床试验的药物的新的药物组合物。在此描述的方法和装置还可以评估用于各种血液恶性肿瘤适应症的药物组合,包括已批准的药物或处于II或III期临床试验的那些药物。

[0119] 以前用于指导个体化患者治疗的ITRT离体测试限于单独的药物或非常少量的药物组合。图22中表明例如利用ExviTech平台,评估多种药物组合明显有益。对于图22中的CLL患者样品,单独的CLL药物没有效果(左),表明治疗无效。然而,这些相同药物形成的三种组合对消除所有白血病细胞非常有效(右),表明敏感性治疗的潜力。因而,仅评估单独的药物或仅评估目前治疗方案中使用的药物组合会导致相反的预测。图22给出对于有效治疗血液肿瘤极其重要的信息-预测没有临床响应的抗性方案(中间)和预测有利临床响应的高度敏感性方案(右)。

[0120] 在一些实施方案中,在此描述的个体化药物测试评估各药物或药物组合的5种不同的浓度。这使得最小剂量-响应曲线能够被确定,这能比单独的剂量数据提供更精确的药效决定。它还通过分析5个点是否适合S形剂量-响应曲线来促进质量控制。以上图22中对CLL样品描述的相同数据在图23至图25中的5点剂量-响应曲线中给出。

[0121] 在离体评估药物组合中,确定联合的药物之间是否有正或负的协同性(又被称为协同作用)是重要的。这种离体协同有可能预测患者体内的协同。药物之间的正协同作用指示效力相对于更高治疗指数的毒性可能增加。考虑到细胞毒性药物的剧毒性,提高它们的治疗指数可能在治疗上是重要的。因此,在定量药物协同作用上进行了一些尝试,并且最常用的方法是Chou和Talalay的方法(Chou et al., *Adv Enzyme Regul* 1984, 22:27-55)。图26给出氟达拉滨和马磷酰胺(环磷酰胺的代谢物和活性成分)在两份CLL患者样品中的协同组合,其中利用程序Calculusyn(Chou et al., *Adv Enzyme Regul* 1984, 22:27-55)计算协同指数(CI)来表征该组合潜在的协同作用。图27描述了利用Chou和Talalay方法对图26的患者P2.0149中所见的协同作用进行更详细地计算。

[0122] 药物和药物组合的效力还可以受它们的动力学影响。图28给出已批准的细胞毒性药物氟达拉滨和非细胞毒性抗抑郁药舍曲林在CLL样品中的不同动力学行为。舍曲林(右栏)在24小时内消除全部恶性细胞(右栏顶部),而氟达拉滨需要48小时(左栏底部)。然而,为诱导最大凋亡,两种药物都只需要与样品一起孵育30分钟。这表明虽然由Annexin V测量的凋亡需要24或48小时以达到可充分检测,但是在孵育的短时间内恶性细胞就会编程凋亡。在一个实施方案中,将药物组合物孵育的时间是约10分钟、15分钟、20分钟、30分钟、1小时、2小时、4小时、8小时或由前述任意两个值所限定的范围。在另一实施方案中,测量凋亡的时间点是孵育开始之后约24小时、48小时或72小时,或者由前述任意两个值所限定的范

围。

[0123] 由在此描述的方法证明,该平台能够评估成百上千个包含与药物结合的血液样品的单独的孔,所述药物代表不同的组成和浓度。表明药物组合物受限于从患者获得的血液样品的体积和细胞构成而非平台的通量。由于用于各药物组合物的小体积,如每孔约20,000个细胞,因此在具有大于常规样品体积的样品中,可能高达所获得的每份样品约10,000种或更多种药物组合物,或者高达每份样品约20,000种或更多种药物组合物。这种大量的组合足以评估可以给予个体患者的可供选择的多药疗法的药物组合物。在一个实施方案中,用每孔最少约500个肿瘤细胞进行筛选。在另一实施方案中,用每孔约1,000个肿瘤细胞进行筛选。在另一实施方案中,用每孔总共约20,000个总细胞进行筛选。在另一实施方案中,用每孔总共约50,000个总细胞进行筛选。每份患者样品的恶性细胞数量可能从几乎为零变化到超过十亿,因而它们与细胞总数的相对比例也可以变化。

[0124] 图5示出可以研究以鉴别用于治疗个体患者的最优多药疗法的潜在的药物组合物的数量。假设地,图5左侧第一列中考虑了多达15种已批准用于特定适应症的药物。正在酝酿多种用于血液肿瘤的药物,其中几种更新的药物预期会在未来几年被批准。还有许多给予血液肿瘤患者的非细胞毒性药物(即伴随药物)以减轻细胞毒性治疗的效应,范围通常是每名患者5至10种药物。这些药物可从胃保护剂到用于恶心的止呕剂到防止感染的抗生素和抗病毒药来变化。图5中选择的15种药物代表考虑用于特定适应症的高数量的已批准细胞毒性药物,因而可以考虑作为某些临床实践的代表。图5中选择的15种药物仅仅是说明性的,并且不应以任何方式解释为限制本发明。图5中,预期将多达4种不同药物的组合(第2列)作为代表性的平均数,即使有联合5种和6种药物的方案。在此描述的孔板设计图示在单个96孔板中使用多达22种不同药物。此外,用具有不同孔数的平板可以分析不同数量的药物。在一个实施方案中,选择约5种药物用于分析。在另一实施方案中,选择约10种药物用于分析。在另一实施方案中,选择约20种药物用于分析。在另一实施方案中,选择约40种药物用于分析。

[0125] 如图5中图示,在第二列中15种药物的不同组合的数量是1940,对于14种药物为1470等。由于这些结果可以用于告知治疗决定,因此优选每种药物或药物组合进行5种浓度(第3列)。此外,评估至少2种孵育时间将允许评估动力学参数(第4列)。然而,以5种剂量和/或多于一种孵育时间进行分析不应解释为限制。

[0126] 即使具有前文中讨论的全部变量(即不同药物的数量、多种测量、改变药物浓度和改变孵育时间),能够评估多达约10,000或20,000种药物组合物的自动平台仍将涵盖全部假设情况,如图5中非阴影区域所示。治疗空间使人用目前的方法能够研究图5中的灰色阴影区域。可以用目前方法研究的药物组合物多达30或35种,为灰色阴影。表的其余部分代表启用ExviTech平台可以研究的药物组合物的新的空间。由于目前可利用的手动平台仅能够评估多达约35种独立情形,因此它们用作个体化药物测试的潜力是有限的。因此,在离体血液样品中追踪药物效应的自动化对于个体化药物应用而言既是有利的又是创新性的。在一个实施方案中,所述方法分析少于1,000种药物组合物。在另一实施方案中,所述方法分析约10,000种药物组合物。在另一实施方案中,所述方法分析少于20,000种药物组合物。在一些实施方案中,在此描述的方法允许分析多达约20,000种药物组合物,其涵盖了多达15种药物的1、2、3或4种药物组合。在一些实施方案中,孵育时间也变化。例如图5所示(第4列),

包括多于一种孵育时间增加所测试的组合的数量。在一些实施方案中,利用ExviTech使图5中的非阴影区域能够测量,其代表需要给患者个体化治疗的大部分药物组合物。

[0127] 还可以将所述ExviTech平台用于筛选数千种药物,特别是每份患者样品约1,000种已批准药物,以寻找选择性诱导恶性细胞凋亡的药物。令人惊奇地,大量已批准的非细胞毒性药物显示以与用于各适应症的已批准的细胞毒性药物相同的效力诱导恶性细胞的凋亡。图6给出未批准用于血液恶性肿瘤的5种非细胞毒性药物(左)如何以与3种已批准的细胞毒性CLL药物(右)相似的效力消除CLL恶性细胞。图7给出这些药物中的一种,抗抑郁药帕罗西汀的剂量响应,表明与健康T细胞和NK细胞相比,该药物优先诱导恶性B细胞的凋亡。图8给出这些非细胞毒性药物中的一种,舍曲林如何比已批准细胞毒性CLL药物更快的清除恶性CLL细胞(24对48小时)(左)。五种最有效的非细胞毒性药物中的三种是抗抑郁药帕罗西汀、氟西汀和舍曲林——属于相同药理学家族的药物。图9给出6种血清素再摄取抑制剂中仅3种如何有效诱导恶性CLL细胞的凋亡。这表明这些效应与药物的药理学分类并没有必然联系,并且可以将在此提出的离体个体化药物测试用于鉴别这些活性。

[0128] 意外发现,多种已批准的安全的非细胞毒性药物可以有效对抗肿瘤细胞,提示更宽泛的评估。首先,不考虑非选择性效应,只有少数的这类药物在任何给定样品中都有效。得自在23份CLL样品中筛选2,000种药物的图10给出这些已批准的非细胞毒性药物的效力如何可以在患者之间变化巨大。若药物杀死多于80%的恶性细胞,则被确定为是有效的,该标准与最有效的细胞毒性药物相似。只有3种药物在多于80%的患者中有效,229种药物在少于20%的患者样品中有效。这表明非细胞毒性药物可以有效对抗离体恶性细胞,但是它们显示非常大程度的患者与患者间的差异。虽然如此,几乎在每一份CLL患者样品中,都发现5-10种非细胞毒性药物可有效对抗离体恶性细胞。虽然体内的这种效应的预测性是未知的,但是具有药物动力学和其它可能起作用的诸如配方的因素,给予患者的这5-10种非细胞毒性药物的效应可以代表显著的治疗效果。

[0129] 一些离体有效的非细胞毒性药物是当给予患有血液恶性肿瘤患者时能减轻细胞毒性药物效应的药物(即伴随药物)。图12给出CLL样品的实例,对于该样品,质子泵抑制剂奥美拉唑和抗病毒药无环鸟苷显示对抗离体恶性细胞的显著效力,这与细胞毒性药物的效力相似。表4列出这些伴随药物中的一些。

[0130] 表4. 伴随药物

[0131]

药物	适应症
水合氧化铝	抗酸剂
劳拉西泮	抗焦虑药
阿米卡星	抗生素(氨基糖苷类)

[0132]

美罗培南	抗生素(β -内酰胺类)
头孢吡肟	抗生素(头孢菌素类)
万古霉素	抗生素(糖肽类)
替考拉宁	抗生素(糖肽类)
恩丹西酮	止呕剂

地塞米松	抗炎药,免疫抑制剂,糖皮质激素
两性霉素B(脂质体)	抗真菌剂
卡泊芬净	抗真菌剂
伊曲康唑	抗真菌剂
氟康唑	抗真菌剂
伏立康唑	抗真菌剂
甲氧苄啶&磺胺甲噁唑	抑细菌剂
G-CSF	粒细胞集落刺激因子
雷尼替丁	组胺类H2受体拮抗剂
拉布立酶	高尿酸血症治疗
对乙酰氨基酚	非甾醇类抗炎药
安乃近	非甾醇类抗炎药
氢氯酸吗啡	阿片类止痛剂
奥美拉唑	质子泵抑制剂
帕罗西汀	抗抑郁药
氟西汀	抗抑郁药
舍曲林	抗抑郁药

[0133] 一些已批准的非细胞毒性药物可以在治疗上有益于增强细胞毒性药物(即作为化学增敏剂)的效应。图11中给出实例,其中低浓度的抗抑郁药舍曲林增强低浓度的细胞毒性药物苯丁酸氮芥的效力。

[0134] 由于目前的方法旨在分析大量的变量,因此设计96-孔板来研究多药疗法治疗中的潜在变量。也可以使用其它平板,包括具有更多或更少孔数量的平板。在一个实施方案中,使用1536孔板。在另一实施方案中,使用384孔板。在另一实施方案中,使用96孔板。

[0135] 图13-18和实施例9-14示出了使用96孔板格式分析以下适应症的患者样品:慢性淋巴细胞白血病、急性淋巴细胞白血病、多发性骨髓瘤、骨髓增生异常综合征、急性髓细胞白血病(非M3型)和M3型急性髓细胞白血病。设计用于各适应症的平板包含目前满足西班牙血液恶性肿瘤治疗计划(Spanish Program for the Treatment of Hematological Malignancies, Programa para el Tratamiento de Hemopatías Malignas(PETHEMA))用于适应症的治疗方案的药物。

[0136] 在一个实施方案中,所述方法分析选自临床机构已批准方案的药物。在具体实施方案中,所述方法分析选自PETHEMA治疗方案的药物。所述孔设计利用PETHEMA治疗方案中单一疗法所开的药物,还利用单一疗法药物的组合。此外,所述设计利用为减轻PETHEMA治疗方案副作用所开的药物,还利用这些药物的组合。

[0137] 在一实施方案中,所述方法分析细胞毒性药物,包括临床试验中已批准的药物或尚未批准的药物。在另一实施方案中,所述方法分析细胞毒性药物的组合。在另一实施方案中,所述方法分析为治疗细胞毒性药物副作用所开的药物。在另一实施方案中,所述方法分析为治疗细胞毒性药物副作用所开的药物组合。此外,所述孔设计利用细胞毒性药物与为治疗细胞毒性药物副作用所开的药物的组合。在一实施方案中,所述方法分析细胞毒性药物与为治疗细胞毒性药物副作用所开的药物的组合。在另一实施方案中,所述方法分析为

任何一种或全部适应症所开的已批准或处于临床试验中的任何一种和全部的非细胞毒性药物。在另一实施方案中,所述方法分析非细胞毒性药物的组合。例如,所述平板设计可以利用细胞毒性药物和非细胞毒性药物的组合。在一实施方案中,所述方法分析细胞毒性药物和非细胞毒性药物的组合。

[0138] 血液肿瘤的治疗由经血液学家认可的某些有限量的治疗方案指导。这些方案限定了用于细胞毒性和其它组合药物的多药疗法方案,包括各药物的剂量和时间。所述方案根据变量,如各患者的年龄、健康状况和疾病状况而不同。方案还可以因国家而异,但是一般在一个国家内一致。就待研究的需要几十到几百种条件的剂量范围和不同药物组合物方面而言,这些方案中还有显著变化。在一个实施方案中,使用临床认可的试剂评估细胞凋亡。在另一实施方案中,临床认可的试剂与抗体联合使用来鉴别肿瘤细胞亚型。在另一实施方案中,用于鉴别肿瘤细胞亚型的试剂根据最近的Euroflow标准(van Dongen et al., EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes, 14th EHA Congress, Berlin, DE 4 June 2009; 将在Leukemia 2010(正在评论中)中出版)限定。在另一实施方案中,药物组合物选自在特定国家中使用的用于血液治疗的方案。在另一实施方案中,药物组合物选自在特定国家中使用的用于血液治疗的更早的方案。在另一实施方案中,药物组合物选自在特定国家中使用的试验方案,定义为用于血液治疗的已批准药物的新的组合。在另一实施方案中,药物组合物选自包括在血液治疗的临床试验中正在评估的药物的方案。

[0139] 优选地,应当单独地研究在治疗方案中使用的各种药物的效应。然而,这种研究不应当理解为限制。利用在此描述的方法不仅应当能单独地研究单一疗法药物,还应当能研究通常仅以组合给予的药物。例如,通常仅以组合给予的药物的个体筛选可以提供允许测定这些药物的独立效应的数据。

[0140] 在一个实施方案中,单独地分析单一疗法药物。在另一实施方案中,单独地分析通常仅以组合给予的药物。还应当研究通常与细胞毒性药物联合使用的非细胞毒性药物(例如,如图12)。这包括抗生素、止呕剂(抗呕吐剂)、抗酸剂、抗病毒药等。在一个实施方案中,所述方法分析奥美拉唑在患者样品中诱导凋亡的能力。在另一实施方案中,所述方法分析无环鸟苷在患者样品中诱导凋亡的能力。

[0141] 事实上,已将在此描述的方法用于证明一些非细胞毒性药物(如帕罗西汀和舍曲林)可以调节细胞毒性药物(如氟达拉滨和苯丁酸氮芥)的效应,即增强它们的效力(例如,图11中示出)。如图6表明,单独给予这些非细胞毒性药物中的一些可以以与已批准的细胞毒性药物相似的效力诱导离体恶性细胞的凋亡。在一个实施方案中,所述方法使用非细胞毒性药物在患者样品中诱导凋亡。在另一实施方案中,所述方法使用非细胞毒性药物的组合在患者样品中诱导凋亡。在另一实施方案中,所述方法使用细胞毒性和非细胞毒性药物的组合在患者样品中诱导凋亡。

[0142] 意外地,某些非细胞毒性药物消除恶性细胞而不损伤健康细胞,表明这种药物选择性地攻击恶性细胞(例如,如图12中所示)。这种意外的结果对于治疗血液肿瘤可具有深远的影响。在一个实施方案中,所述方法使用非细胞毒性药物来选择性诱导肿瘤细胞的凋亡。在一实施方案中,所述离体治疗指数大于约1。在另一实施方案中,所述离体治疗指数大

于约5。在另一实施方案中,所述离体治疗指数大于约10。在一些实施方案中,在此描述的方法允许区别血液肿瘤如血液、骨髓、淋巴结或脾样品相关组织中的白血病细胞和正常细胞。

[0143] 此外,所述非细胞毒性药物诱导凋亡的能力在药物的药理学类别内(例如,如图9所示)以及在药物的药理学类别之间变化。在一个实施方案中,所述方法分析选自这样的药物,其与为治疗某种适应症或减缓某种适应症治疗的副作用而给予患者的药物为同一药理学类别。在具体实施方案中,所述方法分析选择性血清素再摄取抑制剂。此外,在此描述的方法并不限于仅分析细胞毒性药物或仅分析非细胞毒性药物。事实上,非细胞毒性药物与细胞毒性药物组合这样的情况是期望的,因为相对于单独的细胞毒性药物的能力,所述组合在患者样品中可以具有更强的诱导凋亡的能力(例如,如图11所示)。

[0144] 本系统完全能够分析两类药物的组合,如通常一起给药的细胞毒性药物和非细胞毒性药物。在一个实施方案中,分析为已给予细胞毒性药物的患者所开的非细胞毒性药物。例如,在此描述的方法可以用于分析用细胞毒性药物氟达拉滨和非细胞毒性选择性血清素再摄取抑制剂处理的患者样品。在具体的实施方案中,所述方法用于分析用细胞毒性药物氟达拉滨和非细胞毒性药物帕罗西汀处理的患者样品。对于血液肿瘤,患者药物方案可以包括多种药物组合。在一个实施方案中,分析为血液适应症所开的多种组合的药物。例如,可以平均给予各患者8至10种药物。在一个实施方案中,分析5种或更多的药物组合物。以下实施例中给出用于一些主要适应症的优选的平板设计。

[0145] 基于目前策略的血液肿瘤治疗方案是药物开发停滞的结果。这种停滞使血液学家们能熟悉他们自己和特定的药物,并且能开发出对各种药物最佳组合的合理估计。在一个实施方案中,使用在此描述的方法验证目前对药物组合物的科学预期。然而,两个因素能显著改变基于目前策略的治疗方案。首先,如图4所示,最近认识到各患者对化疗的不同响应已将个体化医疗带到了医学研究前沿。由分子生物学技术和人类基因组译码所带来的革新已形成主要集中于对患有血液肿瘤的患者样品的基因组分析。然而,10至15年的基因组研究已使得能对处于风险亚群体中的患者进行分级,但是还不能对个体患者进行个体化治疗。这种认识的结果形成期望利用个体化药物测试来将个体患者与其最优治疗相匹配。然而,估计目前方案研究小于在此描述的平台可以研究的可获得治疗空间的1-5%(如图5中示出)。其次,最近有大量批准用于血液肿瘤的新药,并且还几个后期临床备选药。结果是,这些疾病迅速从开处方用了许多年的相同的旧药方案转变为用短短几年内被批准的许多新药的方案。在一个实施方案中,使用在此描述的方法评估旧药、新药、后期临床备选药或以上的组合。

[0146] 在此描述的方法可用来基于个体患者选择药物和用于鉴别治疗方案的趋势,所述治疗方案可用于为具有相似的适应症和对目前药物方案响应的患者选择药物。每名患者在他们的血流和骨髓中都含有所选择浓度的这些化合物,以便消除恶性细胞。在此描述的多药疗法个体化药物测试的一个优点是能研究许多不同药物组合物的能力,有时能达到同时给予8至10种药物。在一个实施方案中,同时给予患者多种药物。在另一实施方案中,顺序给予患者多种药物。在此提供的多种药物还对联合给药进行评估。如以下实施例所示,可以观察到这些药物的组合对凋亡诱导具有清楚且显著的效应。

[0147] 另一个优点是以个体化为基础确定最佳药物组合物的能力。如图10所示,患者对某种药物组合物的响应有大量可变性。事实上,对于23份患者样品中的超过80%,仅三种药

物能诱导多于80%的肿瘤细胞的凋亡。相反地,对于不到20%的(1-4)患者样品,229种不同药物能诱导多于80%的肿瘤细胞的凋亡。这表明大多非细胞毒性药物在极少数的患者中有效,并且证明比细胞毒性药物存在更大程度的个体间变化。然而,通常给予患有血液肿瘤的患者5-10种非细胞毒性伴随药物来减缓细胞毒性药物的效应。因而,在这些伴随药物之间选择具有累加效应,显示出能诱导离体恶性细胞凋亡的显著效力的亚组(如图12)可以是有意义的。

[0148] 除了鉴别对于个体患者可能最有效的药物外,这些结果还能够将患者分级成亚组,并且使得对于这些亚组的新治疗方案成为可能,包括细胞毒性和非细胞毒性药物。在一个实施方案中,以个体患者为基础选择药物治疗方案。在另一实施方案中,以在1-4份患者样品中的效力为基础选择药物治疗方案。在另一实施方案中,以在5-9份患者样品中的效力为基础选择药物治疗方案。在另一实施方案中,以在10-14份患者样品中的效力为基础选择药物治疗方案。在另一实施方案中,以在15-19份患者样品中的效力为基础选择药物治疗方案。在另一实施方案中,以在大于20份患者样品中的效力为基础选择药物治疗方案。在此描述的方法比目前可用的方法提供更多的治疗方案选择。

[0149] 个体化药物测试的一个优点是其以个体为基础优化具体药物方案的能力。在多药疗法方案中,以联合给予患者几种不同的药物,单独药物的药物动力学和典型剂量响应曲线可以是非常规的。利用在此描述的方法,基于认识到特定患者的剂量响应曲线的最适度,可以观察到肿瘤和正常细胞的最佳剂量。

[0150] 在此描述的方法和装置可以利用各种药物和药物组合。例如,可以使用包含细胞毒性药物的药物组合物。同样地,可以使用包含非细胞毒性药物的药物组合物。此外,可以使用细胞毒性药物和非细胞毒性药物的药物组合。

[0151] 可以单独使用或与其它化合物联合使用的细胞毒性化合物的一些实例包括氟达拉滨(指定为“1”)、苯丁酸氮芥(指定为“2”)、米托蒽醌(指定为“3”)、长春新碱(指定为“4”)、米托蒽醌(指定为“5”)、环磷酰胺(指定为“6”)、多柔比星(指定为“7”)和多柔比星(指定为“8”)。

[0152] 可以单独使用或与其它化合物联合使用的非细胞毒性化合物的一些实例包括5-氮杂胞苷(指定为“1”)、阿仑单抗(指定为“2”)、氨喋呤(指定为“3”)、氨茶非特(指定为“4”)、安吡啶(指定为“5”)、CAT-8015(指定为“6”)、贝伐单抗(指定为“7”)、ARR Y520(指定为“8”)、三氧化二砷(指定为“9”)、AS1413(指定为“10”)、全反式维甲酸(指定为“11”)、AZD 6244(指定为“12”)、AZD1152(指定为“13”)、巴诺蒽醌(指定为“14”)、依诺他宾(指定为“15”)、苯达莫司汀(指定为“16”)、博来霉素(指定为“17”)、兰妥莫单抗(指定为“18”)、硼替佐米(指定为“19”)、白消安(指定为“20”)、卡铂(指定为“21”)、CEP-701(指定为“22”)、苯丁酸氮芥(指定为“23”)、氯脱氧腺苷(指定为“24”)、克拉屈滨(指定为“25”)、克罗拉滨(指定为“26”)、CPX-351(指定为“27”)、环磷酰胺(指定为“28”)、环孢素(指定为“29”)、阿糖胞苷(指定为“30”)、胞嘧啶阿拉伯糖苷(指定为“31”)、达沙替尼(指定为“32”)、柔红霉素(指定为“33”)、地西他滨(指定为“34”)、去糖基化-蓖麻蛋白-A链-缀合的抗-CD19/抗-CD22免疫毒素(指定为“35”)、地塞米松(指定为“36”)、多柔比星(指定为“37”)、艾西拉滨(指定为“38”)、恩替诺特(指定为“39”)、依帕珠单抗(指定为“40”)、Erwinase(指定为“41”)、依托泊甙(指定为“42”)、依维莫司(指定为“43”)、甲磺酸依沙替康(指定为“44”)、夫拉平度(指定

为“45”)、氟达拉滨(指定为“46”)、forodesine(指定为“47”)、吉西他滨(指定为“48”)、吉妥单抗-奥唑米星(指定为“49”)、高三尖杉酯碱(指定为“50”)、氢化可的松(指定为“51”)、羟基脲(指定为“52”)、伊达比星(指定为“53”)、异环磷酰胺(指定为“54”)、伊马替尼(指定为“55”)、干扰素 α -2a(指定为“56”)、碘I 131单克隆抗体BC8(指定为“57”)、异环磷酰胺(指定为“58”)、异维甲酸(指定为“59”)、拉莫司汀(指定为“60”)、L-门冬酰胺酶(指定为“61”)、来那度胺(指定为“62”)、来他替尼(指定为“63”)、马磷酰胺(指定为“64”)、美法仑(指定为“65”)、巯基嘌呤(指定为“66”)、氨甲喋呤(指定为“67”)、甲基泼尼松龙(指定为“68”)、甲基泼尼松(指定为“69”)、米唑妥林(指定为“70”)、米托蒽醌(指定为“71”)、奈拉滨(指定为“72”)、尼罗替尼(指定为“73”)、奥利默森(指定为“74”)、紫杉醇(指定为“75”)、帕比司他(指定为“76”)、培门冬酶(指定为“77”)、喷妥司汀(指定为“78”)、吡柔比星(指定为“79”)、PKC412(指定为“80”)、泼尼松龙(指定为“81”)、泼尼松、PSC-833(指定为“82”)、雷帕霉素(指定为“83”)、利妥昔单抗(指定为“84”)、利巴韦林(指定为“85”)、沙帕他滨(指定为“86”)、Dinaciclib(指定为“87”)、索拉非尼(指定为“88”)、索拉非尼(指定为“89”)、STA-9090(指定为“90”)、他克莫司(指定为“91”)、坦螺旋霉素(指定为“92”)、西罗莫司脂化物(指定为“93”)、替尼泊甙(指定为“94”)、特拉罗考(指定为“95”)、沙利度胺(指定为“96”)、硫鸟嘌呤(指定为“97”)、噻替哌(指定为“98”)、替吡法尼(指定为“99”)、拓扑替康(指定为“100”)、曲丁磺酯(指定为“101”)、曲沙他滨(指定为“102”)、长春花碱(指定为“103”)、长春新碱(指定为“104”)、长春地辛(指定为“105”)、长春瑞滨(指定为“106”)、伏利拉辛(指定为“107”)、伏立诺他(指定为“108”)、依托泊甙(指定为“109”)和唑喹达(指定为“110”)。

[0153] 可以单独使用或与其它化合物联合使用的非细胞毒性化合物的一些实例包括水合氧化铝(指定为“111”)、劳拉西泮(指定为“112”)、阿米卡星(指定为“113”)、美罗培南(指定为“114”)、头孢吡肟(指定为“115”)、万古霉素(指定为“116”)、替考拉宁(指定为“117”)、恩丹西酮(指定为“118”)、地塞米松(指定为“119”)、两性霉素B(脂质体)(指定为“120”)、卡泊芬净(指定为“121”)、伊曲康唑(指定为“122”)、氟康唑(指定为“123”)、伏立康唑(指定为“124”)、甲氧苄啶(指定为“125”)、磺胺甲噁唑(指定为“126”)、G-CSF(指定为“127”)、雷尼替丁(指定为“128”)、拉布立酶(指定为“129”)、对乙酰氨基酚(指定为“130”)、安乃近(指定为“131”)、氢氯酸吗啡(指定为“132”)、奥美拉唑(指定为“133”)、帕罗西汀(指定为“134”)、氟西汀(指定为“135”)和舍曲林(指定为“136”)。

[0154] 此外,在大多国家中,特定的药物组合代表用于治疗AML、ALL、CLL和NHL的优选或标准的细胞毒性疗法。这些存在的疗法可以用数字代号指定,并且在以下组合中,可以进一步与其它药物联合使用。

[0155] 以#. #形式使用以上列出所述的数字代号,以下列出包含至少一种细胞毒性化合物的两种化合物组合的实例,在所述组合中可以还包含其它化合物或不包含其它化合物:

[0156] 1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、1.10、1.11、1.12、1.13、1.14、1.15、1.16、1.17、1.18、1.19、1.20、1.21、1.22、1.23、1.24、1.25、1.26、1.27、1.28;1.29、1.30、1.31、1.32、1.33、1.34、1.35、1.36、1.37、1.38、1.39、1.40、1.41、1.42、1.43、1.44、1.45、1.46、1.47、1.48、1.49、1.50、1.51、1.52、1.53、1.54、1.55、1.56、1.57、1.58、1.59、1.60、1.61、1.62、1.63、1.64、1.65、1.66、1.67、1.68、1.69、1.70、1.71、1.72、1.73、1.74、1.75、1.76、1.77、1.78、1.79、1.80、1.81、1.82、1.83、1.84、1.85、1.86、1.87、1.88、1.89、1.90、1.91、

1.92、1.93、1.94、1.95、1.96、1.97、1.98、1.99、1.100、1.101、1.102、1.103、1.104、1.105、1.106、1.107、1.108、1.109、1.110、1.111、1.112、1.113、1.114、1.115、1.116、1.117、1.118、1.119、1.120、1.121、1.122、1.123、1.124、1.125、1.126、1.127、1.128、1.129、1.130、1.131、1.132、1.133、1.134、1.135、1.136;2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、2.10、2.11、2.12、2.13、2.14、2.15、2.16、2.17、2.18、2.19、2.20、2.21、2.22、2.23、2.24、2.25、2.26、2.27、2.28;2.29、2.30、2.31、2.32、2.33、2.34、2.35、2.36、2.37、2.38、2.39、2.40、2.41、2.42、2.43、2.44、2.45、2.46、2.47、2.48、2.49、2.50、2.51、2.52、2.53、2.54、2.55、2.56、2.57、2.58、2.59、2.60、2.61、2.62、2.63、2.64、2.65、2.66、2.67、2.68、2.69、2.70、2.71、2.72、2.73、2.74、2.75、2.76、2.77、2.78、2.79、2.80、2.81、2.82、2.83、2.84、2.85、2.86、2.87、2.88、2.89、2.90、2.91、2.92、2.93、2.94、2.95、2.96、2.97、2.98、2.99、2.100、2.101、2.102、2.103、2.104、2.105、2.106、2.107、2.108、2.109、2.110、2.111、2.112、2.113、2.114、2.115、2.116、2.117、2.118、2.119、2.120、2.121、2.122、2.123、2.124、2.125、2.126、2.127、2.128、2.129、2.130、2.131、2.132、2.133、2.134、2.135、2.136;3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、3.10、3.11、3.12、3.13、3.14、3.15、3.16、3.17、3.18、3.19、3.20、3.21、3.22、3.23、3.24、3.25、3.26、3.27、3.28;3.29、3.30、3.31、3.32、3.33、3.34、3.35、3.36、3.37、3.38、3.39、3.40、3.41、3.42、3.43、3.44、3.45、3.46、3.47、3.48、3.49、3.50、3.51、3.52、3.53、3.54、3.55、3.56、3.57、3.58、3.59、3.60、3.61、3.62、3.63、3.64、3.65、3.66、3.67、3.68、3.69、3.70、3.71、3.72、3.73、3.74、3.75、3.76、3.77、3.78、3.79、3.80、3.81、3.82、3.83、3.84、3.85、3.86、3.87、3.88、3.89、3.90、3.91、3.92、3.93、3.94、3.95、3.96、3.97、3.98、3.99、3.100、3.101、3.102、3.103、3.104、3.105、3.106、3.107、3.108、3.109、3.110、3.111、3.112、3.113、3.114、3.115、3.116、3.117、3.118、3.119、3.120、3.121、3.122、3.123、3.124、3.125、3.126、3.127、3.128、3.129、3.130、3.131、3.132、3.133、3.134、3.135、3.136;4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、4.10、4.11、4.12、4.13、4.14、4.15、4.16、4.17、4.18、4.19、4.20、4.21、4.22、4.23、4.24、4.25、4.26、4.27、4.28;4.29、4.30、4.31、4.32、4.33、4.34、4.35、4.36、4.37、4.38、4.39、4.40、4.41、4.42、4.43、4.44、4.45、4.46、4.47、4.48、4.49、4.50、4.51、4.52、4.53、4.54、4.55、4.56、4.57、4.58、4.59、4.60、4.61、4.62、4.63、4.64、4.65、4.66、4.67、4.68、4.69、4.70、4.71、4.72、4.73、4.74、4.75、4.76、4.77、4.78、4.79、4.80、4.81、4.82、4.83、4.84、4.85、4.86、4.87、4.88、4.89、4.90、4.91、4.92、4.93、4.94、4.95、4.96、4.97、4.98、4.99、4.100、4.101、4.102、4.103、4.104、4.105、4.106、4.107、4.108、4.109、4.110、4.111、4.112、4.113、4.114、4.115、4.116、4.117、4.118、4.119、4.120、4.121、4.122、4.123、4.124、4.125、4.126、4.127、4.128、4.129、4.130、4.131、4.132、4.133、4.134、4.135、4.136;5.6、5.7、5.8、5.9、5.10、5.11、5.12、5.13、5.14、5.15、5.16、5.17、5.18、5.19、5.20、5.21、5.22、5.23、5.24、5.25、5.26、5.27、5.28;5.29、5.30、5.31、5.32、5.33、5.34、5.35、5.36、5.37、5.38、5.39、5.40、5.41、5.42、5.43、5.44、5.45、5.46、5.47、5.48、5.49、5.50、5.51、5.52、5.53、5.54、5.55、5.56、5.57、5.58、5.59、5.60、5.61、5.62、5.63、5.64、5.65、5.66、5.67、5.68、5.69、5.70、5.71、5.72、5.73、5.74、5.75、5.76、5.77、5.78、5.79、5.80、5.81、5.82、5.83、5.84、5.85、5.86、5.87、5.88、5.89、5.90、5.91、5.92、5.93、5.94、5.95、5.96、5.97、5.98、5.99、5.100、5.101、5.102、5.103、5.104、5.105、5.106、5.107、5.108、5.109、5.110、5.111、5.112、5.113、

5.114、5.115、5.116、5.117、5.118、5.119、5.120、5.121、5.122、5.123、5.124、5.125、
5.126、5.127、5.128、5.129、5.130、5.131、5.132、5.133、5.134、5.135、5.136;6.7、6.8、
6.9、6.10、6.11、6.12、6.13、6.14、6.15、6.16、6.17、6.18、6.19、6.20、6.21、6.22、6.23、
6.24、6.25、6.26、6.27、6.28;6.29、6.30、6.31、6.32、6.33、6.34、6.35、6.36、6.37、6.38、
6.39、6.40、6.41、6.42、6.43、6.44、6.45、6.46、6.47、6.48、6.49、6.50、6.51、6.52、6.53、
6.54、6.55、6.56、6.57、6.58、6.59、6.60、6.61、6.62、6.63、6.64、6.65、6.66、6.67、6.68、
6.69、6.70、6.71、6.72、6.73、6.74、6.75、6.76、6.77、6.78、6.79、6.80、6.81、6.82、6.83、
6.84、6.85、6.86、6.87、6.88、6.89、6.90、6.91、6.92、6.93、6.94、6.95、6.96、6.97、6.98、
6.99、6.100、6.101、6.102、6.103、6.104、6.105、6.106、6.107、6.108、6.109、6.110、6.111、
6.112、6.113、6.114、6.115、6.116、6.117、6.118、6.119、6.120、6.121、6.122、6.123、
6.124、6.125、6.126、6.127、6.128、6.129、6.130、6.131、6.132、6.133、6.134、6.135、
6.136;7.8、7.9、7.10、7.11、7.12、7.13、7.14、7.15、7.16、7.17、7.18、7.19、7.20、7.21、
7.22、7.23、7.24、7.25、7.26、7.27、7.28;7.29、7.30、7.31、7.32、7.33、7.34、7.35、7.36、
7.37、7.38、7.39、7.40、7.41、7.42、7.43、7.44、7.45、7.46、7.47、7.48、7.49、7.50、7.51、
7.52、7.53、7.54、7.55、7.56、7.57、7.58、7.59、7.60、7.61、7.62、7.63、7.64、7.65、7.66、
7.67、7.68、7.69、7.70、7.71、7.72、7.73、7.74、7.75、7.76、7.77、7.78、7.79、7.80、7.81、
7.82、7.83、7.84、7.85、7.86、7.87、7.88、7.89、7.90、7.91、7.92、7.93、7.94、7.95、7.96、
7.97、7.98、7.99、7.100、7.101、7.102、7.103、7.104、7.105、7.106、7.107、7.108、7.109、
7.110、7.111、7.112、7.113、7.114、7.115、7.116、7.117、7.118、7.119、7.120、7.121、
7.122、7.123、7.124、7.125、7.126、7.127、7.128、7.129、7.130、7.131、7.132、7.133、
7.134、7.135、7.136;8.9、8.10、8.11、8.12、8.13、8.14、8.15、8.16、8.17、8.18、8.19、8.20、
8.21、8.22、8.23、8.24、8.25、8.26、8.27、8.28;8.29、8.30、8.31、8.32、8.33、8.34、8.35、
8.36、8.37、8.38、8.39、8.40、8.41、8.42、8.43、8.44、8.45、8.46、8.47、8.48、8.49、8.50、
8.51、8.52、8.53、8.54、8.55、8.56、8.57、8.58、8.59、8.60、8.61、8.62、8.63、8.64、8.65、
8.66、8.67、8.68、8.69、8.70、8.71、8.72、8.73、8.74、8.75、8.76、8.77、8.78、8.79、8.80、
8.81、8.82、8.83、8.84、8.85、8.86、8.87、8.88、8.89、8.90、8.91、8.92、8.93、8.94、8.95、
8.96、8.97、8.98、8.99、8.100、8.101、8.102、8.103、8.104、8.105、8.106、8.107、8.108、
8.109、8.110、8.111、8.112、8.113、8.114、8.115、8.116、8.117、8.118、8.119、8.120、
8.121、8.122、8.123、8.124、8.125、8.126、8.127、8.128、8.129、8.130、8.131、8.132、
8.133、8.134、8.135、8.136;9.10、9.11、9.12、9.13、9.14、9.15、9.16、9.17、9.18、9.19、
9.20、9.21、9.22、9.23、9.24、9.25、9.26、9.27、9.28;9.29、9.30、9.31、9.32、9.33、9.34、
9.35、9.36、9.37、9.38、9.39、9.40、9.41、9.42、9.43、9.44、9.45、9.46、9.47、9.48、9.49、
9.50、9.51、9.52、9.53、9.54、9.55、9.56、9.57、9.58、9.59、9.60、9.61、9.62、9.63、9.64、
9.65、9.66、9.67、9.68、9.69、9.70、9.71、9.72、9.73、9.74、9.75、9.76、9.77、9.78、9.79、
9.80、9.81、9.82、9.83、9.84、9.85、9.86、9.87、9.88、9.89、9.90、9.91、9.92、9.93、9.94、
9.95、9.96、9.97、9.98、9.99、9.100、9.101、9.102、9.103、9.104、9.105、9.106、9.107、
9.108、9.109、9.110、9.111、9.112、9.113、9.114、9.115、9.116、9.117、9.118、9.119、
9.120、9.121、9.122、9.123、9.124、9.125、9.126、9.127、9.128、9.129、9.130、9.131、
9.132、9.133、9.134、9.135、9.136;10.11、10.12、10.13、10.14、10.15、10.16、10.17、

10.18、10.19、10.20、10.21、10.22、10.23、10.24、10.25、10.26、10.27、10.28；10.29、10.30、10.31、10.32、10.33、10.34、10.35、10.36、10.37、10.38、10.39、10.40、10.41、10.42、10.43、10.44、10.45、10.46、10.47、10.48、10.49、10.50、10.51、10.52、10.53、10.54、10.55、10.56、10.57、10.58、10.59、10.60、10.61、10.62、10.63、10.64、10.65、10.66、10.67、10.68、10.69、10.70、10.71、10.72、10.73、10.74、10.75、10.76、10.77、10.78、10.79、10.80、10.81、10.82、10.83、10.84、10.85、10.86、10.87、10.88、10.89、10.90、10.91、10.92、10.93、10.94、10.95、10.96、10.97、10.98、10.99、10.100、10.101、10.102、10.103、10.104、10.105、10.106、10.107、10.108、10.109、10.110、10.111、10.112、10.113、10.114、10.115、10.116、10.117、10.118、10.119、10.120、10.121、10.122、10.123、10.124、10.125、10.126、10.127、10.128、10.129、10.130、10.131、10.132、10.133、10.134、10.135、10.136；11.12、11.13、11.14、11.15、11.16、11.17、11.18、11.19、11.20、11.21、11.22、11.23、11.24、11.25、11.26、11.27、11.28；11.29、11.30、11.31、11.32、11.33、11.34、11.35、11.36、11.37、11.38、11.39、11.40、11.41、11.42、11.43、11.44、11.45、11.46、11.47、11.48、11.49、11.50、11.51、11.52、11.53、11.54、11.55、11.56、11.57、11.58、11.59、11.60、11.61、11.62、11.63、11.64、11.65、11.66、11.67、11.68、11.69、11.70、11.71、11.72、11.73、11.74、11.75、11.76、11.77、11.78、11.79、11.80、11.81、11.82、11.83、11.84、11.85、11.86、11.87、11.88、11.89、11.90、11.91、11.92、11.93、11.94、11.95、11.96、11.97、11.98、11.99、11.100、11.101、11.102、11.103、11.104、11.105、11.106、11.107、11.108、11.109、11.110、11.111、11.112、11.113、11.114、11.115、11.116、11.117、11.118、11.119、11.120、11.121、11.122、11.123、11.124、11.125、11.126、11.127、11.128、11.129、11.130、11.131、11.132、11.133、11.134、11.135、11.136；12.13、12.14、12.15、12.16、12.17、12.18、12.19、12.20、12.21、12.22、12.23、12.24、12.25、12.26、12.27、12.28；12.29、12.30、12.31、12.32、12.33、12.34、12.35、12.36、12.37、12.38、12.39、12.40、12.41、12.42、12.43、12.44、12.45、12.46、12.47、12.48、12.49、12.50、12.51、12.52、12.53、12.54、12.55、12.56、12.57、12.58、12.59、12.60、12.61、12.62、12.63、12.64、12.65、12.66、12.67、12.68、12.69、12.70、12.71、12.72、12.73、12.74、12.75、12.76、12.77、12.78、12.79、12.80、12.81、12.82、12.83、12.84、12.85、12.86、12.87、12.88、12.89、12.90、12.91、12.92、12.93、12.94、12.95、12.96、12.97、12.98、12.99、12.100、12.101、12.102、12.103、12.104、12.105、12.106、12.107、12.108、12.109、12.110、12.111、12.112、12.113、12.114、12.115、12.116、12.117、12.118、12.119、12.120、12.121、12.122、12.123、12.124、12.125、12.126、12.127、12.128、12.129、12.130、12.131、12.132、12.133、12.134、12.135、12.136；13.14、13.15、13.16、13.17、13.18、13.19、13.20、13.21、13.22、13.23、13.24、13.25、13.26、13.27、13.28；13.29、13.30、13.31、13.32、13.33、13.34、13.35、13.36、13.37、13.38、13.39、13.40、13.41、13.42、13.43、13.44、13.45、13.46、13.47、13.48、13.49、13.50、13.51、13.52、13.53、13.54、13.55、13.56、13.57、13.58、13.59、13.60、13.61、13.62、13.63、13.64、13.65、13.66、13.67、13.68、13.69、13.70、13.71、13.72、13.73、13.74、13.75、13.76、13.77、13.78、13.79、13.80、13.81、13.82、13.83、13.84、13.85、13.86、13.87、13.88、13.89、13.90、13.91、13.92、13.93、13.94、13.95、13.96、13.97、13.98、13.99、13.100、13.101、13.102、

13.103、13.104、13.105、13.106、13.107、13.108、13.109、13.110、13.111、13.112、13.113、
13.114、13.115、13.116、13.117、13.118、13.119、13.120、13.121、13.122、13.123、13.124、
13.125、13.126、13.127、13.128、13.129、13.130、13.131、13.132、13.133、13.134、13.135、
13.136;14.15、14.16、14.17、14.18、14.19、14.20、14.21、14.22、14.23、14.24、14.25、
14.26、14.27、14.28;14.29、14.30、14.31、14.32、14.33、14.34、14.35、14.36、14.37、
14.38、14.39、14.40、14.41、14.42、14.43、14.44、14.45、14.46、14.47、14.48、14.49、
14.50、14.51、14.52、14.53、14.54、14.55、14.56、14.57、14.58、14.59、14.60、14.61、
14.62、14.63、14.64、14.65、14.66、14.67、14.68、14.69、14.70、14.71、14.72、14.73、
14.74、14.75、14.76、14.77、14.78、14.79、14.80、14.81、14.82、14.83、14.84、14.85、
14.86、14.87、14.88、14.89、14.90、14.91、14.92、14.93、14.94、14.95、14.96、14.97、
14.98、14.99、14.100、14.101、14.102、14.103、14.104、14.105、14.106、14.107、14.108、
14.109、14.110、14.111、14.112、14.113、14.114、14.115、14.116、14.117、14.118、14.119、
14.120、14.121、14.122、14.123、14.124、14.125、14.126、14.127、14.128、14.129、14.130、
14.131、14.132、14.133、14.134、14.135、14.136;15.16、15.17、15.18、15.19、15.20、
15.21、15.22、15.23、15.24、15.25、15.26、15.27、15.28;15.29、15.30、15.31、15.32、
15.33、15.34、15.35、15.36、15.37、15.38、15.39、15.40、15.41、15.42、15.43、15.44、
15.45、15.46、15.47、15.48、15.49、15.50、15.51、15.52、15.53、15.54、15.55、15.56、
15.57、15.58、15.59、15.60、15.61、15.62、15.63、15.64、15.65、15.66、15.67、15.68、
15.69、15.70、15.71、15.72、15.73、15.74、15.75、15.76、15.77、15.78、15.79、15.80、
15.81、15.82、15.83、15.84、15.85、15.86、15.87、15.88、15.89、15.90、15.91、15.92、
15.93、15.94、15.95、15.96、15.97、15.98、15.99、15.100、15.101、15.102、15.103、15.104、
15.105、15.106、15.107、15.108、15.109、15.110、15.111、15.112、15.113、15.114、15.115、
15.116、15.117、15.118、15.119、15.120、15.121、15.122、15.123、15.124、15.125、15.126、
15.127、15.128、15.129、15.130、15.131、15.132、15.133、15.134、15.135、15.136;16.17、
16.18、16.19、16.20、16.21、16.22、16.23、16.24、16.25、16.26、16.27、16.28;16.29、
16.30、16.31、16.32、16.33、16.34、16.35、16.36、16.37、16.38、16.39、16.40、16.41、
16.42、16.43、16.44、16.45、16.46、16.47、16.48、16.49、16.50、16.51、16.52、16.53、
16.54、16.55、16.56、16.57、16.58、16.59、16.60、16.61、16.62、16.63、16.64、16.65、
16.66、16.67、16.68、16.69、16.70、16.71、16.72、16.73、16.74、16.75、16.76、16.77、
16.78、16.79、16.80、16.81、16.82、16.83、16.84、16.85、16.86、16.87、16.88、16.89、
16.90、16.91、16.92、16.93、16.94、16.95、16.96、16.97、16.98、16.99、16.100、16.101、
16.102、16.103、16.104、16.105、16.106、16.107、16.108、16.109、16.110、16.111、16.112、
16.113、16.114、16.115、16.116、16.117、16.118、16.119、16.120、16.121、16.122、16.123、
16.124、16.125、16.126、16.127、16.128、16.129、16.130、16.131、16.132、16.133、16.134、
16.135、16.136;17.18、17.19、17.20、17.21、17.22、17.23、17.24、17.25、17.26、17.27、
17.28;17.29、17.30、17.31、17.32、17.33、17.34、17.35、17.36、17.37、17.38、17.39、
17.40、17.41、17.42、17.43、17.44、17.45、17.46、17.47、17.48、17.49、17.50、17.51、
17.52、17.53、17.54、17.55、17.56、17.57、17.58、17.59、17.60、17.61、17.62、17.63、
17.64、17.65、17.66、17.67、17.68、17.69、17.70、17.71、17.72、17.73、17.74、17.75、

17.76、17.77、17.78、17.79、17.80、17.81、17.82、17.83、17.84、17.85、17.86、17.87、
17.88、17.89、17.90、17.91、17.92、17.93、17.94、17.95、17.96、17.97、17.98、17.99、
17.100、17.101、17.102、17.103、17.104、17.105、17.106、17.107、17.108、17.109、17.110、
17.111、17.112、17.113、17.114、17.115、17.116、17.117、17.118、17.119、17.120、17.121、
17.122、17.123、17.124、17.125、17.126、17.127、17.128、17.129、17.130、17.131、17.132、
17.133、17.134、17.135、17.136;18.19、18.20、18.21、18.22、18.23、18.24、18.25、18.26、
18.27、18.28;18.29、18.30、18.31、18.32、18.33、18.34、18.35、18.36、18.37、18.38、
18.39、18.40、18.41、18.42、18.43、18.44、18.45、18.46、18.47、18.48、18.49、18.50、
18.51、18.52、18.53、18.54、18.55、18.56、18.57、18.58、18.59、18.60、18.61、18.62、
18.63、18.64、18.65、18.66、18.67、18.68、18.69、18.70、18.71、18.72、18.73、18.74、
18.75、18.76、18.77、18.78、18.79、18.80、18.81、18.82、18.83、18.84、18.85、18.86、
18.87、18.88、18.89、18.90、18.91、18.92、18.93、18.94、18.95、18.96、18.97、18.98、
18.99、18.100、18.101、18.102、18.103、18.104、18.105、18.106、18.107、18.108、18.109、
18.110、18.111、18.112、18.113、18.114、18.115、18.116、18.117、18.118、18.119、18.120、
18.121、18.122、18.123、18.124、18.125、18.126、18.127、18.128、18.129、18.130、18.131、
18.132、18.133、18.134、18.135、18.136;19.20、19.21、19.22、19.23、19.24、19.25、19.26、
19.27、19.28;19.29、19.30、19.31、19.32、19.33、19.34、19.35、19.36、19.37、19.38、19.39、
19.40、19.41、19.42、19.43、19.44、19.45、19.46、19.47、19.48、19.49、19.50、19.51、
19.52、19.53、19.54、19.55、19.56、19.57、19.58、19.59、19.60、19.61、19.62、19.63、
19.64、19.65、19.66、19.67、19.68、19.69、19.70、19.71、19.72、19.73、19.74、19.75、
19.76、19.77、19.78、19.79、19.80、19.81、19.82、19.83、19.84、19.85、19.86、19.87、
19.88、19.89、19.90、19.91、19.92、19.93、19.94、19.95、19.96、19.97、19.98、19.99、
19.100、19.101、19.102、19.103、19.104、19.105、19.106、19.107、19.108、19.109、19.110、
19.111、19.112、19.113、19.114、19.115、19.116、19.117、19.118、19.119、19.120、19.121、
19.122、19.123、19.124、19.125、19.126、19.127、19.128、19.129、19.130、19.131、19.132、
19.133、19.134、19.135、19.136;20.21、20.22、20.23、20.24、20.25、20.26、20.27、20.28;
20.29、20.30、20.31、20.32、20.33、20.34、20.35、20.36、20.37、20.38、20.39、20.40、
20.41、20.42、20.43、20.44、20.45、20.46、20.47、20.48、20.49、20.50、20.51、20.52、
20.53、20.54、20.55、20.56、20.57、20.58、20.59、20.60、20.61、20.62、20.63、20.64、
20.65、20.66、20.67、20.68、20.69、20.70、20.71、20.72、20.73、20.74、20.75、20.76、
20.77、20.78、20.79、20.80、20.81、20.82、20.83、20.84、20.85、20.86、20.87、20.88、
20.89、20.90、20.91、20.92、20.93、20.94、20.95、20.96、20.97、20.98、20.99、20.100、
20.101、20.102、20.103、20.104、20.105、20.106、20.107、20.108、20.109、20.110、20.111、
20.112、20.113、20.114、20.115、20.116、20.117、20.118、20.119、20.120、20.121、20.122、
20.123、20.124、20.125、20.126、20.127、20.128、20.129、20.130、20.131、20.132、20.133、
20.134、20.135、20.136;21.22、21.23、21.24、21.25、21.26、21.27、21.28;21.29、21.30、
21.31、21.32、21.33、21.34、21.35、21.36、21.37、21.38、21.39、21.40、21.41、21.42、
21.43、21.44、21.45、21.46、21.47、21.48、21.49、21.50、21.51、21.52、21.53、21.54、
21.55、21.56、21.57、21.58、21.59、21.60、21.61、21.62、21.63、21.64、21.65、21.66、

21.67、21.68、21.69、21.70、21.71、21.72、21.73、21.74、21.75、21.76、21.77、21.78、
21.79、21.80、21.81、21.82、21.83、21.84、21.85、21.86、21.87、21.88、21.89、21.90、
21.91、21.92、21.93、21.94、21.95、21.96、21.97、21.98、21.99、21.100、21.101、21.102、
21.103、21.104、21.105、21.106、21.107、21.108、21.109、21.110、21.111、21.112、21.113、
21.114、21.115、21.116、21.117、21.118、21.119、21.120、21.121、21.122、21.123、21.124、
21.125、21.126、21.127、21.128、21.129、21.130、21.131、21.132、21.133、21.134、21.135、
21.136; 22.23、22.24、22.25、22.26、22.27、22.28; 22.29、22.30、22.31、22.32、22.33、
22.34、22.35、22.36、22.37、22.38、22.39、22.40、22.41、22.42、22.43、22.44、22.45、
22.46、22.47、22.48、22.49、22.50、22.51、22.52、22.53、22.54、22.55、22.56、22.57、
22.58、22.59、22.60、22.61、22.62、22.63、22.64、22.65、22.66、22.67、22.68、22.69、
22.70、22.71、22.72、22.73、22.74、22.75、22.76、22.77、22.78、22.79、22.80、22.81、
22.82、22.83、22.84、22.85、22.86、22.87、22.88、22.89、22.90、22.91、22.92、22.93、
22.94、22.95、22.96、22.97、22.98、22.99、22.100、22.101、22.102、22.103、22.104、
22.105、22.106、22.107、22.108、22.109、22.110、22.111、22.112、22.113、22.114、22.115、
22.116、22.117、22.118、22.119、22.120、22.121、22.122、22.123、22.124、22.125、22.126、
22.127、22.128、22.129、22.130、22.131、22.132、22.133、22.134、22.135、22.136; 23.24、
23.25、23.26、23.27、23.28; 23.29、23.30、23.31、23.32、23.33、23.34、23.35、23.36、
23.37、23.38、23.39、23.40、23.41、23.42、23.43、23.44、23.45、23.46、23.47、23.48、
23.49、23.50、23.51、23.52、23.53、23.54、23.55、23.56、23.57、23.58、23.59、23.60、
23.61、23.62、23.63、23.64、23.65、23.66、23.67、23.68、23.69、23.70、23.71、23.72、
23.73、23.74、23.75、23.76、23.77、23.78、23.79、23.80、23.81、23.82、23.83、23.84、
23.85、23.86、23.87、23.88、23.89、23.90、23.91、23.92、23.93、23.94、23.95、23.96、
23.97、23.98、23.99、23.100、23.101、23.102、23.103、23.104、23.105、23.106、23.107、
23.108、23.109、23.110、23.111、23.112、23.113、23.114、23.115、23.116、23.117、23.118、
23.119、23.120、23.121、23.122、23.123、23.124、23.125、23.126、23.127、23.128、23.129、
23.130、23.131、23.132、23.133、23.134、23.135、23.136; 24.25、24.26、24.27、24.28;
24.29、24.30、24.31、24.32、24.33、24.34、24.35、24.36、24.37、24.38、24.39、24.40、
24.41、24.42、24.43、24.44、24.45、24.46、24.47、24.48、24.49、24.50、24.51、24.52、
24.53、24.54、24.55、24.56、24.57、24.58、24.59、24.60、24.61、24.62、24.63、24.64、
24.65、24.66、24.67、24.68、24.69、24.70、24.71、24.72、24.73、24.74、24.75、24.76、
24.77、24.78、24.79、24.80、24.81、24.82、24.83、24.84、24.85、24.86、24.87、24.88、
24.89、24.90、24.91、24.92、24.93、24.94、24.95、24.96、24.97、24.98、24.99、24.100、
24.101、24.102、24.103、24.104、24.105、24.106、24.107、24.108、24.109、24.110、24.111、
24.112、24.113、24.114、24.115、24.116、24.117、24.118、24.119、24.120、24.121、24.122、
24.123、24.124、24.125、24.126、24.127、24.128、24.129、24.130、24.131、24.132、24.133、
24.134、24.135、24.136; 25.26、25.27、25.28; 25.29、25.30、25.31、25.32、25.33、25.34、
25.35、25.36、25.37、25.38、25.39、25.40、25.41、25.42、25.43、25.44、25.45、25.46、
25.47、25.48、25.49、25.50、25.51、25.52、25.53、25.54、25.55、25.56、25.57、25.58、
25.59、25.60、25.61、25.62、25.63、25.64、25.65、25.66、25.67、25.68、25.69、25.70、

25.71、25.72、25.73、25.74、25.75、25.76、25.77、25.78、25.79、25.80、25.81、25.82、
25.83、25.84、25.85、25.86、25.87、25.88、25.89、25.90、25.91、25.92、25.93、25.94、
25.95、25.96、25.97、25.98、25.99、25.100、25.101、25.102、25.103、25.104、25.105、
25.106、25.107、25.108、25.109、25.110、25.111、25.112、25.113、25.114、25.115、25.116、
25.117、25.118、25.119、25.120、25.121、25.122、25.123、25.124、25.125、26.126、26.127、
26.128、26.129、26.130、26.131、26.132、26.133、26.134、26.135、26.136;26.27、26.28;
26.29、26.30、26.31、26.32、26.33、26.34、26.35、26.36、26.37、26.38、26.39、26.40、
26.41、26.42、26.43、26.44、26.45、26.46、26.47、26.48、26.49、26.50、26.51、26.52、
26.53、26.54、26.55、26.56、26.57、26.58、26.59、26.60、26.61、26.62、26.63、26.64、
26.65、26.66、26.67、26.68、26.69、26.70、26.71、26.72、26.73、26.74、26.75、26.76、
26.77、26.78、26.79、26.80、26.81、26.82、26.83、26.84、26.85、26.86、26.87、26.88、
26.89、26.90、26.91、26.92、26.93、26.94、26.95、26.96、26.97、26.98、26.99、26.100、
26.101、26.102、26.103、26.104、26.105、26.106、26.107、26.108、26.109、26.110、26.111、
26.112、26.113、26.114、26.115、26.116、26.117、26.118、26.119、26.120、26.121、26.122、
26.123、26.124、26.125、26.126、26.127、26.128、26.129、26.130、26.131、26.132、26.133、
26.134、26.135、26.136;27.28;27.29、27.30、27.31、27.32、27.33、27.34、27.35、27.36、
27.37、27.38、27.39、27.40、27.41、27.42、27.43、27.44、27.45、27.46、27.47、27.48、
27.49、27.50、27.51、27.52、27.53、27.54、27.55、27.56、27.57、27.58、27.59、27.60、
27.61、27.62、27.63、27.64、27.65、27.66、27.67、27.68、27.69、27.70、27.71、27.72、
27.73、27.74、27.75、27.76、27.77、27.78、27.79、27.80、27.81、27.82、27.83、27.84、
27.85、27.86、27.87、27.88、27.89、27.90、27.91、27.92、27.93、27.94、27.95、27.96、
27.97、27.98、27.99、27.100、27.101、27.102、27.103、27.104、27.105、27.106、27.107、
27.108、27.109、27.110、27.111、27.112、27.113、27.114、27.115、27.116、27.117、27.118、
27.119、27.120、27.121、27.122、27.123、27.124、27.125、27.126、27.127、27.128、27.129、
27.130、27.131、27.132、27.133、27.134、27.135、27.136;28.29、28.30、28.31、28.32、
28.33、28.34、28.35、28.36、28.37、28.38、28.39、28.40、28.41、28.42、28.43、28.44、
28.45、28.46、28.47、28.48、28.49、28.50、28.51、28.52、28.53、28.54、28.55、28.56、
28.57、28.58、28.59、28.60、28.61、28.62、28.63、28.64、28.65、28.66、28.67、28.68、
28.69、28.70、28.71、28.72、28.73、28.74、28.75、28.76、28.77、28.78、28.79、28.80、
28.81、28.82、28.83、28.84、28.85、28.86、28.87、28.88、28.89、28.90、28.91、28.92、
28.93、28.94、28.95、28.96、28.97、28.98、28.99、28.100、28.101、28.102、28.103、28.104、
28.105、28.106、28.107、28.108、28.109、28.110、28.111、28.112、28.113、28.114、28.115、
28.116、28.117、28.118、28.119、28.120、28.121、28.122、28.123、28.124、28.125、28.126、
28.127、28.128、28.129、28.130、28.131、28.132、28.133、28.134、28.135、28.136;29.30、
29.31、29.32、29.33、29.34、29.35、29.36、29.37、29.38、29.39、29.40、29.41、29.42、
29.43、29.44、29.45、29.46、29.47、29.48、29.49、29.50、29.51、29.52、29.53、29.54、
29.55、29.56、29.57、29.58、29.59、29.60、29.61、29.62、29.63、29.64、29.65、29.66、
29.67、29.68、29.69、29.70、29.71、29.72、29.73、29.74、29.75、29.76、29.77、29.78、
29.79、29.80、29.81、29.82、29.83、29.84、29.85、29.86、29.87、29.88、29.89、29.90、

29.91、29.92、29.93、29.94、29.95、29.96、29.97、29.98、29.99、29.100、29.101、29.102、
29.103、29.104、29.105、29.106、29.107、29.108、29.109、29.110、29.111、29.112、29.113、
29.114、29.115、29.116、29.117、29.118、29.119、29.120、29.121、29.122、29.123、29.124、
29.125、29.126、29.127、29.128、29.129、29.130、29.131、29.132、29.133、29.134、
29.135、29.136；30.31、30.32、30.33、30.34、30.35、30.36、30.37、30.38、30.39、30.40、
30.41、30.42、30.43、30.44、30.45、30.46、30.47、30.48、30.49、30.50、30.51、30.52、
30.53、30.54、30.55、30.56、30.57、30.58、30.59、30.60、30.61、30.62、30.63、30.64、
30.65、30.66、30.67、30.68、30.69、30.70、30.71、30.72、30.73、30.74、30.75、30.76、
30.77、30.78、30.79、30.80、30.81、30.82、30.83、30.84、30.85、30.86、30.87、30.88、
30.89、30.90、30.91、30.92、30.93、30.94、30.95、30.96、30.97、30.98、30.99、30.100、
30.101、30.102、30.103、30.104、30.105、30.106、30.107、30.108、30.109、30.110、30.111、
30.112、30.113、30.114、30.115、30.116、30.117、30.118、30.119、30.120、30.121、30.122、
30.123、30.124、30.125、30.126、30.127、30.128、30.129、30.130、30.131、30.132、30.133、
30.134、30.135、30.136；31.32、31.33、31.34、31.35、31.36、31.37、31.38、31.39、31.40、
31.41、31.42、31.43、31.44、31.45、31.46、31.47、31.48、31.49、31.50、31.51、31.52、
31.53、31.54、31.55、31.56、31.57、31.58、31.59、31.60、31.61、31.62、31.63、31.64、
31.65、31.66、31.67、31.68、31.69、31.70、31.71、31.72、31.73、31.74、31.75、31.76、
31.77、31.78、31.79、31.80、31.81、31.82、31.83、31.84、31.85、31.86、31.87、31.88、
31.89、31.90、31.91、31.92、31.93、31.94、31.95、31.96、31.97、31.98、31.99、31.100、
31.101、31.102、31.103、31.104、31.105、31.106、31.107、31.108、31.109、31.110、31.111、
31.112、31.113、31.114、31.115、31.116、31.117、31.118、31.119、31.120、31.121、31.122、
31.123、31.124、31.125、31.126、31.127、31.128、31.129、31.130、31.131、31.132、31.133、
31.134、31.135、31.136；32.33、32.34、32.35、32.36、32.37、32.38、32.39、32.40、32.41、
32.42、32.43、32.44、32.45、32.46、32.47、32.48、32.49、32.50、32.51、32.52、32.53、
32.54、32.55、32.56、32.57、32.58、32.59、32.60、32.61、32.62、32.63、32.64、32.65、
32.66、32.67、32.68、32.69、32.70、32.71、32.72、32.73、32.74、32.75、32.76、32.77、
32.78、32.79、32.80、32.81、32.82、32.83、32.84、32.85、32.86、32.87、32.88、32.89、
32.90、32.91、32.92、32.93、32.94、32.95、32.96、32.97、32.98、32.99、32.100、32.101、
32.102、32.103、32.104、32.105、32.106、32.107、32.108、32.109、32.110、32.111、32.112、
32.113、32.114、32.115、32.116、32.117、32.118、32.119、32.120、32.121、32.122、32.123、
32.124、32.125、32.126、32.127、32.128、32.129、32.130、32.131、32.132、32.133、32.134、
32.135、32.136；33.34、33.35、33.36、33.37、33.38、33.39、33.40、33.41、33.42、33.43、
33.44、33.45、33.46、33.47、33.48、33.49、33.50、33.51、33.52、33.53、33.54、33.55、
33.56、33.57、33.58、33.59、33.60、33.61、33.62、33.63、33.64、33.65、33.66、33.67、
33.68、33.69、33.70、33.71、33.72、33.73、33.74、33.75、33.76、33.77、33.78、33.79、
33.80、33.81、33.82、33.83、33.84、33.85、33.86、33.87、33.88、33.89、33.90、33.91、
33.92、33.93、33.94、33.95、33.96、33.97、33.98、33.99、33.100、33.101、33.102、33.103、
33.104、33.105、33.106、33.107、33.108、33.109、33.110、33.111、33.112、33.113、33.114、
33.115、33.116、33.117、33.118、33.119、33.120、33.121、33.122、33.123、33.124、33.125、

33.126、33.127、33.128、33.129、33.130、33.131、33.132、33.133、33.134、33.135、33.136、
34.35、34.36、34.37、34.38、34.39、34.40、34.41、34.42、34.43、34.44、34.45、34.46、
34.47、34.48、34.49、34.50、34.51、34.52、34.53、34.54、34.55、34.56、34.57、34.58、
34.59、34.60、34.61、34.62、34.63、34.64、34.65、34.66、34.67、34.68、34.69、34.70、
34.71、34.72、34.73、34.74、34.75、34.76、34.77、34.78、34.79、34.80、34.81、34.82、
34.83、34.84、34.85、34.86、34.87、34.88、34.89、34.90、34.91、34.92、34.93、34.94、
34.95、34.96、34.97、34.98、34.99、34.100、34.101、34.102、34.103、34.104、34.105、
34.106、34.107、34.108、34.109、34.110、34.111、34.112、34.113、34.114、34.115、34.116、
34.117、34.118、34.119、34.120、34.121、34.122、34.123、34.124、34.125、34.126、34.127、
34.128、34.129、34.130、34.131、34.132、34.133、34.134、34.135、34.136；35.36、35.37、
35.38、35.39、35.40、35.41、35.42、35.43、35.44、35.45、35.46、35.47、35.48、35.49、
35.50、35.51、35.52、35.53、35.54、35.55、35.56、35.57、35.58、35.59、35.60、35.61、
35.62、35.63、35.64、35.65、35.66、35.67、35.68、35.69、35.70、35.71、35.72、35.73、
35.74、35.75、35.76、35.77、35.78、35.79、35.80、35.81、35.82、35.83、35.84、35.85、
35.86、35.87、35.88、35.89、35.90、35.91、35.92、35.93、35.94、35.95、35.96、35.97、
35.98、35.99、35.100、35.101、35.102、35.103、35.104、35.105、35.106、35.107、35.108、
35.109、35.110、35.111、35.112、35.113、35.114、35.115、35.116、35.117、35.118、35.119、
35.120、35.121、35.122、35.123、35.124、35.125、35.126、35.127、35.128、35.129、35.130、
35.131、35.132、35.133、35.134、35.135、35.136；36.37、36.38、36.39、36.40、36.41、
36.42、36.43、36.44、36.45、36.46、36.47、36.48、36.49、36.50、36.51、36.52、36.53、
36.54、36.55、36.56、36.57、36.58、36.59、36.60、36.61、36.62、36.63、36.64、36.65、
36.66、36.67、36.68、36.69、36.70、36.71、36.72、36.73、36.74、36.75、36.76、36.77、
36.78、36.79、36.80、36.81、36.82、36.83、36.84、36.85、36.86、36.87、36.88、36.89、
36.90、36.91、36.92、36.93、36.94、36.95、36.96、36.97、36.98、36.99、36.100、36.101、
36.102、36.103、36.104、36.105、36.106、36.107、36.108、36.109、36.110、36.111、36.112、
36.113、36.114、36.115、36.116、36.117、36.118、36.119、36.120、36.121、36.122、36.123、
36.124、36.125、36.126、36.127、36.128、36.129、36.130、36.131、36.132、36.133、36.134、
36.135、36.136；37.38、37.39、37.40、37.41、37.42、37.43、37.44、37.45、37.46、37.47、
37.48、37.49、37.50、37.51、37.52、37.53、37.54、37.55、37.56、37.57、37.58、37.59、
37.60、37.61、37.62、37.63、37.64、37.65、37.66、37.67、37.68、37.69、37.70、37.71、
37.72、37.73、37.74、37.75、37.76、37.77、37.78、37.79、37.80、37.81、37.82、37.83、
37.84、37.85、37.86、37.87、37.88、37.89、37.90、37.91、37.92、37.93、37.94、37.95、
37.96、37.97、37.98、37.99、37.100、37.101、37.102、37.103、37.104、37.105、37.106、
37.107、37.108、37.109、37.110、37.111、37.112、37.113、37.114、37.115、37.116、37.117、
37.118、37.119、37.120、37.121、37.122、37.123、37.124、37.125、37.126、37.127、37.128、
37.129、37.130、37.131、37.132、37.133、37.134、37.135、37.136；38.39、38.40、38.41、
38.42、38.43、38.44、38.45、38.46、38.47、38.48、38.49、38.50、38.51、38.52、38.53、
38.54、38.55、38.56、38.57、38.58、38.59、38.60、38.61、38.62、38.63、38.64、38.65、
38.66、38.67、38.68、38.69、38.70、38.71、38.72、38.73、38.74、38.75、38.76、38.77、

38.78、38.79、38.80、38.81、38.82、38.83、38.84、38.85、38.86、38.87、38.88、38.89、
38.90、38.91、38.92、38.93、38.94、38.95、38.96、38.97、38.98、38.99、38.100、38.101、
38.102、38.103、38.104、38.105、38.106、38.107、38.108、38.109、38.110、38.111、38.112、
38.113、38.114、38.115、38.116、38.117、38.118、38.119、38.120、38.121、38.122、38.123、
38.124、38.125、38.126、38.127、38.128、38.129、38.130、38.131、38.132、38.133、38.134、
38.135、38.136;39.40、39.41、39.42、39.43、39.44、39.45、39.46、39.47、39.48、39.49、
39.50、39.51、39.52、39.53、39.54、39.55、39.56、39.57、39.58、39.59、39.60、39.61、
39.62、39.63、39.64、39.65、39.66、39.67、39.68、39.69、39.70、39.71、39.72、39.73、
39.74、39.75、39.76、39.77、39.78、39.79、39.80、39.81、39.82、39.83、39.84、39.85、
39.86、39.87、39.88、39.89、39.90、39.91、39.92、39.93、39.94、39.95、39.96、39.97、
39.98、39.99、39.100、39.101、39.102、39.103、39.104、39.105、39.106、39.107、39.108、
39.109、39.110、39.111、39.112、39.113、39.114、39.115、39.116、39.117、39.118、39.119、
39.120、39.121、39.122、39.123、39.124、39.125、39.126、39.127、39.128、39.129、39.130、
39.131、39.132、39.133、39.134、39.135、39.136;40.41、40.42、40.43、40.44、40.45、
40.46、40.47、40.48、40.49、40.50、40.51、40.52、40.53、40.54、40.55、40.56、40.57、
40.58、40.59、40.60、40.61、40.62、40.63、40.64、40.65、40.66、40.67、40.68、40.69、
40.70、40.71、40.72、40.73、40.74、40.75、40.76、40.77、40.78、40.79、40.80、40.81、
40.82、40.83、40.84、40.85、40.86、40.87、40.88、40.89、40.90、40.91、40.92、40.93、
40.94、40.95、40.96、40.97、40.98、40.99、40.100、40.101、40.102、40.103、40.104、
40.105、40.106、40.107、40.108、40.109、40.110、40.111、40.112、40.113、40.114、40.115、
40.116、40.117、40.118、40.119、40.120、40.121、40.122、40.123、40.124、40.125、40.126、
40.127、40.128、40.129、40.130、40.131、40.132、40.133、40.134、40.135、40.136;41.42、
41.43、41.44、41.45、41.46、41.47、41.48、41.49、41.50、41.51、41.52、41.53、41.54、
41.55、41.56、41.57、41.58、41.59、41.60、41.61、41.62、41.63、41.64、41.65、41.66、
41.67、41.68、41.69、41.70、41.71、41.72、41.73、41.74、41.75、41.76、41.77、41.78、
41.79、41.80、41.81、41.82、41.83、41.84、41.85、41.86、41.87、41.88、41.89、41.90、
41.91、41.92、41.93、41.94、41.95、41.96、41.97、41.98、41.99、41.100、41.101、41.102、
41.103、41.104、41.105、41.106、41.107、41.108、41.109、41.110、41.111、41.112、41.113、
41.114、41.115、41.116、41.117、41.118、41.119、41.120、41.121、41.122、41.123、41.124、
41.125、41.126、41.127、41.128、41.129、41.130、41.131、41.132、41.133、41.134、41.135、
41.136;42.43、42.44、42.45、42.46、42.47、42.48、42.49、42.50、42.51、42.52、42.53、
42.54、42.55、42.56、42.57、42.58、42.59、42.60、42.61、42.62、42.63、42.64、42.65、
42.66、42.67、42.68、42.69、42.70、42.71、42.72、42.73、42.74、42.75、42.76、42.77、
42.78、42.79、42.80、42.81、42.82、42.83、42.84、42.85、42.86、42.87、42.88、42.89、
42.90、42.91、42.92、42.93、42.94、42.95、42.96、42.97、42.98、42.99、42.100、42.101、
42.102、42.103、42.104、42.105、42.106、42.107、42.108、42.109、42.110、42.111、42.112、
42.113、42.114、42.115、42.116、42.117、42.118、42.119、42.120、42.121、42.122、42.123、
42.124、42.125、42.126、42.127、42.128、42.129、42.130、42.131、42.132、42.133、42.134、
42.135、42.136;43.44、43.45、43.46、43.47、43.48、43.49、43.50、43.51、43.52、43.53、

43.54、43.55、43.56、43.57、43.58、43.59、43.60、43.61、43.62、43.63、43.64、43.65、
43.66、43.67、43.68、43.69、43.70、43.71、43.72、43.73、43.74、43.75、43.76、43.77、
43.78、43.79、43.80、43.81、43.82、43.83、43.84、43.85、43.86、43.87、43.88、43.89、
43.90、43.91、43.92、43.93、43.94、43.95、43.96、43.97、43.98、43.99、43.100、43.101、
43.102、43.103、43.104、43.105、43.106、43.107、43.108、43.109、43.110、43.111、43.112、
43.113、43.114、43.115、43.116、43.117、43.118、43.119、43.120、43.121、43.122、43.123、
43.124、43.125、43.126、43.127、43.128、43.129、43.130、43.131、43.132、43.133、43.134、
43.135、43.136；44.45、44.46、44.47、44.48、44.49、44.50、44.51、44.52、44.53、44.54、
44.55、44.56、44.57、44.58、44.59、44.60、44.61、44.62、44.63、44.64、44.65、44.66、
44.67、44.68、44.69、44.70、44.71、44.72、44.73、44.74、44.75、44.76、44.77、44.78、
44.79、44.80、44.81、44.82、44.83、44.84、44.85、44.86、44.87、44.88、44.89、44.90、
44.91、44.92、44.93、44.94、44.95、44.96、44.97、44.98、44.99、44.100、44.101、44.102、
44.103、44.104、44.105、44.106、44.107、44.108、44.109、44.110、44.111、44.112、44.113、
44.114、44.115、44.116、44.117、44.118、44.119、44.120、44.121、44.122、44.123、44.124、
44.125、44.126、44.127、44.128、44.129、44.130、44.131、44.132、44.133、44.134、44.135、
44.136；45.46、45.47、45.48、45.49、45.50、45.51、45.52、45.53、45.54、45.55、45.56、
45.57、45.58、45.59、45.60、45.61、45.62、45.63、45.64、45.65、45.66、45.67、45.68、
45.69、45.70、45.71、45.72、45.73、45.74、45.75、45.76、45.77、45.78、45.79、45.80、
45.81、45.82、45.83、45.84、45.85、45.86、45.87、45.88、45.89、45.90、45.91、45.92、
45.93、45.94、45.95、45.96、45.97、45.98、45.99、45.100、45.101、45.102、45.103、45.104、
45.105、45.106、45.107、45.108、45.109、45.110、45.111、45.112、45.113、45.114、45.115、
45.116、45.117、45.118、45.119、45.120、45.121、45.122、45.123、45.124、45.125、45.126、
45.127、45.128、45.129、45.130、45.131、45.132、45.133、45.134、45.135、45.136；46.47、
46.48、46.49、46.50、46.51、46.52、46.53、46.54、46.55、46.56、46.57、46.58、46.59、
46.60、46.61、46.62、46.63、46.64、46.65、46.66、46.67、46.68、46.69、46.70、46.71、
46.72、46.73、46.74、46.75、46.76、46.77、46.78、46.79、46.80、46.81、46.82、46.83、
46.84、46.85、46.86、46.87、46.88、46.89、46.90、46.91、46.92、46.93、46.94、46.95、
46.96、46.97、46.98、46.99、46.100、46.101、46.102、46.103、46.104、46.105、46.106、
46.107、46.108、46.109、46.110、46.111、46.112、46.113、46.114、46.115、46.116、46.117、
46.118、46.119、46.120、46.121、46.122、46.123、46.124、46.125、46.126、46.127、46.128、
46.129、46.130、46.131、46.132、46.133、46.134、46.135、46.136；47.48、47.49、47.50、
47.51、47.52、47.53、47.54、47.55、47.56、47.57、47.58、47.59、47.60、47.61、47.62、
47.63、47.64、47.65、47.66、47.67、47.68、47.69、47.70、47.71、47.72、47.73、47.74、
47.75、47.76、47.77、47.78、47.79、47.80、47.81、47.82、47.83、47.84、47.85、47.86、
47.87、47.88、47.89、47.90、47.91、47.92、47.93、47.94、47.95、47.96、47.97、47.98、
47.99、47.100、47.101、47.102、47.103、47.104、47.105、47.106、47.107、47.108、47.109、
47.110、47.111、47.112、47.113、47.114、47.115、47.116、47.117、47.118、47.119、47.120、
47.121、47.122、47.123、47.124、47.125、47.126、47.127、47.128、47.129、47.130、47.131、
47.132、47.133、47.134、47.135、47.136；48.49、48.50、48.51、48.52、48.53、48.54、48.55、

48.56、48.57、48.58、48.59、48.60、48.61、48.62、48.63、48.64、48.65、48.66、48.67、48.68、48.69、48.70、48.71、48.72、48.73、48.74、48.75、48.76、48.77、48.78、48.79、48.80、48.81、48.82、48.83、48.84、48.85、48.86、48.87、48.88、48.89、48.90、48.91、48.92、48.93、48.94、48.95、48.96、48.97、48.98、48.99、48.100、48.101、48.102、48.103、48.104、48.105、48.106、48.107、48.108、48.109、48.110、48.111、48.112、48.113、48.114、48.115、48.116、48.117、48.118、48.119、48.120、48.121、48.122、48.123、48.124、48.125、48.126、48.127、48.128、48.129、48.130、48.131、48.132、48.133、48.134、48.135、48.136；49.50、49.51、49.52、49.53、49.54、49.55、49.56、49.57、49.58、49.59、49.60、49.61、49.62、49.63、49.64、49.65、49.66、49.67、49.68、49.69、49.70、49.71、49.72、49.73、49.74、49.75、49.76、49.77、49.78、49.79、49.80、49.81、49.82、49.83、49.84、49.85、49.86、49.87、49.88、49.89、49.90、49.91、49.92、49.93、49.94、49.95、49.96、49.97、49.98、49.99、49.100、49.101、49.102、49.103、49.104、49.105、49.106、49.107、49.108、49.109、49.110、49.111、49.112、49.113、49.114、49.115、49.116、49.117、49.118、49.119、49.120、49.121、49.122、49.123、49.124、49.125、49.126、49.127、49.128、49.129、49.130、49.131、49.132、49.133、49.134、49.135、49.136；50.51、50.52、50.53、50.54、50.55、50.56、50.57、50.58、50.59、50.60、50.61、50.62、50.63、50.64、50.65、50.66、50.67、50.68、50.69、50.70、50.71、50.72、50.73、50.74、50.75、50.76、50.77、50.78、50.79、50.80、50.81、50.82、50.83、50.84、50.85、50.86、50.87、50.88、50.89、50.90、50.91、50.92、50.93、50.94、50.95、50.96、50.97、50.98、50.99、50.100、50.101、50.102、50.103、50.104、50.105、50.106、50.107、50.108、50.109、50.110、50.111、50.112、50.113、50.114、50.115、50.116、50.117、50.118、50.119、50.120、50.121、50.122、50.123、50.124、50.125、50.126、50.127、50.128、50.129、50.130、50.131、50.132、50.133、50.134、50.135、50.136；51.52、51.53、51.54、51.55、51.56、51.57、51.58、51.59、51.60、51.61、51.62、51.63、51.64、51.65、51.66、51.67、51.68、51.69、51.70、51.71、51.72、51.73、51.74、51.75、51.76、51.77、51.78、51.79、51.80、51.81、51.82、51.83、51.84、51.85、51.86、51.87、51.88、51.89、51.90、51.91、51.92、51.93、51.94、51.95、51.96、51.97、51.98、51.99、51.100、51.101、51.102、51.103、51.104、51.105、51.106、51.107、51.108、51.109、51.110、51.111、51.112、51.113、51.114、51.115、51.116、51.117、51.118、51.119、51.120、51.121、51.122、51.123、51.124、51.125、51.126、51.127、51.128、51.129、51.130、51.131、51.132、51.133、51.134、51.135、51.136；52.53、52.54、52.55、52.56、52.57、52.58、52.59、52.60、52.61、52.62、52.63、52.64、52.65、52.66、52.67、52.68、52.69、52.70、52.71、52.72、52.73、52.74、52.75、52.76、52.77、52.78、52.79、52.80、52.81、52.82、52.83、52.84、52.85、52.86、52.87、52.88、52.89、52.90、52.91、52.92、52.93、52.94、52.95、52.96、52.97、52.98、52.99、52.100、52.101、52.102、52.103、52.104、52.105、52.106、52.107、52.108、52.109、52.110、52.111、52.112、52.113、52.114、52.115、52.116、52.117、52.118、52.119、52.120、52.121、52.122、52.123、52.124、52.125、52.126、52.127、52.128、52.129、52.130、52.131、52.132、52.133、52.134、52.135、52.136；53.54、53.55、53.56、53.57、53.58、53.59、53.60、53.61、53.62、53.63、53.64、53.65、53.66、53.67、53.68、53.69、53.70、53.71、53.72、53.73、53.74、53.75、53.76、53.77、53.78、53.79、53.80、53.81、

53.82、53.83、53.84、53.85、53.86、53.87、53.88、53.89、53.90、53.91、53.92、53.93、
53.94、53.95、53.96、53.97、53.98、53.99、53.100、53.101、53.102、53.103、53.104、
53.105、53.106、53.107、53.108、53.109、53.110、53.111、53.112、53.113、53.114、53.115、
53.116、53.117、53.118、53.119、53.120、53.121、53.122、53.123、53.124、53.125、53.126、
53.127、53.128、53.129、53.130、53.131、53.132、53.133、53.134、53.135、53.136；54.55、
54.56、54.57、54.58、54.59、54.60、54.61、54.62、54.63、54.64、54.65、54.66、54.67、
54.68、54.69、54.70、54.71、54.72、54.73、54.74、54.75、54.76、54.77、54.78、54.79、
54.80、54.81、54.82、54.83、54.84、54.85、54.86、54.87、54.88、54.89、54.90、54.91、
54.92、54.93、54.94、54.95、54.96、54.97、54.98、54.99、54.100、54.101、54.102、54.103、
54.104、54.105、54.106、54.107、54.108、54.109、54.110、54.111、54.112、54.113、54.114、
54.115、54.116、54.117、54.118、54.119、54.120、54.121、54.122、54.123、54.124、54.125、
54.126、54.127、54.128、54.129、54.130、54.131、54.132、54.133、54.134、54.135、54.136；
55.56、55.57、55.58、55.59、55.60、55.61、55.62、55.63、55.64、55.65、55.66、55.67、
55.68、55.69、55.70、55.71、55.72、55.73、55.74、55.75、55.76、55.77、55.78、55.79、
55.80、55.81、55.82、55.83、55.84、55.85、55.86、55.87、55.88、55.89、55.90、55.91、
55.92、55.93、55.94、55.95、55.96、55.97、55.98、55.99、55.100、55.101、55.102、55.103、
55.104、55.105、55.106、55.107、55.108、55.109、55.110、55.111、55.112、55.113、55.114、
55.115、55.116、55.117、55.118、55.119、55.120、55.121、55.122、55.123、55.124、55.125、
55.126、55.127、55.128、55.129、55.130、55.131、55.132、55.133、55.134、55.135、55.136；
56.57、56.58、56.59、56.60、56.61、56.62、56.63、56.64、56.65、56.66、56.67、56.68、
56.69、56.70、56.71、56.72、56.73、56.74、56.75、56.76、56.77、56.78、56.79、56.80、
56.81、56.82、56.83、56.84、56.85、56.86、56.87、56.88、56.89、56.90、56.91、56.92、
56.93、56.94、56.95、56.96、56.97、56.98、56.99、56.100、56.101、56.102、56.103、56.104、
56.105、56.106、56.107、56.108、56.109、56.110、56.111、56.112、56.113、56.114、56.115、
56.116、56.117、56.118、56.119、56.120、56.121、56.122、56.123、56.124、56.125、56.126、
56.127、56.128、56.129、56.130、56.131、56.132、56.133、56.134、56.135、56.136；57.58、
57.59、57.60、57.61、57.62、57.63、57.64、57.65、57.66、57.67、57.68、57.69、57.70、
57.71、57.72、57.73、57.74、57.75、57.76、57.77、57.78、57.79、57.80、57.81、57.82、
57.83、57.84、57.85、57.86、57.87、57.88、57.89、57.90、57.91、57.92、57.93、57.94、
57.95、57.96、57.97、57.98、57.99、57.100、57.101、57.102、57.103、57.104、57.105、
57.106、57.107、57.108、57.109、57.110、57.111、57.112、57.113、57.114、57.115、57.116、
57.117、57.118、57.119、57.120、57.121、57.122、57.123、57.124、57.125、57.126、57.127、
57.128、57.129、57.130、57.131、57.132、57.133、57.134、57.135、57.136；58.59、58.60、
58.61、58.62、58.63、58.64、58.65、58.66、58.67、58.68、58.69、58.70、58.71、58.72、
58.73、58.74、58.75、58.76、58.77、58.78、58.79、58.80、58.81、58.82、58.83、58.84、
58.85、58.86、58.87、58.88、58.89、58.90、58.91、58.92、58.93、58.94、58.95、58.96、
58.97、58.98、58.99、58.100、58.101、58.102、58.103、58.104、58.105、58.106、58.107、
58.108、58.109、58.110、58.111、58.112、58.113、58.114、58.115、58.116、58.117、58.118、
58.119、58.120、58.121、58.122、58.123、58.124、58.125、58.126、58.127、58.128、58.129、

58.130、58.131、58.132、58.133、58.134、58.135、58.136；59.60、59.61、59.62、59.63、59.64、59.65、59.66、59.67、59.68、59.69、59.70、59.71、59.72、59.73、59.74、59.75、59.76、59.77、59.78、59.79、59.80、59.81、59.82、59.83、59.84、59.85、59.86、59.87、59.88、59.89、59.90、59.91、59.92、59.93、59.94、59.95、59.96、59.97、59.98、59.99、59.100、59.101、59.102、59.103、59.104、59.105、59.106、59.107、59.108、59.109、59.110、59.111、59.112、59.113、59.114、59.115、59.116、59.117、59.118、59.119、59.120、59.121、59.122、59.123、59.124、59.125、59.126、59.127、59.128、59.129、59.130、59.131、59.132、59.133、59.134、59.135、59.136；60.61、60.62、60.63、60.64、60.65、60.66、60.67、60.68、60.69、60.70、60.71、60.72、60.73、60.74、60.75、60.76、60.77、60.78、60.79、60.80、60.81、60.82、60.83、60.84、60.85、60.86、60.87、60.88、60.89、60.90、60.91、60.92、60.93、60.94、60.95、60.96、60.97、60.98、60.99、60.100、60.101、60.102、60.103、60.104、60.105、60.106、60.107、60.108、60.109、60.110、60.111、60.112、60.113、60.114、60.115、60.116、60.117、60.118、60.119、60.120、60.121、60.122、60.123、60.124、60.125、60.126、60.127、60.128、60.129、60.130、60.131、60.132、60.133、60.134、60.135、60.136；61.62、61.63、61.64、61.65、61.66、61.67、61.68、61.69、61.70、61.71、61.72、61.73、61.74、61.75、61.76、61.77、61.78、61.79、61.80、61.81、61.82、61.83、61.84、61.85、61.86、61.87、61.88、61.89、61.90、61.91、61.92、61.93、61.94、61.95、61.96、61.97、61.98、61.99、61.100、61.101、61.102、61.103、61.104、61.105、61.106、61.107、61.108、61.109、61.110、61.111、61.112、61.113、61.114、61.115、61.116、61.117、61.118、61.119、61.120、61.121、61.122、61.123、61.124、61.125、61.126、61.127、61.128、61.129、61.130、61.131、61.132、61.133、61.134、61.135、61.136；62.63、62.64、62.65、62.66、62.67、62.68、62.69、62.70、62.71、62.72、62.73、62.74、62.75、62.76、62.77、62.78、62.79、62.80、62.81、62.82、62.83、62.84、62.85、62.86、62.87、62.88、62.89、62.90、62.91、62.92、62.93、62.94、62.95、62.96、62.97、62.98、62.99、62.100、62.101、62.102、62.103、62.104、62.105、62.106、62.107、62.108、62.109、62.110、62.111、62.112、62.113、62.114、62.115、62.116、62.117、62.118、62.119、62.120、62.121、62.122、62.123、62.124、62.125、62.126、62.127、62.128、62.129、62.130、62.131、62.132、62.133、62.134、62.135、62.136；63.64、63.65、63.66、63.67、63.68、63.69、63.70、63.71、63.72、63.73、63.74、63.75、63.76、63.77、63.78、63.79、63.80、63.81、63.82、63.83、63.84、63.85、63.86、63.87、63.88、63.89、63.90、63.91、63.92、63.93、63.94、63.95、63.96、63.97、63.98、63.99、63.100、63.101、63.102、63.103、63.104、63.105、63.106、63.107、63.108、63.109、63.110、63.111、63.112、63.113、63.114、63.115、63.116、63.117、63.118、63.119、63.120、63.121、63.122、63.123、63.124、63.125、63.126、63.127、63.128、63.129、63.130、63.131、63.132、63.133、63.134、63.135、63.136；64.65、64.66、64.67、64.68、64.69、64.70、64.71、64.72、64.73、64.74、64.75、64.76、64.77、64.78、64.79、64.80、64.81、64.82、64.83、64.84、64.85、64.86、64.87、64.88、64.89、64.90、64.91、64.92、64.93、64.94、64.95、64.96、64.97、64.98、64.99、64.100、64.101、64.102、64.103、64.104、64.105、64.106、64.107、64.108、64.109、64.110、64.111、64.112、64.113、64.114、64.115、64.116、64.117、64.118、64.119、64.120、64.121、64.122、64.123、64.124、64.125、64.126、64.127、64.128、64.129、64.130、

64.131、64.132、64.133、64.134、64.135、64.136;65.66、65.67、65.68、65.69、65.70、65.71、65.72、65.73、65.74、65.75、65.76、65.77、65.78、65.79、65.80、65.81、65.82、65.83、65.84、65.85、65.86、65.87、65.88、65.89、65.90、65.91、65.92、65.93、65.94、65.95、65.96、65.97、65.98、65.99、65.100、65.101、65.102、65.103、65.104、65.105、65.106、65.107、65.108、65.109、65.110、65.111、65.112、65.113、65.114、65.115、65.116、65.117、65.118、65.119、65.120、65.121、65.122、65.123、65.124、65.125、65.126、65.127、65.128、65.129、65.130、65.131、65.132、65.133、65.134、65.135、65.136;66.67、66.68、66.69、66.70、66.71、66.72、66.73、66.74、66.75、66.76、66.77、66.78、66.79、66.80、66.81、66.82、66.83、66.84、66.85、66.86、66.87、66.88、66.89、66.90、66.91、66.92、66.93、66.94、66.95、66.96、66.97、66.98、66.99、66.100、66.101、66.102、66.103、66.104、66.105、66.106、66.107、66.108、66.109、66.110、66.111、66.112、66.113、66.114、66.115、66.116、66.117、66.118、66.119、66.120、66.121、66.122、66.123、66.124、66.125、66.126、66.127、66.128、66.129、66.130、66.131、66.132、66.133、66.134、66.135、66.136;67.68、67.69、67.70、67.71、67.72、67.73、67.74、67.75、67.76、67.77、67.78、67.79、67.80、67.81、67.82、67.83、67.84、67.85、67.86、67.87、67.88、67.89、67.90、67.91、67.92、67.93、67.94、67.95、67.96、67.97、67.98、67.99、67.100、67.101、67.102、67.103、67.104、67.105、67.106、67.107、67.108、67.109、67.110、67.111、67.112、67.113、67.114、67.115、67.116、67.117、67.118、67.119、67.120、67.121、67.122、67.123、67.124、67.125、67.126、67.127、67.128、67.129、67.130、67.131、67.132、67.133、67.134、67.135、67.136;68.69、68.70、68.71、68.72、68.73、68.74、68.75、68.76、68.77、68.78、68.79、68.80、68.81、68.82、68.83、68.84、68.85、68.86、68.87、68.88、68.89、68.90、68.91、68.92、68.93、68.94、68.95、68.96、68.97、68.98、68.99、68.100、68.101、68.102、68.103、68.104、68.105、68.106、68.107、68.108、68.109、68.110、68.111、68.112、68.113、68.114、68.115、68.116、68.117、68.118、68.119、68.120、68.121、68.122、68.123、68.124、68.125、68.126、68.127、68.128、68.129、68.130、68.131、68.132、68.133、68.134、68.135、68.136;69.70、69.71、69.72、69.73、69.74、69.75、69.76、69.77、69.78、69.79、69.80、69.81、69.82、69.83、69.84、69.85、69.86、69.87、69.88、69.89、69.90、69.91、69.92、69.93、69.94、69.95、69.96、69.97、69.98、69.99、69.100、69.101、69.102、69.103、69.104、69.105、69.106、69.107、69.108、69.109、69.110、69.111、69.112、69.113、69.114、69.115、69.116、69.117、69.118、69.119、69.120、69.121、69.122、69.123、69.124、69.125、69.126、69.127、69.128、69.129、69.130、69.131、69.132、69.133、69.134、69.135、69.136;70.71、70.72、70.73、70.74、70.75、70.76、70.77、70.78、70.79、70.80、70.81、70.82、70.83、70.84、70.85、70.86、70.87、70.88、70.89、70.90、70.91、70.92、70.93、70.94、70.95、70.96、70.97、70.98、70.99、70.100、70.101、70.102、70.103、70.104、70.105、70.106、70.107、70.108、70.109、70.110、70.111、70.112、70.113、70.114、70.115、70.116、70.117、70.118、70.119、70.120、70.121、70.122、70.123、70.124、70.125、70.126、70.127、70.128、70.129、70.130、70.131、70.132、70.133、70.134、70.135、70.136;71.72、71.73、71.74、71.75、71.76、71.77、71.78、71.79、71.80、71.81、71.82、71.83、71.84、71.85、71.86、71.87、71.88、71.89、71.90、71.91、71.92、71.93、71.94、71.95、71.96、71.97、71.98、71.99、

71.100、71.101、71.102、71.103、71.104、71.105、71.106、71.107、71.108、71.109、71.110、
71.111、71.112、71.113、71.114、71.115、71.116、71.117、71.118、71.119、71.120、71.121、
71.122、71.123、71.124、71.125、71.126、71.127、71.128、71.129、71.130、71.131、71.132、
71.133、71.134、71.135、71.136;72.73、72.74、72.75、72.76、72.77、72.78、72.79、72.80、
72.81、72.82、72.83、72.84、72.85、72.86、72.87、72.88、72.89、72.90、72.91、72.92、
72.93、72.94、72.95、72.96、72.97、72.98、72.99、72.100、72.101、72.102、72.103、72.104、
72.105、72.106、72.107、72.108、72.109、72.110、72.111、72.112、72.113、72.114、72.115、
72.116、72.117、72.118、72.119、72.120、72.121、72.122、72.123、72.124、72.125、72.126、
72.127、72.128、72.129、72.130、72.131、72.132、72.133、72.134、72.135、72.136;73.74、
73.75、73.76、73.77、73.78、73.79、73.80、73.81、73.82、73.83、73.84、73.85、73.86、
73.87、73.88、73.89、73.90、73.91、73.92、73.93、73.94、73.95、73.96、73.97、73.98、
73.99、73.100、73.101、73.102、73.103、73.104、73.105、73.106、73.107、73.108、73.109、
73.110、73.111、73.112、73.113、73.114、73.115、73.116、73.117、73.118、73.119、73.120、
73.121、73.122、73.123、73.124、73.125、73.126、73.127、73.128、73.129、73.130、73.131、
73.132、73.133、73.134、73.135、73.136;74.75、74.76、74.77、74.78、74.79、74.80、74.81、
74.82、74.83、74.84、74.85、74.86、74.87、74.88、74.89、74.90、74.91、74.92、74.93、
74.94、74.95、74.96、74.97、74.98、74.99、74.100、74.101、74.102、74.103、74.104、
74.105、74.106、74.107、74.108、74.109、74.110、74.111、74.112、74.113、74.114、74.115、
74.116、74.117、74.118、74.119、74.120、74.121、74.122、74.123、74.124、74.125、74.126、
74.127、74.128、74.129、74.130、74.131、74.132、74.133、74.134、74.135、74.136;75.76、
75.77、75.78、75.79、75.80、75.81、75.82、75.83、75.84、75.85、75.86、75.87、75.88、
75.89、75.90、75.91、75.92、75.93、75.94、75.95、75.96、75.97、75.98、75.99、75.100、
75.101、75.102、75.103、75.104、75.105、75.106、75.107、75.108、75.109、75.110、75.111、
75.112、75.113、75.114、75.115、75.116、75.117、75.118、75.119、75.120、75.121、75.122、
75.123、75.124、75.125、75.126、75.127、75.128、75.129、75.130、75.131、75.132、75.133、
75.134、75.135、75.136;76.77、76.78、76.79、76.80、76.81、76.82、76.83、76.84、76.85、
76.86、76.87、76.88、76.89、76.90、76.91、76.92、76.93、76.94、76.95、76.96、76.97、
76.98、76.99、76.100、76.101、76.102、76.103、76.104、76.105、76.106、76.107、76.108、
76.109、76.110、76.111、76.112、76.113、76.114、76.115、76.116、76.117、76.118、76.119、
76.120、76.121、76.122、76.123、76.124、76.125、76.126、76.127、76.128、76.129、76.130、
76.131、76.132、76.133、76.134、76.135、76.136;77.78、77.79、77.80、77.81、77.82、
77.83、77.84、77.85、77.86、77.87、77.88、77.89、77.90、77.91、77.92、77.93、77.94、
77.95、77.96、77.97、77.98、77.99、77.100、77.101、77.102、77.103、77.104、77.105、
77.106、77.107、77.108、77.109、77.110、77.111、77.112、77.113、77.114、77.115、77.116、
77.117、77.118、77.119、77.120、77.121、77.122、77.123、77.124、77.125、77.126、77.127、
77.128、77.129、77.130、77.131、77.132、77.133、77.134、77.135、77.136;78.79、78.80、
78.81、78.82、78.83、78.84、78.85、78.86、78.87、78.88、78.89、78.90、78.91、78.92、
78.93、78.94、78.95、78.96、78.97、78.98、78.99、78.100、78.101、78.102、78.103、78.104、
78.105、78.106、78.107、78.108、78.109、78.110、78.111、78.112、78.113、78.114、78.115、

78.116、78.117、78.118、78.119、78.120、78.121、78.122、78.123、78.124、78.125、78.126、78.127、78.128、78.129、78.130、78.131、78.132、78.133、78.134、78.135、78.136;79.80、79.81、79.82、79.83、79.84、79.85、79.86、79.87、79.88、79.89、79.90、79.91、79.92、79.93、79.94、79.95、79.96、79.97、79.98、79.99、79.100、79.101、79.102、79.103、79.104、79.105、79.106、79.107、79.108、79.109、79.110、79.111、79.112、79.113、79.114、79.115、79.116、79.117、79.118、79.119、79.120、79.121、79.122、79.123、79.124、79.125、79.126、79.127、79.128、79.129、79.130、79.131、79.132、79.133、79.134、79.135、79.136;80.81、80.82、80.83、80.84、80.85、80.86、80.87、80.88、80.89、80.90、80.91、80.92、80.93、80.94、80.95、80.96、80.97、80.98、80.99、80.100、80.101、80.102、80.103、80.104、80.105、80.106、80.107、80.108、80.109、80.110、80.111、80.112、80.113、80.114、80.115、80.116、80.117、80.118、80.119、80.120、80.121、80.122、80.123、80.124、80.125、80.126、80.127、80.128、80.129、80.130、80.131、80.132、80.133、80.134、80.135、80.136;81.82、81.83、81.84、81.85、81.86、81.87、81.88、81.89、81.90、81.91、81.92、81.93、81.94、81.95、81.96、81.97、81.98、81.99、81.100、81.101、81.102、81.103、81.104、81.105、81.106、81.107、81.108、81.109、81.110、81.111、81.112、81.113、81.114、81.115、81.116、81.117、81.118、81.119、81.120、81.121、81.122、81.123、81.124、81.125、81.126、81.127、81.128、81.129、81.130、81.131、81.132、81.133、81.134、81.135、81.136;82.83、82.84、82.85、82.86、82.87、82.88、82.89、82.90、82.91、82.92、82.93、82.94、82.95、82.96、82.97、82.98、82.99、82.100、82.101、82.102、82.103、82.104、82.105、82.106、82.107、82.108、82.109、82.110、82.111、82.112、82.113、82.114、82.115、82.116、82.117、82.118、82.119、82.120、82.121、82.122、82.123、82.124、82.125、82.126、82.127、82.128、82.129、82.130、82.131、82.132、82.133、82.134、82.135、82.136;83.84、83.85、83.86、83.87、83.88、83.89、83.90、83.91、83.92、83.93、83.94、83.95、83.96、83.97、83.98、83.99、83.100、83.101、83.102、83.103、83.104、83.105、83.106、83.107、83.108、83.109、83.110、83.111、83.112、83.113、83.114、83.115、83.116、83.117、83.118、83.119、83.120、83.121、83.122、83.123、83.124、83.125、83.126、83.127、83.128、83.129、83.130、83.131、83.132、83.133、83.134、83.135、83.136;84.85、84.86、84.87、84.88、84.89、84.90、84.91、84.92、84.93、84.94、84.95、84.96、84.97、84.98、84.99、84.100、84.101、84.102、84.103、84.104、84.105、84.106、84.107、84.108、84.109、84.110、84.111、84.112、84.113、84.114、84.115、84.116、84.117、84.118、84.119、84.120、84.121、84.122、84.123、84.124、84.125、84.126、84.127、84.128、84.129、84.130、84.131、84.132、84.133、84.134、84.135、84.136;85.86、85.87、85.88、85.89、85.90、85.91、85.92、85.93、85.94、85.95、85.96、85.97、85.98、85.99、85.100、85.101、85.102、85.103、85.104、85.105、85.106、85.107、85.108、85.109、85.110、85.111、85.112、85.113、85.114、85.115、85.116、85.117、85.118、85.119、85.120、85.121、85.122、85.123、85.124、85.125、85.126、85.127、85.128、85.129、85.130、85.131、85.132、85.133、85.134、85.135、85.136;86.87、86.88、86.89、86.90、86.91、86.92、86.93、86.94、86.95、86.96、86.97、86.98、86.99、86.100、86.101、86.102、86.103、86.104、86.105、86.106、86.107、86.108、86.109、86.110、86.111、86.112、86.113、86.114、86.115、86.116、86.117、86.118、86.119、86.120、86.121、86.122、86.123、86.124、86.125、86.126、

86.127、86.128、86.129、86.130、86.131、86.132、86.133、86.134、86.135、86.136；87.88、87.89、87.90、87.91、87.92、87.93、87.94、87.95、87.96、87.97、87.98、87.99、87.100、87.101、87.102、87.103、87.104、87.105、87.106、87.107、87.108、87.109、87.110、87.111、87.112、87.113、87.114、87.115、87.116、87.117、87.118、87.119、87.120、87.121、87.122、87.123、87.124、87.125、87.126、87.127、87.128、87.129、87.130、87.131、87.132、87.133、87.134、87.135、87.136；88.89、88.90、88.91、88.92、88.93、88.94、88.95、88.96、88.97、88.98、88.99、88.100、88.101、88.102、88.103、88.104、88.105、88.106、88.107、88.108、88.109、88.110、88.111、88.112、88.113、88.114、88.115、88.116、88.117、88.118、88.119、88.120、88.121、88.122、88.123、88.124、88.125、88.126、88.127、88.128、88.129、88.130、88.131、88.132、88.133、88.134、88.135、88.136；89.90、89.91、89.92、89.93、89.94、89.95、89.96、89.97、89.98、89.99、89.100、89.101、89.102、89.103、89.104、89.105、89.106、89.107、89.108、89.109、89.110、89.111、89.112、89.113、89.114、89.115、89.116、89.117、89.118、89.119、89.120、89.121、89.122、89.123、89.124、89.125、89.126、89.127、89.128、89.129、89.130、89.131、89.132、89.133、89.134、89.135、89.136；90.91、90.92、90.93、90.94、90.95、90.96、90.97、90.98、90.99、90.100、90.101、90.102、90.103、90.104、90.105、90.106、90.107、90.108、90.109、90.110、90.111、90.112、90.113、90.114、90.115、90.116、90.117、90.118、90.119、90.120、90.121、90.122、90.123、90.124、90.125、90.126、90.127、90.128、90.129、90.130、90.131、90.132、90.133、90.134、90.135、90.136；91.92、91.93、91.94、91.95、91.96、91.97、91.98、91.99、91.100、91.101、91.102、91.103、91.104、91.105、91.106、91.107、91.108、91.109、91.110、91.111、91.112、91.113、91.114、91.115、91.116、91.117、91.118、91.119、91.120、91.121、91.122、91.123、91.124、91.125、91.126、91.127、91.128、91.129、91.130、91.131、91.132、91.133、91.134、91.135、91.136；92.93、92.94、92.95、92.96、92.97、92.98、92.99、92.100、92.101、92.102、92.103、92.104、92.105、92.106、92.107、92.108、92.109、92.110、92.111、92.112、92.113、92.114、92.115、92.116、92.117、92.118、92.119、92.120、92.121、92.122、92.123、92.124、92.125、92.126、92.127、92.128、92.129、92.130、92.131、92.132、92.133、92.134、92.135、92.136；93.94、93.95、93.96、93.97、93.98、93.99、93.100、93.101、93.102、93.103、93.104、93.105、93.106、93.107、93.108、93.109、93.110、93.111、93.112、93.113、93.114、93.115、93.116、93.117、93.118、93.119、93.120、93.121、93.122、93.123、93.124、93.125、93.126、93.127、93.128、93.129、93.130、93.131、93.132、93.133、93.134、93.135、93.136；94.95、94.96、94.97、94.98、94.99、94.100、94.101、94.102、94.103、94.104、94.105、94.106、94.107、94.108、94.109、94.110、94.111、94.112、94.113、94.114、94.115、94.116、94.117、94.118、94.119、94.120、94.121、94.122、94.123、94.124、94.125、94.126、94.127、94.128、94.129、94.130、94.131、94.132、94.133、94.134、94.135、94.136；95.96、95.97、95.98、95.99、95.100、95.101、95.102、95.103、95.104、95.105、95.106、95.107、95.108、95.109、95.110、95.111、95.112、95.113、95.114、95.115、95.116、95.117、95.118、95.119、95.120、95.121、95.122、95.123、95.124、95.125、95.126、95.127、95.128、95.129、95.130、95.131、95.132、95.133、95.134、95.135、95.136；96.97、96.98、96.99、96.100、96.101、96.102、96.103、96.104、96.105、96.106、96.107、96.108、96.109、96.110、96.111、96.112、96.113、96.114、

96.115、96.116、96.117、96.118、96.119、96.120、96.121、96.122、96.123、96.124、96.125、
96.126、96.127、96.128、96.129、96.130、96.131、96.132、96.133、96.134、96.135、96.136；
97.98、97.99、97.100、97.101、97.102、97.103、97.104、97.105、97.106、97.107、97.108、
97.109、97.110、97.111、97.112、97.113、97.114、97.115、97.116、97.117、97.118、97.119、
97.120、97.121、97.122、97.123、97.124、97.125、97.126、97.127、97.128、97.129、97.130、
97.131、97.132、97.133、97.134、97.135、97.136；98.99、98.100、98.101、98.102、98.103、
98.104、98.105、98.106、98.107、98.108、98.109、98.110、98.111、98.112、98.113、98.114、
98.115、98.116、98.117、98.118、98.119、98.120、98.121、98.122、98.123、98.124、98.125、
98.126、98.127、98.128、98.129、98.130、98.131、98.132、98.133、98.134、98.135、98.136；
99.100、99.101、99.102、99.103、99.104、99.105、99.106、99.107、99.108、99.109、99.110、
99.111、99.112、99.113、99.114、99.115、99.116、99.117、99.118、99.119、99.120、99.121、
99.122、99.123、99.124、99.125、99.126、99.127、99.128、99.129、99.130、99.131、99.132、
99.133、99.134、99.135、99.136；100.101、100.102、100.103、100.104、100.105、100.106、
100.107、100.108、100.109、100.110、100.111、100.112、100.113、100.114、100.115、
100.116、100.117、100.118、100.119、100.120、100.121、100.122、100.123、100.124、
100.125、100.126、100.127、100.128、100.129、100.130、100.131、100.132、100.133、
100.134、100.135、100.136；101.102、101.103、101.104、101.105、101.106、101.107、
101.108、101.109、101.110、101.111、101.112、101.113、101.114、101.115、101.116、
101.117、101.118、101.119、101.120、101.121、101.122、101.123、101.124、101.125、
101.126、101.127、101.128、101.129、101.130、101.131、101.132、101.133、101.134、
101.135、101.136；102.103、102.104、102.105、102.106、102.107、102.108、102.109、
102.110、102.111、102.112、102.113、102.114、102.115、102.116、102.117、102.118、
102.119、102.120、102.121、102.122、102.123、102.124、102.125、102.126、102.127、
102.128、102.129、102.130、102.131、102.132、102.133、102.134、102.135、102.136；
103.104、103.105、103.106、103.107、103.108、103.109、103.110、103.111、103.112、
103.113、103.114、103.115、103.116、103.117、103.118、103.119、103.120、103.121、
103.122、103.123、103.124、103.125、103.126、103.127、103.128、103.129、103.130、
103.131、103.132、103.133、103.134、103.135、103.136；104.105、104.106、104.107、
104.108、104.109、104.110、104.111、104.112、104.113、104.114、104.115、104.116、
104.117、104.118、104.119、104.120、104.121、104.122、104.123、104.124、104.125、
104.126、104.127、104.128、104.129、104.130、104.131、104.132、104.133、104.134、
104.135、104.136；105.106、105.107、105.108、105.109、105.110、105.111、105.112、
105.113、105.114、105.115、105.116、105.117、105.118、105.119、105.120、105.121、
105.122、105.123、105.124、105.125、105.126、105.127、105.128、105.129、105.130、
105.131、105.132、105.133、105.134、105.135、105.136；106.107、106.108、106.109、
106.110、106.111、106.112、106.113、106.114、106.115、106.116、106.117、106.118、
106.119、106.120、106.121、106.122、106.123、106.124、106.125、106.126、106.127、
106.128、106.129、106.130、106.131、106.132、106.133、106.134、106.135、106.136；
107.108、107.109、107.110、107.111、107.112、107.113、107.114、107.115、107.116、

107.117、107.118、107.119、107.120、107.121、107.122、107.123、107.124、107.125、107.126、107.127、107.128、107.129、107.130、107.131、107.132、107.133、107.134、107.135、107.136；108.109、108.110、108.111、108.112、108.113、108.114、108.115、108.116、108.117、108.118、108.119、108.120、108.121、108.122、108.123、108.124、108.125、108.126、108.127、108.128、108.129、108.130、108.131、108.132、108.133、108.134、108.135、108.136；109.110、109.111、109.112、109.113、109.114、109.115、109.116、109.117、109.118、109.119、109.120、109.121、109.122、109.123、109.124、109.125、109.126、109.127、109.128、109.129、109.130、109.131、109.132、109.133、109.134、109.135、109.136；110.111、110.112、110.113、110.114、110.115、110.116、110.117、110.118、110.119、110.120、110.121、110.122、110.123、110.124、110.125、110.126、110.127、110.128、110.129、110.130、110.131、110.132、110.133、110.134、110.135以及110.136。

[0157] 以#. #形式使用以上列出所述的数字代号,以下列出包含至少两种非细胞毒性化合物的两种化合物组合的实例,所述组合中还可以包含其它化合物或不包含其它化合物:

[0158] 111.112、111.113、111.114、111.115、111.116、111.117、111.118、111.119、111.120、111.121、111.122、111.123、111.124、111.125、111.126、111.127、111.128、111.129、111.130、111.131、111.132、111.133、111.134、111.135、111.136；112.113、112.114、112.115、112.116、112.117、112.118、112.119、112.120、112.121、112.122、112.123、112.124、112.125、112.126、112.127、112.128、112.129、112.130、112.131、112.132、112.133、112.134、112.135、112.136；113.114、113.115、113.116、113.117、113.118、113.119、113.120、113.121、113.122、113.123、113.124、113.125、113.126、113.127、113.128、113.129、113.130、113.131、113.132、113.133、113.134、113.135、113.136；114.115、114.116、114.117、114.118、114.119、114.120、114.121、114.122、114.123、114.124、114.125、114.126、114.127、114.128、114.129、114.130、114.131、114.132、114.133、114.134、114.135、114.136；115.116、115.117、115.118、115.119、115.120、115.121、115.122、115.123、115.124、115.125、115.126、115.127、115.128、115.129、115.130、115.131、115.132、115.133、115.134、115.135、115.136；116.117、116.118、116.119、116.120、116.121、116.122、116.123、116.124、116.125、116.126、116.127、116.128、116.129、116.130、116.131、116.132、116.133、116.134、116.135、116.136；117.118、117.119、117.120、117.121、117.122、117.123、117.124、117.125、117.126、117.127、117.128、117.129、117.130、117.131、117.132、117.133、117.134、117.135、117.136；118.119、118.120、118.121、118.122、118.123、118.124、118.125、118.126、118.127、118.128、118.129、118.130、118.131、118.132、118.133、118.134、118.135、118.136；119.120、119.121、119.122、119.123、119.124、119.125、119.126、119.127、119.128、119.129、119.130、119.131、119.132、119.133、119.134、119.135、119.136；120.121、120.122、120.123、120.124、120.125、120.126、120.127、120.128、120.129、120.130、120.131、120.132、120.133、120.134、120.135、120.136；121.122、121.123、121.124、121.125、121.126、121.127、121.128、121.129、121.130、121.131、121.132、121.133、121.134、121.135、121.136；122.123、122.124、122.125、122.126、

122.127、122.128、122.129、122.130、122.131、122.132、122.133、122.134、122.135、122.136；123.124、123.125、123.126、123.127、123.128、123.129、123.130、123.131、123.132、123.133、123.134、123.135、123.136；124.125、124.126、124.127、124.128、124.129、124.130、124.131、124.132、124.133、124.134、124.135、124.136；125.126、125.127、125.128、125.129、125.130、125.131、125.132、125.133、125.134、125.135、125.136；126.127、126.128、126.129、126.130、126.131、126.132、126.133、126.134、126.135、126.136；127.128、127.129、127.130、127.131、127.132、127.133、127.134、127.135、127.136；128.129、128.130、128.131、128.132、128.133、128.134、128.135、128.136；129.130、129.131、129.132、129.133、129.134、129.135、129.136；130.131、130.132、130.133、130.134、130.135、130.136；131.132、131.133、131.134、131.135、131.136；132.133、132.134、132.135、132.136；133.134、133.135、133.136；134.135、134.136；以及135.136。

[0159] 如图7所示,在此描述的方法提供在剂量响应曲线中观察最适度。在一个实施方案中,在此描述的方法利用剂量响应曲线来为患者选择药物浓度。在另一实施方案中,选择诱导样品中多于约75%的细胞凋亡的药物浓度。在另一实施方案中,选择诱导样品中多于约50%的细胞凋亡的药物浓度。在另一实施方案中,选择诱导样品中多于约25%的细胞凋亡的药物浓度。此外,标准药物浓度,如药物的EC₅₀值,可以不等于多药疗法方案给予的期望剂量。在另一实施方案中,在此描述的方法利用最适度来为患者选择药物浓度。在另一实施方案中,在此描述的方法利用EC₅₀来为患者选择药物浓度。在另一实施方案中,在此描述的方法利用EC₉₀来为患者选择药物浓度。在另一实施方案中,在此描述的方法利用正常细胞的细胞响应来为肿瘤疾病选择期望的药物组合物和浓度。

[0160] 在此描述的方法还可以用于评估细胞毒性药物组合物和非细胞毒性药物组合物的动力学特征。如图8显示,个体患者的动力学可以因不同药物组合物而变化。在一个实施方案中,在此描述的方法确定用于某些适应症的药物的动力学特征。在另一实施方案中,在此描述的方法确定用于某些适应症的药物组合物的动力学特征。在一些实施方案中,基于用于某些适应症的药物的动力学特征选择药物方案。

[0161] 图8还显示,在此描述的方法可用于测量不同药物组合物在不同的时间段诱导凋亡的能力。此外,在此描述的方法可用于评估不同的时间段消逝之后不同的药物组合物之间凋亡诱导的差异。在一个实施方案中,所述方法检测在约10、12、14、16、18、20、22、24小时或由前述任意两个值限定的范围内的凋亡诱导。在另一实施方案中,所述方法检测在约36或48小时时的凋亡诱导。在另一实施方案中,所述方法检测在约72小时时的凋亡诱导。

[0162] 相关测量是药物需要与细胞一起孵育以有效诱导程序性细胞死亡(即凋亡)的最小时间,如图28所示。为了这种测量,可以通过孵育药物组合物15分钟,接着将药物清洗掉并等待48小时来测量凋亡进行相似的分析。在一个实施方案中,所述方法检测在清洗药物之前孵育约30分钟、45分钟、1小时、2小时或4小时,或者由前述任意两个值限定的范围的凋亡诱导。在另一实施方案中,所述方法检测约24或48小时时的凋亡诱导。在另一实施方案中,所述方法检测约72小时时的凋亡诱导。

[0163] 在一些实施方案中,提供了能够实施在此描述方法的装置。例如,在引入细胞样品之前,可以提供已包含不同浓度的单独的药物或药物组合的平板。可选择地,在引入不同浓

度的单独的药物或药物组合之前,可以提供具有已将细胞样品引入到孔的装置。

[0164] 在此描述的方法可以促使使用能够从血液恶性肿瘤增殖和扩增原代人类患者细胞的小鼠模型(Pearson et al.Curr Top Microbiol Immunol.2008;324:25-51;Ito et al.Curr Top Microbiol Immunol.2008;324:53-76)。这些小鼠模型可以扩增出可用于离体测试的患者细胞的数量,例如利用ExviTech平台。这可以使显著更大量的药物和药物组合能够在由这些小鼠模型增殖的离体患者细胞中进行测试,并且允许在相同的小鼠模型体内测试最优的药物和药物组合。在一个实施方案中,在用于增殖患者细胞的小鼠模型中验证在患者样品中离体测试的药物组合物的效力和毒性。在另一实施方案中,在小鼠模型的离体样品中测试细胞毒性药物的药物组合物,并且在小鼠模型体内评估最优的药物组合物。在另一实施方案中,在小鼠模型的离体样品中测试细胞毒性药物联合非细胞毒性药物的药物组合物,如辅药和已批准的药物,并且在小鼠模型体内评估最优的药物组合物。在另一实施方案中,在小鼠模型的离体样品中测试非细胞毒性药物的药物组合物,如辅药和已批准的药物二者,并且在小鼠模型体内评估最优的药物组合物。

[0165] 本方法的另一个优点是,它们能形成关于患者对不同药物组合物和浓度响应的个体化报告。在一个实施方案中,所述方法包括准备总结分析结果的报告。在另一实施方案中,所述方法包括将报告提供给患者。在另一实施方案中,所述方法包括将报告提供给负责患者医疗护理的一方。在另一实施方案中,所述方法包括将报告提供给负责解释分析步骤的一方。在一个实施方案中,所述报告包括原始数据。在另一实施方案中,所述报告包括剂量响应曲线。在另一实施方案中,所述报告包括患者对药物组合物和药物浓度响应的总结。

[0166] 虽然准确的剂量将以各药物为基础来确定,但是在大多情况下,可以进行一些关于剂量的概括。例如,成人患者的药物剂量可以是例如每日约1mg至约500mg的剂量,或优选每日约10mg至约100的剂量。剂量形式可以是口服的,但是优选静脉注射的。例如,本发明的组合物可以通过连续静脉输注给药。可选择地,在一些实施方案中,将剂量形式配制成用于皮下递送或肌肉递送。细胞毒性和非细胞毒性药物的剂量范围通常是相似的。在此描述的任何一种药物组合物包括所描述化合物的药学上可接受的盐。可以给予化合物用于一段连续的治疗,例如一周、一个月或更久。此外,本领域技术人员应当意识到,本发明药物和药物组合物的确切剂型、给药途径、剂量可以由独立的医师根据患者的状况来选择。例如,给予的药物或药物组合的量可以取决于待治疗的个体、个体的体重、痛苦的严重性、给药方式或处方药师的判断。

[0167] 本领域技术人员应当理解的是,在不脱离本发明的实质下,可以进行各种修改。因此,应当清楚地认识到,本发明在此公开的实施方案仅是说明性的,并非意图限制本发明的范围。在此提及的任何参考文献用于在此讨论的材料并且全文通过引用并入。

实施例

[0168] 实施例1:对凋亡的正常和肿瘤细胞的流式细胞术检测

[0169] 可以通过测量药物组合物诱导凋亡的能力来确定离体治疗指数。图1和图2描述了利用流式细胞术检测凋亡细胞和区别正常和肿瘤表型。在图1中,使用与异硫氰酸荧光素(FITC)连接的Annexin V试剂来检测凋亡细胞上表达的磷脂酰丝氨酸。在y-轴上显示荧光素强度,在x-轴上显示细胞大小。图1示出鉴别凋亡细胞(上部左框)和活细胞(下部右群集)

的能力,并且表明同时使用单克隆抗体和多参数分析策略的合适组合可以允许从患有血液病症的患者样品中所存在的残留正常细胞区别出白血病细胞。图2示出显示BCR/ABL基因重排的前体B-ALL成人病例[t(9;22)阳性]。利用定量流式细胞术分析多种单克隆抗体染色来检测CD19阳性细胞中的两个细胞亚群,白血病细胞(浅灰色)和正常细胞(深灰色)。白血病细胞表达与易位有关的独特表型(均匀表达CD34,但是低且相对不均匀地表达CD38)。

[0170] 实施例2:用于离体评估药物组合物的方案

[0171] 用于药物组合物的离体筛选过程在图3示意图中给出。可以将血液样品分成小等分试样,并分配给任何合适大小的孔板。这些孔板包含单独的药物或药物组合,每种药物均处于不同的浓度。为促进最佳的测定显现,将样品在RPMI培养液中稀释,并浓缩到每孔约20,000个白血病细胞。平行地,利用流式细胞术测试另一份等分试样的免疫表型特征,用于鉴别正常和病态细胞,并检测基础凋亡。可以包括不含任何药物的对照孔(未示出),以鉴别与药物治疗无关的自发凋亡水平。

[0172] 大约48小时之后,用缓冲液处理具有暴露于药物的样品的各孔,以裂解红细胞群并浓缩白细胞群。接着各孔用Annexin V(用于凋亡检测)与抗体组合(用于精确地检测和鉴别肿瘤细胞和正常细胞)一起孵育。利用流式细胞术,可能评估各药物对各种细胞类型的效应并对由各药物诱导的选择性细胞死亡的水平进行定量。

[0173] 然后可以评估结果,并且为证实更多相关结果,可以用其它等分试样开始新的测试,如早期研究中鉴别的10种最优药物组合和浓度。对患者样品进行测定之后,可以选择出选择性诱导肿瘤细胞如白血病细胞凋亡的合适的药物或药物组合。

[0174] 实施例3:个体患者响应显示目前已批准用于慢性淋巴细胞白血病治疗的不同药物的细胞毒性效应

[0175] 已将目前的方法用于在各患者中分析目前已批准用于慢性淋巴细胞白血病(CLL)的五种药物-苯丁酸氮芥、环磷酰胺、长春新碱、米托蒽醌和多柔比星,浓度为30 μ M。图4中提供在9份离体患者样品的恶性细胞中诱导凋亡的已独立批准的细胞毒性药物的效力结果。图4表明在药物响应中存在个体间的高度可变性,这突出了在此描述的个体化药物测试的重要用途。

[0176] 就患者对浓度为30 μ M的单独的药物治疗的响应而言,几种药物通常具有较差的患者响应,如通过Annexin V阳性细胞所测量的,确定为在患者样品中诱导少于60%的凋亡。此外,图4显示一些患者(具体是P1.0105、P2.0019和P2.035)表现出对米托蒽醌极强的离体抗性。可选择地,对于由星号指出的两名患者,只有多柔比星非常有效,而对其它3种药物具有抗性,表明这种测试类型在指导治疗这些患者中可能非常有帮助。虽然从离体测定中获得的结果在预测药物抗性上比在预测药物效力上可能更准确(例如,如表2所示),但是如果药物不杀死离体恶性细胞,那么它也不可能杀死体内相同的细胞。

[0177] 实施例4:细胞毒性和非细胞毒性药物在CLL样品中诱导的凋亡

[0178] 利用从CLL(慢性淋巴细胞白血病)患者获得的外周血样品,研究非细胞毒性药物诱导离体样品凋亡的能力。在23份不同的患者样品中,一种一种地离体筛选大约900种可商购获得的药物。图6给出几种已批准临床的细胞毒性药物和几种非细胞毒性药物对这些CLL离体样品中血液肿瘤的效力。结果图示为凋亡的%。结果显示,已批准临床的药物诱导多于75%的恶性细胞的凋亡。从左至右,所研究的非细胞毒性药物是帕罗西汀、氟西汀、舍曲林、

胍那苄和阿司咪唑。从左至右,所研究的细胞毒性药物是氟达拉滨、丙丁酸氮芥和米托蒽醌。图6表明非细胞毒性药物以与已批准的细胞毒性药物相似的离体效力选择性地杀死相同的恶性细胞。该意外的结果显示,这些非细胞毒性药物对于图6中研究的患者具有显著的治疗效果。

[0179] 进行了由非细胞毒性药物诱导凋亡的其它验证研究。图7比较了帕罗西汀在恶性白血病细胞和非恶性T和NK细胞之间的细胞毒性效应的差异。在浓度大约为30 μ M时,帕罗西汀诱导几乎100%的白血病细胞的凋亡。然而,在大约30 μ M的相同浓度时,帕罗西汀仅诱导15%的T和NK细胞的凋亡。因此,图7显示帕罗西汀选择性地诱导离体恶性CLL细胞的凋亡,并且对非恶性NK和T细胞的影响非常小。

[0180] 通常在治疗中所开的非细胞毒性药物可以具有针对恶性细胞的高选择性的凋亡效力。图12中给出CLL患者的一种这样的情况,其显示由不同药物诱导的Annexin V阳性细胞的百分比。观察到CLL治疗中所用的不同药物(即长春新碱、米托蒽醌和环磷酰胺)的细胞毒性效应的高度变化性。令人惊奇的是,用于治疗由化疗引起的副作用所通常涉及的两种非细胞毒性化合物(即奥美拉唑和无环鸟苷)显示出与细胞毒性剂相似的凋亡率。因而,包括在此描述(包括在本实施例中所提供的)的非细胞毒性药物的个体化药物测试可能为患者提供意外的潜在治疗效果。例如,添加非细胞毒性药物的离体测试可允许新的且意料不到的治疗来补充标准治疗。

[0181] 实施例5:24小时和48小时分析所选择药物诱导凋亡的能力

[0182] 通过在24小时和48小时的时间点观察经历凋亡的细胞百分比来评估凋亡诱导的动力学。图8显示非细胞毒性药物舍曲林比已批准的细胞毒性药物更快地消除恶性CLL细胞。在图8中,分析从诊断患有CLL的患者采集的全血样品对药物处理的响应。将全血样品与舍曲林或者目前已批准用于治疗CLL的三种药物(氟达拉滨、苯丁酸氮芥或米托蒽醌)中的一种孵育。在添加药物之后,分析之前孵育全血样品持续24或48小时。图8中的结果显示,舍曲林凋亡诱导的动力学(24小时之后诱导多于90%的凋亡)比其它三种已批准临床的药物(24小时之后分别诱导大约40%、45%和50%的凋亡)更快。因而,舍曲林在24小时内几乎诱导全部凋亡,而其它CLL药物需要48小时达到最佳效力。

[0183] 更快的离体凋亡可以转化为更强的体内效力。然而,图8还表明,这四种药物的效应在48小时之后大致相等。图8强调评估多种孵育时间来选择用于各患者的最佳治疗的功效。此外,图8显示,为了开发最佳多药疗法治疗,应当研究的几个变量(例如药物组成和孵育时间)。

[0184] 实施例6:相同药理学类别中的药物对凋亡的差异诱导

[0185] 帕罗西汀是选择性血清素再摄取抑制剂(SSRI)。为确定SSRI药理学类别的药物是否具有普遍的凋亡诱导特性,测试SSRI类化合物的其它成员。图9总结了6种SSRI(帕罗西汀、氟西汀、舍曲林、西酞普兰(citalopram)、氟伏沙明(flvoxamine)和齐美利定(zimelidine))诱导恶性CLL细胞凋亡的能力。图9中的结果表明,6种药物中仅3种(帕罗西汀、氟西汀和舍曲林)诱导凋亡与已批准临床的细胞毒性药物相似。共有相似作用机理和相同药理学特征的药物中的这些差异突出了需要在此描述的离体测试方法来在药理学类似药物中进行选择。这些差异还显示需要离体测试各药物而不考虑药理学类别。这些差异进一步突出了研究大量变量以开发个体化药物测试的重要性。

[0186] 实施例7:显示由相同的药物治疗诱导超过80%的凋亡的患者频率

[0187] 非细胞毒性药物的凋亡效力在个体之间比已批准的细胞毒性药物的凋亡效力变化更大(例如,如图4所示)。这种变化还示于图10中。用大约2,000种化合物对来自诊断患有CLL的患者的23份样品(全血或骨髓的组合)进行初步筛选(一些样品不够筛选全部化合物)。筛选测量每种化合物选择性诱导各患者的白血病细胞群凋亡的能力。如果化合物在白血病群中诱导的凋亡水平大于80%而在正常细胞群中很少或没有影响,那么其被认为是“击中”特定患者。

[0188] 图10中的结果显示只有少数药物在大部分患者样品中(80-100%)有效。同样,只有10种另外的化合物在60-80%的患者样品中有效。45种药物在40-60%的样品中有效,66种药物在20-40%的样品中有效,以及229种另外的药物在少于20%的样品中有效。合计这些药物意味着353种药物在离体诱导这23份样品的凋亡中有效。这些药物中的大部分在之前未被指出用于血液恶性肿瘤治疗,表明个体化药物测试的发展将需要筛选大量的细胞毒性和非细胞毒性药物,以确定最佳的药物方案。这种意外的数据对于治疗血液肿瘤可能具有重大的临床意义。

[0189] 监管机构一般仅批准对患有血液肿瘤的患者使用一小类非细胞毒性药物,旨在减缓细胞毒性治疗的效应。但是,在此观察到的以及本文所要求的大部分其它非细胞毒性药物的潜在效力迟早会随着进一步推进个体化药物的概念而变为这些治疗的一部分。在此描述的多药疗法的个体化药物测试可以鉴别对于各体患者来说可能有用的非细胞毒性药物,这代表了一种以前不可利用的新的且治疗上有效的方法。

[0190] 实施例8:非细胞毒性药物增强已批准的细胞毒性药物的效力

[0191] 作为说明个体化药物筛选测试潜在益处的实例,被鉴别为击中CLL患者样品的化合物舍曲林可以增强苯丁酸氮芥的响应。这在图11中示出。苯丁酸氮芥是在不能耐受基于氟达拉滨治疗的约25%患者中最常用的一线治疗CLL的处方药。由于苯丁酸氮芥是高细胞毒性的,并且能引发多种严重的副作用,因此寻找一种限制剂量的方式将大大有益于患者。在这种特定的测试中,舍曲林是一般配方中可利用的抗抑郁药,并且已上市多年。处于所示浓度的单独的苯丁酸氮芥并不诱导大量凋亡(较低的曲线),但是存在最大剂量以下的舍曲林能极大地提高凋亡水平(较高的曲线)。这种实例表明,潜在的伴随治疗选择可具有提高处方化疗治疗响应的能力。

[0192] 这些结果表明,存在利用高通量筛选,如利用流式细胞术来开发个体化药物测试的需要,其允许探索潜在的药物和药物组合的效应,包括所有已批准的药物以及特别是伴随用于减轻化疗策略副作用的非细胞毒性药物。

[0193] 实施例9:根据PETHEMA治疗方案设计用于CLL的多药疗法化药物(PM)测试

[0194] 图13中显示用于患有CLL(慢性淋巴细胞白血病)的患者的个体化药物测试的96-孔板设计,未考虑非细胞毒性药物。在各平板中,第1列包含0.34%的DMSO溶液,作为阴性对照,第12列包含50μM的帕罗西汀溶液和50μM的星形孢菌素(staurosporin)溶液(孔E-H),作为阳性对照。平板中的药物和药物组合是在常规治疗方案中已批准用于这种适应症的那些药物。在各行中,孔2-6和孔7-11包含这些药物和药物组合各自5个点的剂量响应,稀释倍数是2:3。因而第2列和第7列包含最高浓度的药物,根据药物的治疗范围建立各药物的最高浓度。苯丁酸氮芥(CH);氟达拉滨(F1);马磷酰胺(MA);多柔比星(DO);长春新碱(VI);泼尼松

龙(Pr);米托蒽醌(MI);2-氯脱氧腺苷(2-CDA);夫拉平度(FL);美法仑(ME);甲基泼尼松龙(MEPR);苯达莫司汀(BE);喷妥司汀(PE);利妥昔单抗(RIT);阿仑单抗(ALE)。

[0195] 实施例10:根据PETHEMA治疗方案设计用于MM的PM测试

[0196] 图14中显示用于患有MM(多发性骨髓瘤)的患者的个体化药物测试的96-孔板设计,6个板A至F,未考虑非细胞毒性药物。根据现行治疗方案形成平板布局,包括单独的药物。在各平板中,第1列包含0.34%的DMSO溶液,作为阴性对照,第12列包含50 μ M的帕罗西汀溶液和50 μ M的星形孢菌素溶液(孔E-H),作为阳性对照。平板中的药物和药物组合是在常规治疗方案种已批准这种适应症的那些药物。在各行中,孔2-6和孔7-11包含这些药物和药物组合各自5个点的剂量响应,稀释倍数是2:3。因而第2列和第7列包含最高浓度的药物,根据药物的治疗范围建立各种药物的最高浓度。此外,平板4-6包含已批准方案的所有可能的两两组合,以便弄清所有药物之间的协同作用。地塞米松(D);泼尼松(P);美法仑(M);环磷酰胺(C);多柔比星(A);长春新碱(Vi);卡莫司汀(carmustine,BCNU-B);硼替佐米(V);沙利度胺(T);来那度胺(L);帕比司他(Pa);坦螺旋霉素(Tn);哌立福新(perifosine,Pe);伏立诺他(Vo);雷帕霉素(Ra);依维莫司(Ev);西罗莫司脂化物(Te);替吡法尼(tipifamib,Ti);顺铂(cP);依托泊甙(E)。

[0197] 实施例11:根据PETHEMA治疗方案设计用于ALL的PM测试

[0198] 图15中显示用于患有ALL(急性淋巴细胞白血病)的患者的个体化药物测试的96-孔板设计。根据现行治疗方案形成平板布局,包括在单一疗法中所用的药物。研究设计旨在确定以下药物诱导患者样品凋亡的能力:氨甲喋呤(MTX)、6-巯基嘌呤(6MP)、阿糖胞苷(ARA-C)、柔红霉素(DNR)、多柔比星、米托蒽醌(M)、依托泊甙、替尼泊甙(VM-26)、环磷酰胺(CF)、异环磷酰胺(IFOS)、长春新碱(V)、长春地辛(VIND)、门冬酰胺酶(L-ASA),伊马替尼(IMAT)、利妥昔单抗(R)、泼尼松(P)、氢化可的松(HC)、地塞米松(DXM)、亚叶酸(Fo1i)、美司钠、奥美拉唑(Om)、恩丹西酮(O)、别嘌醇(Allop),和非格司亭(GCSF)。这种96-孔板的设计提供了可同时比较多种化疗策略。所述设计还测试辅助药物和单独或与单一疗法药物联合用于减轻副作用的药物的效应。

[0199] 实施例12:根据PETHEMA治疗方案设计用于MDS的PPM测试

[0200] 图16中显示用于患有MDS(骨髓增生异常综合征)的患者的个体化药物测试的96-孔板设计。根据现行治疗方案形成平板布局,包括在单一疗法中所用的药物。研究设计旨在确定以下药物诱导患者样品凋亡的能力:促红细胞生成素(EPO)、非格司亭(GCSF)、沙利度胺、环孢素(CsA)、胸腺球蛋白(ATG)、三氧化二砷、氮杂胞苷、地西他滨、氟达拉滨(Fluda)、依托泊甙(VP-16)、阿糖胞苷(ARA-C)、伊达比星(Ida)、卡铂(Carbop)、泼尼松(Pred)、恩丹西酮(Ondans)、奥美拉唑(Om)、别嘌醇(Allop)、复方磺胺甲噁唑(co-trimoxazole,Cotri)以及叶酸(AcF)。这种96-孔板的设计提供了可同时比较多种化疗策略。所述设计还测试辅助药物和单独或与单一疗法药物联合用于减轻副作用的药物的效应。

[0201] 实施例13:根据PETHEMA治疗方案设计用于AML的PM测试

[0202] 图17中显示用于患有AML(非M3型急性髓细胞白血病)的患者的个体化药物测试的96-孔板设计。根据现行治疗方案形成平板布局,包括在单一疗法中所用的药物。研究设计旨在确定以下药物诱导患者样品凋亡的能力:柔红霉素(Dauno)、伊达比星(Ida)、阿糖胞苷(ARA-C)、米托蒽醌(Mitox)、依托泊甙(VP16)、氟达拉滨(Fluda)、非格司亭(GCSF)、奥美拉

唑(Om)、恩丹西酮(Ondans)、别嘌醇(Alop)、复方磺胺甲噁唑(Cotri)、叶酸(AcF)、安吡啶(AMSA)、卡铂(Carbop)、脂质体柔红霉素(Dauno lipo)、吉妥单抗奥唑米星(GO)和羟基脲(hydroxyurea)。这种96-孔板的设计提供了可同时比较多种化疗策略。所述设计还测试辅助药物和单独或与单一疗法药物联合用于减轻副作用的药物的效应。

[0203] 实施例14:根据PETHEMA治疗方案设计用于AML-M3的PM测试

[0204] 图18中显示用于患有AML-M3(M3型急性髓细胞白血病)的患者的个体化药物测试的96-孔板设计。根据现行治疗方案形成平板布局,包括在单一疗法中所用的药物。研究设计旨在确定以下药物诱导患者样品凋亡的能力:全反式维甲酸(tretinoin, ATRA)、伊达比星(Ida)、米托蒽醌(Mitox)、阿糖胞苷(ARA-C)、6-巯基嘌呤(6-MP)、氨甲喋呤(MTX)、恩丹西酮(Ondans)、别嘌醇(Alop)、奥美拉唑(Om)、地塞米松(Dexa)、柔红霉素(Dauno)、依托泊甙(VP-16)、氟达拉滨(Fluda)、卡铂(Carbop)、脂质体柔红霉素(Dauno lipo)、复方磺胺甲噁唑(Cotri)和叶酸(FAc)。这种96-孔板的设计提供了可同时比较多种化疗策略。所述设计还测试辅助药物和单独或与单一疗法药物联合用于减轻副作用的药物的效应。

[0205] 实施例15:原代起源的白血病细胞系中的MTT增殖测定

[0206] TOM-1细胞源自患有Ph1-阳性急性淋巴细胞白血病(ALL)的患者的骨髓细胞。MOLT-4细胞源自人类急性淋巴细胞白血病细胞系。进行标准MTT测定法以确定意在特定细胞系上测试的单独项的IC₅₀。MTT测定法基于黄色的四唑盐MTT由代谢活性细胞裂解变成紫色甲臞结晶。接着将甲臞溶解,并通过570nm处的光密度测定浓度。在治疗后24小时分析6至8种不同浓度的舍曲林,一式三份。

[0207] 在24小时时,评估舍曲林对TOM-1和MOLT-4原代起源细胞系中细胞增殖的抑制。MOLT-4细胞系的IC₅₀为40μM, TOM-1细胞系的IC₅₀为50μM(图19)。

[0208] 实施例16:利用凋亡ELISA测定凋亡

[0209] 使用实施例15中的TOM-1和MOLT-4细胞进行一步夹心ELISA。一步夹心ELISA是基于诱导凋亡之后或从坏死细胞释放时对来自细胞的细胞质的组蛋白-复合的DNA片段(单核小体和寡聚核小体)的定量。

[0210] 在24小时时,评估舍曲林对TOM-1和MOLT-4原代起源细胞系中凋亡诱导的效应。舍曲林将MOLT-4细胞的凋亡指数提高高达7倍(图20)。

[0211] 实施例17:活性半胱氨酸蛋白酶-3的测定

[0212] 对于来自暴露于增加浓度的舍曲林的两种急性淋巴细胞系(TOM-1和MOLT-4)的提取物,利用Western印迹测定半胱氨酸蛋白酶-3活性。提取物采自24和48小时。活性半胱氨酸蛋白酶-3是用作凋亡标记物的蛋白酶。

[0213] 在24小时时,评估舍曲林对TOM-1和MOLT-4原代起源细胞系中活性半胱氨酸蛋白酶-3的凋亡诱导效应。舍曲林显著诱导MOLT-4细胞中的活性半胱氨酸蛋白酶-3,最大诱导发生在浓度为70μM时(图21)。

[0214] 实施例18:CLL样品中多药疗法组合用药的离体效力

[0215] 在CLL样品中以最大浓度测试利妥昔单抗、氟达拉滨、米托蒽醌和环磷酰胺的多药疗法组合。未直接测试环磷酰胺,而是测试它的代谢物马磷酰胺(人体内的活性化合物)。对四种主要的单独的药物是有抗性的(即利妥昔单抗、氟达拉滨、米托蒽醌和环磷酰胺)(图22,左侧)。对氟达拉滨和利妥昔单抗的多药疗法方案也有抗性(图22,中间)。对三种多药疗

法方案(即氟达拉滨和环磷酰胺;氟达拉滨、环磷酰胺和米托蒽醌;以及氟达拉滨、环磷酰胺和利妥昔单抗)非常敏感,其基本上消除了全部白血病细胞(右侧)(图22)。

[0216] 形成以下组合的五点响应曲线:氟达拉滨和环磷酰胺;氟达拉滨、环磷酰胺和米托蒽醌;以及氟达拉滨、环磷酰胺和利妥昔单抗,以表征离体效力(图23-25)。这些曲线表明这些药物组合的显著的协同作用,突出评估在此描述的药物组合的重要性。

[0217] 实施例19:单独的药物以五种不同浓度在两名患者中的效应

[0218] 在两名患者P2.0144(图26,左)和P2.0149(图26,右)中以五种浓度测试氟达拉滨、马磷酰胺、以及氟达拉滨和马磷酰胺的组合。使用程序Calculusyn(Chou et al., Adv Enzyme Regul 1984;22:27-55;Chou et al., Eur J Biochem 1981;115(1):207-16)计算联合指数(CI),以表征所述组合在各浓度时的协同作用(在图顶部示出)。CI是药物在累加效应方面相互作用程度的定量尺度。CI<1时发生协同作用,CI~1时发生累加效应,以及CI>1时发生拮抗作用。剂量减少指数(DRI)是在给定效应水平时,与每种药物的单独剂量相比,协同组合中的各药物的剂量可以减少多少的尺度。

[0219] 图27给出基于Chou和Talalay方法的联合指数与部分效应的关系曲线(顶图)。交叉标记显示观测值。黑线对应于模型模拟。中间图给出基于Chou和Talalay方法基于三种不同响应水平(ED₅₀、ED₇₅和ED₉₀)的剂量响应估计的药物相互作用等效图。各轴上绘制的点对应于对各药物单独响应的估计剂量。直线代表组合的累加效应区。这些线下面存在的联合剂量的点指示药物协同作用。图26和图27表明,相对于单种药物针对白血病CLL B-细胞的效力,氟达拉滨和马磷酰胺的组合增强了细胞毒性。

[0220] 实施例20:孵育时间对药物在CLL样品的恶性细胞中诱导凋亡效力的影响

[0221] 测试孵育时间对氟达拉滨和舍曲林在CLL样品的恶性细胞中诱导凋亡效力的影响。图28给出氟达拉滨(左图)和舍曲林(右图)的曲线,其中在24小时(上面)或48小时(下面)时测量凋亡。在两种情况下,在清洗掉药物之前,将药物与样品一起孵育30分钟、4小时或8小时,并且等待24或48小时以测量凋亡。表明诱导CLL恶性细胞凋亡的非细胞毒性药物舍曲林比氟达拉滨具有更快的动力学。

[0222] 实施例21:药物组合的数量

[0223] 进行计算以估计15种药物中2种药物、3种药物和4种药物组合的数量。

[0224] 图29代表可以从15种单独的药物中做出的独特的2种药物组合的数量。各药物以数字代表,阴影格代表2种药物的组合。这给出2种药物总共105种独特的组合。

[0225] 图30代表可以从15种单独的药物做出的独特的3种药物组合的数量。当中间方框被画成浅灰色时,列于各矩阵顶行的全部2种药物的组合将与左列的一种药物组合。这给出3种药物总共455种独特的组合。

[0226] 图31代表可以从15种单独的药物做出的独特的4种药物组合的数量。对于被画阴影的各方框,将列于各列左侧的3种药物组合与列于列顶部的一种药物组合。对于包含'X'的各方框,将列于各列右侧的3种药物组合与列于列顶部的一种药物组合。这给出4种药物总共1365种独特的组合。

[0227] 实施例22:使用标签系统设计PM测试

[0228] 离体个体化药物测试的通量可以通过用荧光探针标记包含不同药物组合物的孔来进一步提高。可以将标记的孔合并并且一起通过流式细胞仪,这相对于单独评估各孔来

说节约时间。实现的节约可能近似等于合并孔的数量。节约时间使得在较少的时间内能测试更多的药物组合物,使各ExviTech平台每单位时间能够进行更多的测试。这转化成通量提高和成本降低,这可能是非常有意义的。

[0229] 图32和图33给出使用荧光色素染料的复合分析实例。在一实施方案中,将所述荧光色素染料用作标记例如不同孔内所含的不同药物组合物中的细胞的试剂。在另一实施方案中,所述荧光色素染料用于标记抗体,所述抗体随后用作标记例如不同孔内所含的不同药物组合物中的细胞的试剂。在另一实施方案中,所述荧光色素染料是用于标记例如不同孔内所含的不同药物组合物中的细胞的量子点。在一实施方案中,可以以复合模式进行评估的药物组合物的数量为约2、约5、约10、约20、约30、约40或约50或多于50,或者由前述任意两个值所限定的范围。

[0230] 图32描述了使用不同的细胞示踪染料的3色复合的外周血白细胞。将包含溶解外周血的三个连续的孔用不同的细胞示踪染料单独染色。孔1用Pacific Blue(P22652)(Invitrogen,Carlsbad,CA)染色,孔2用DiR(D12731)(Invitrogen,Carlsbad,CA)染色,以及孔3用DiD(V-22889)(Invitrogen,Carlsbad,CA)染色。接着结合并同时获得三个孔的内容物。各细胞示踪染料的唯一激发/发射光谱允许区分反映三个不同孔来源的三种不同的细胞群。

[0231] 在紫色激光检测器中,来自孔1的细胞比来自孔2和孔3的细胞显示更强的信号。相反地,在红色激光检测器中,来自孔2和孔3的细胞与来自孔1的细胞相比,显示更强的信号。最后,来自孔2和孔3的细胞显示不同的发射峰,这允许在两个红色激光检测器的二元点图中区分它们。

[0232] 以下参考文献通过引用全文并入本文:

[0233] 1.Leone et al.,Cancer Invest 1991,9:491-503.

[0234] 2.Bosanquet et al.,Lancet 1991,337:711-716.

[0235] 3.Hongo et al.et al.,Cancer 1990;65:1263-1272.

[0236] 4.Hongo et al.et al.,eds.Drug resistance in leukemia and lymphoma(白血病和淋巴瘤的药物抗性).Langhorne,PA:Harwood AcademicPublishers 1993,319.

[0237] 5.Kaspers et al.,eds.Drug Resistance in leukemia and Lymphoma(白血病和淋巴瘤的药物抗性).Chur:Harwood Academic Publishers 1993,321-328.

[0238] 6.Larsson et al.,Int J Cancer 1992,50:177-185.

[0239] 7.Lathan et al.,Haematol Blood Transfus 1990,33:295-298.

[0240] 8.Weisenthal LM et al.,Cancer Treat Rep 1986,70:1283-1295.

[0241] 9.Weisenthal LM et al.,Cancer Res 1983,43:749-757.

[0242] 10.Kirkpatrick DL et al.,Leuk Res 1990,14:459-466.

[0243] 11.Langker ST et al.,eds.Drug Resistance in leukemia and Lymphoma(白血病和淋巴瘤的药物抗性).Chur:Harwood Academic Publishers 1993,279-291.

[0244] 12.Staib P et al..Adv Exper Med Biol 1999,457:437-444.

[0245] 13.Santini V,et al.,eds.Drug Resistance in leukemia and Lymphoma(白血病和淋巴瘤的药物抗性).Chur:Harwood Academic Publishers,1993,365-368.

[0246] 14.Sargent JM et al.,Br J Cancer 1989,60:206-210.

- [0247] 15.Stute N et al.,Adv Exper Med Biol 1999,457:445-452.
- [0248] 16.Larsson et al.,eds.Drug Resistance in leukemia and Lymphoma(白血病和淋巴瘤的药物抗性).Chur:Harwood Academic Publishers,1993:399-407.
- [0249] 17.Beksac M et al.,Med Oncol Tumor Pharmacother 1988,5:253-257.
- [0250] 18.Santini V et al.,Hematol Oncol 1989,7:287-93.
- [0251] 19.Tidefelt U Et al.,Eur J Haematol 1989,43:374-384.
- [0252] 20.Bosanquet et al.,Br J Haematol 1999,106:474-476.
- [0253] 21.Silber et al.,Blood 1994,84:3440-3446.
- [0254] 22.Bosanquet AG.,eds.Drug Resistance in leukemia and Lymphoma(白血病和淋巴瘤的药物抗性).Chur:Harwood Academic Publishers 1993,373-383.
- [0255] 23.Sevin et al.,Gynec Oncol 1988,31:191-204.

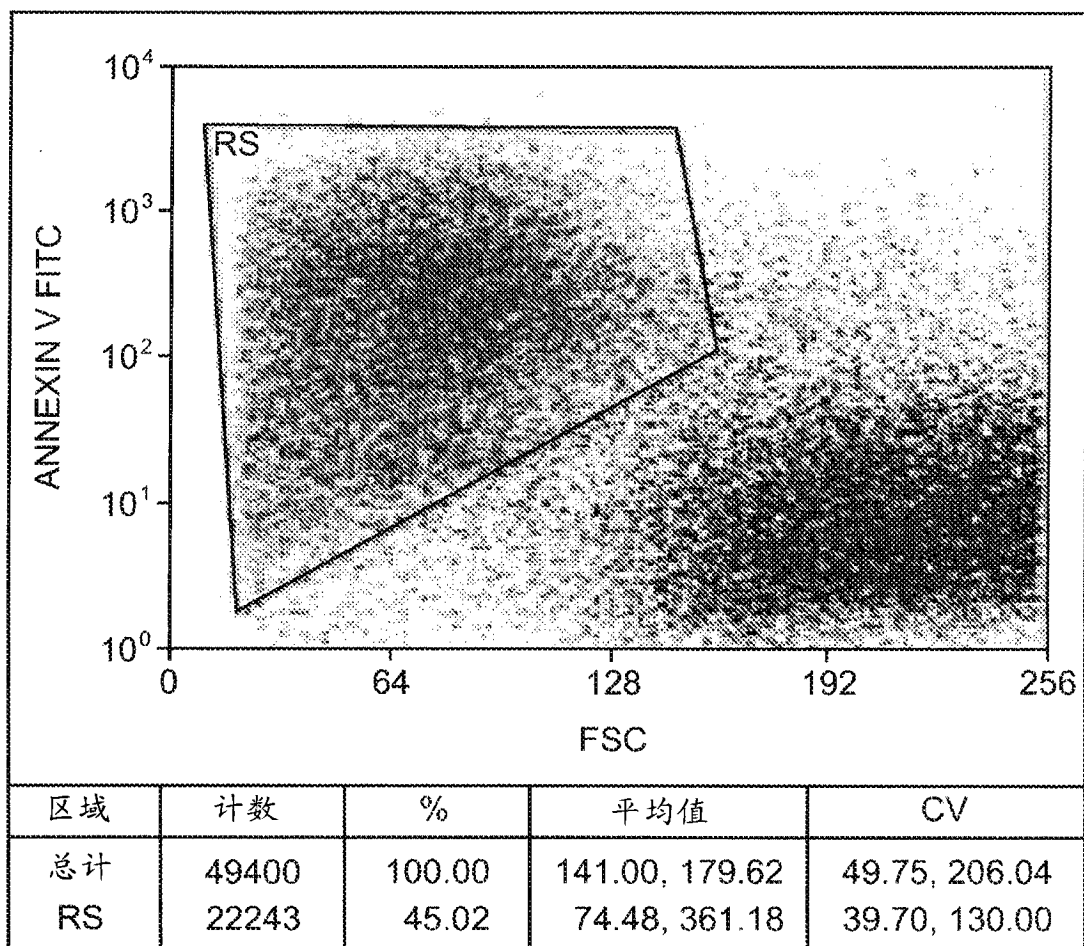


图1

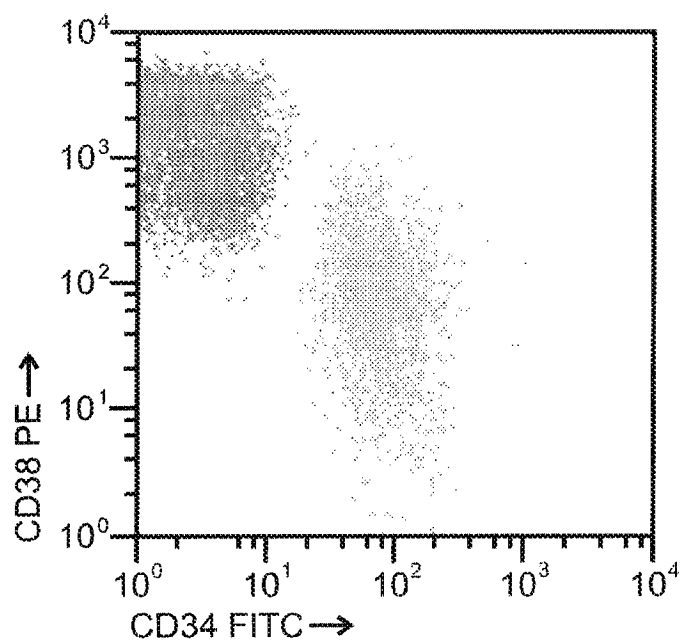


图2

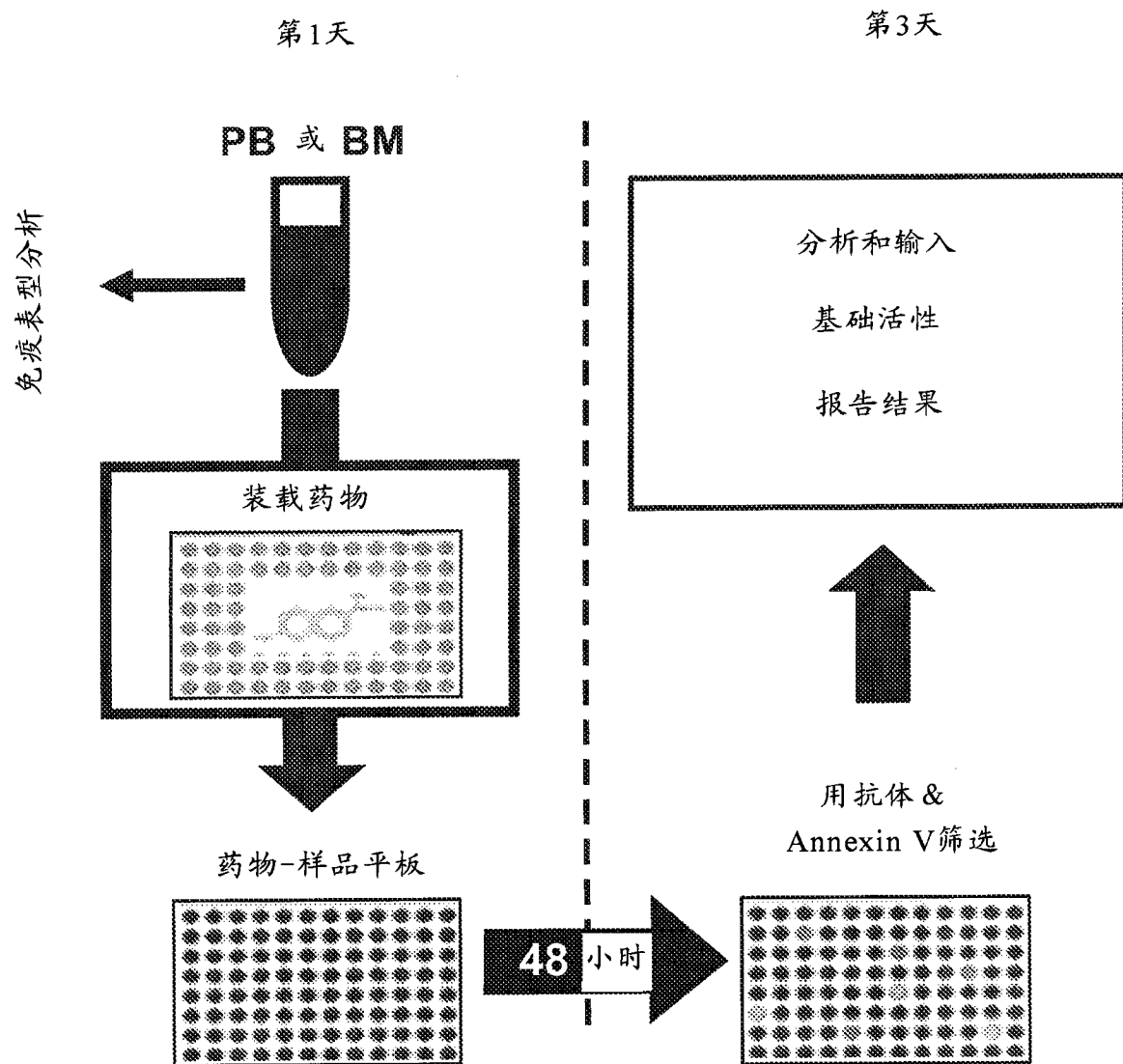


图3

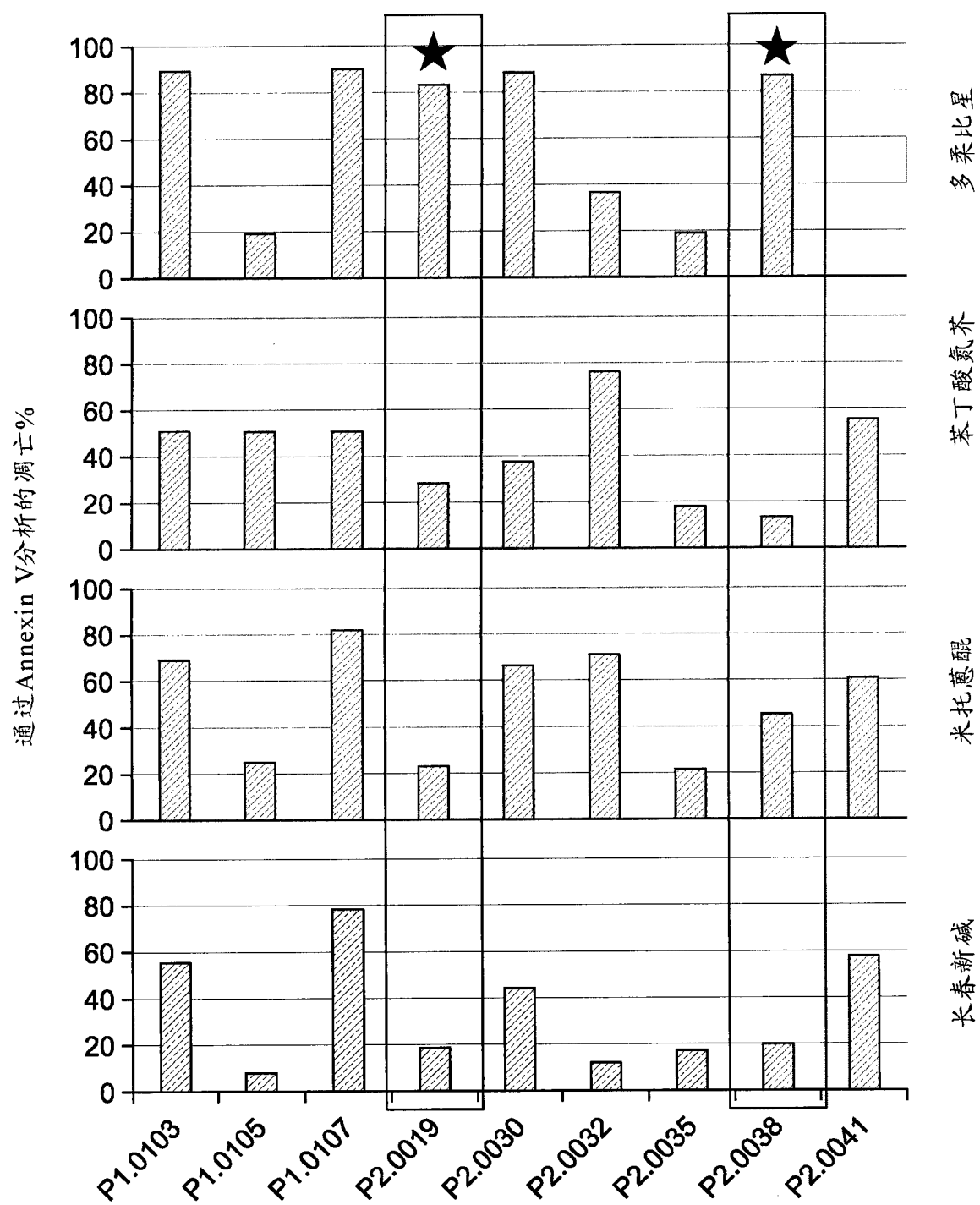


图4

#药物 数量	#组合的数量 (多达4种药物)	5个浓度	2个孵育 时间
1	1	5	10
2	3	15	30
3	7	35	70
4	15	75	150
5	30	150	300
6	57	315	630
7	106	635	1270
8	199	995	1990
9	255	1275	2700
10	385	1925	3700
11	561	2805	5610
12	795	3975	7950
13	1092	5460	10920
14	1470	7350	14700
15	1940	9700	19400

图5

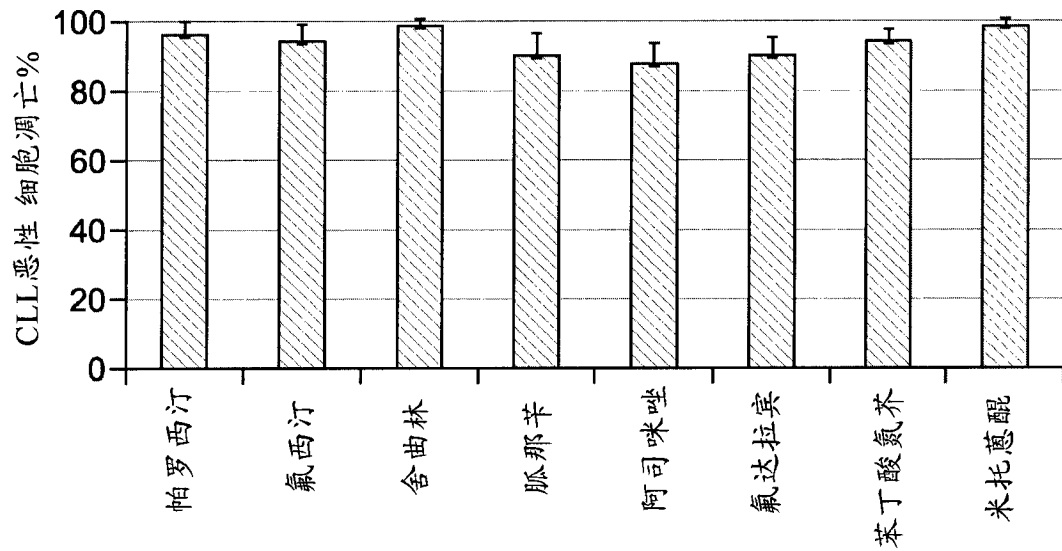


图6

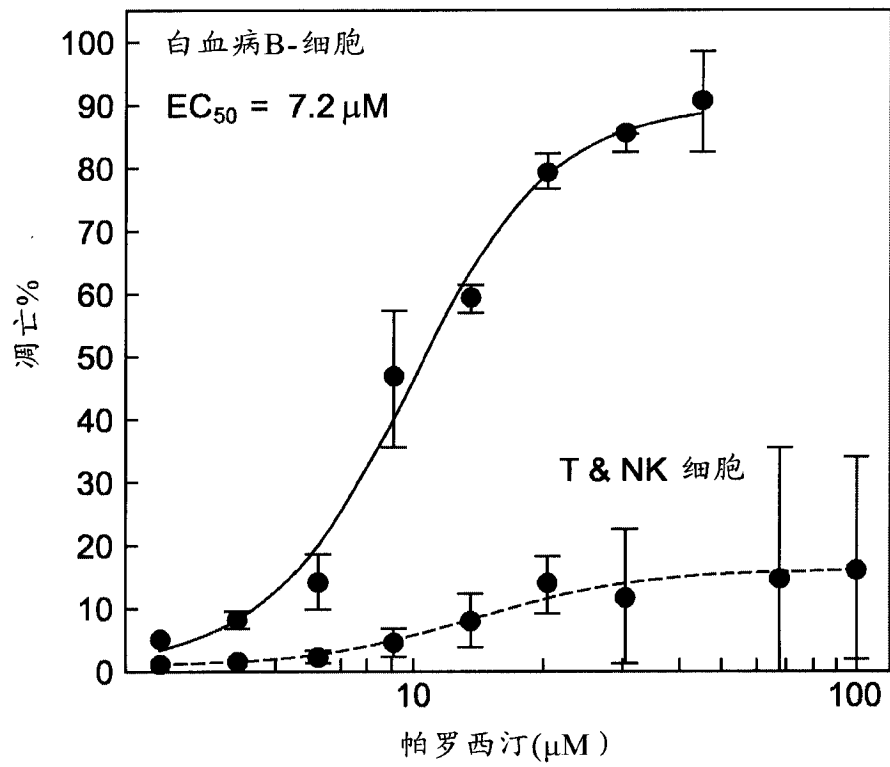


图7

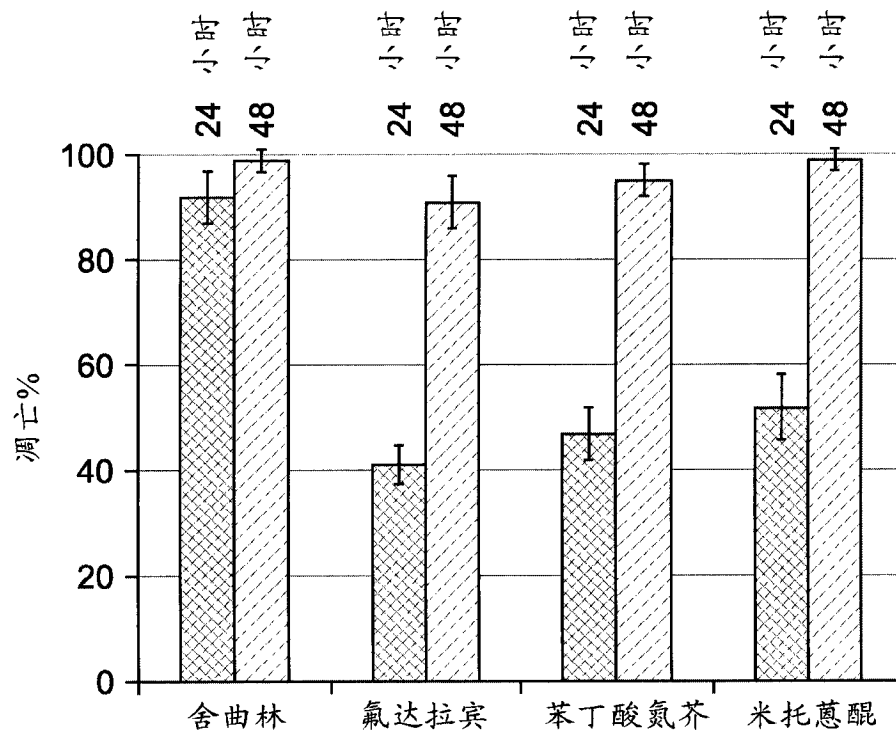


图8

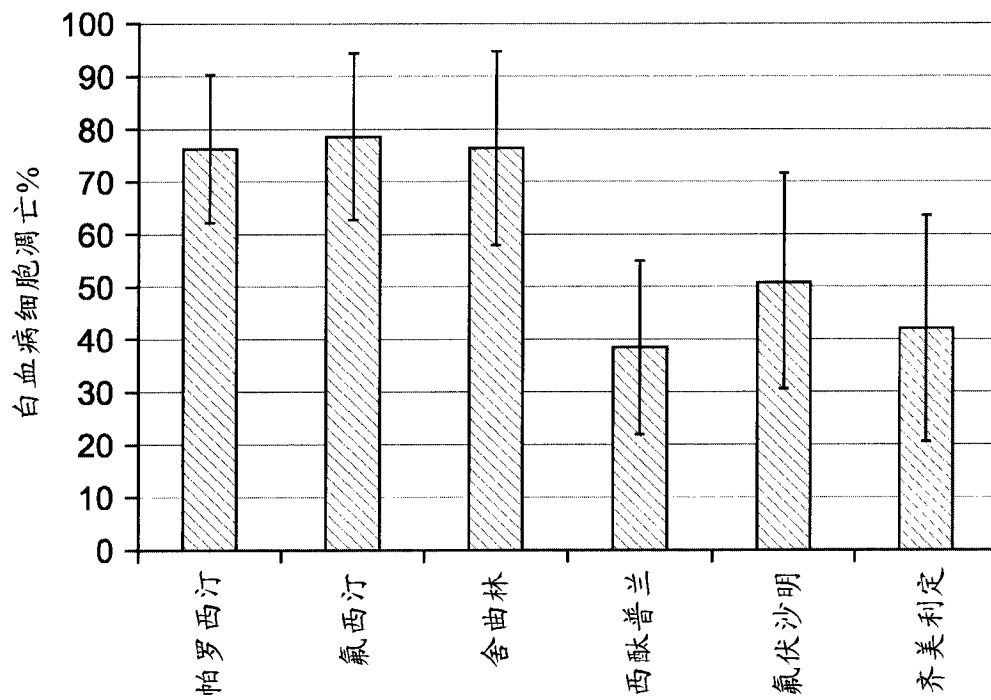


图9

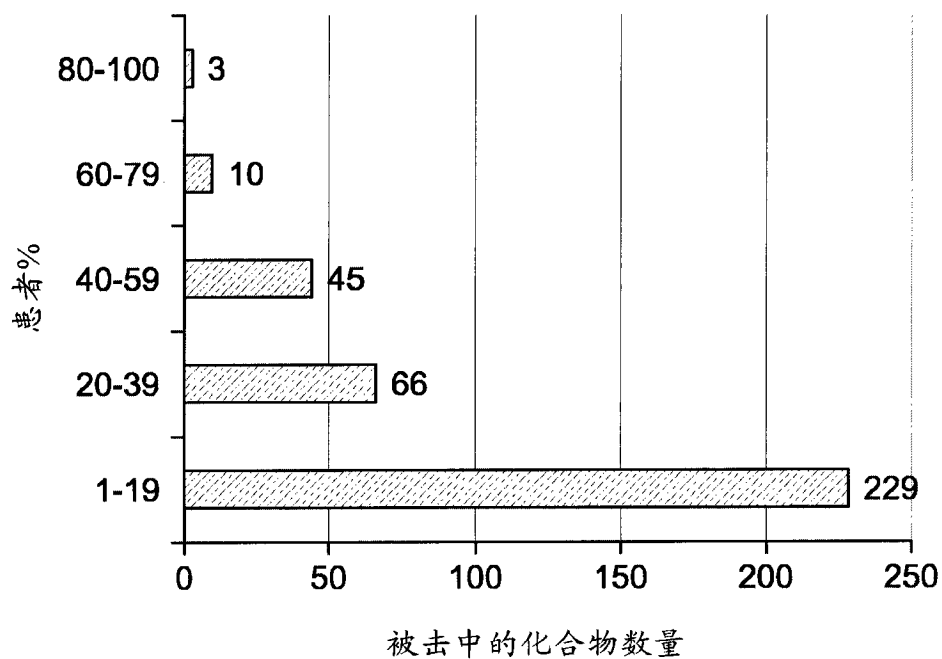


图10

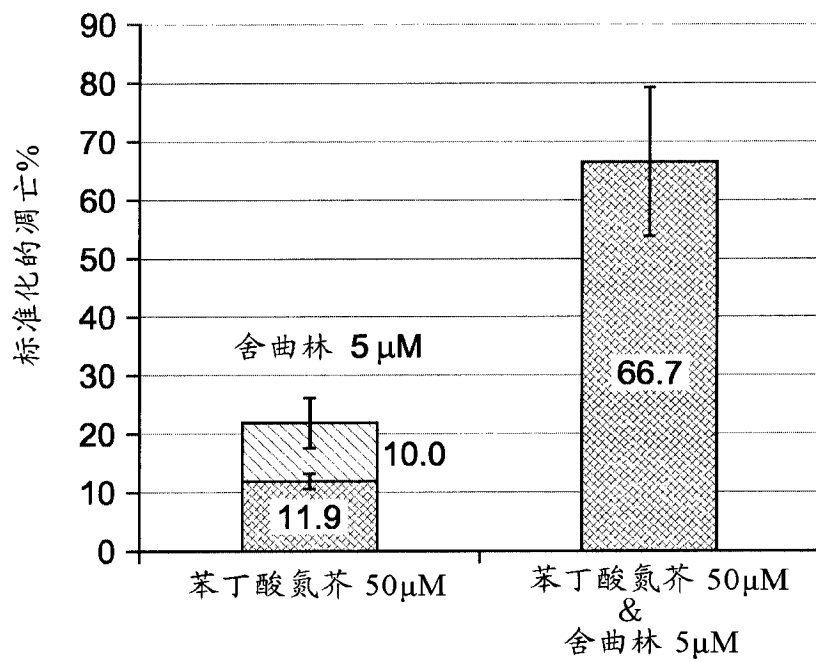


图11

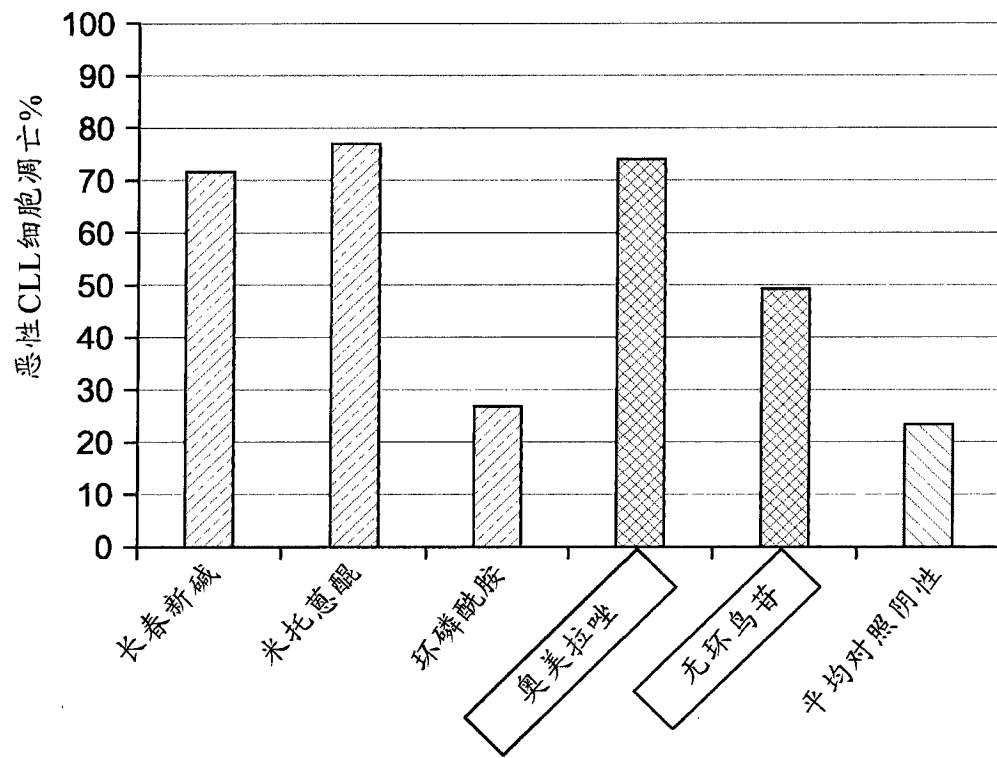


图12

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		10 μ M	苯丁酸氮芥=CH				1 μ M		氟达拉滨=FU			VIVIA007 50 μ M
B		30 μ M	马磷酰胺=MA				1 μ M		多柔比星=DO			
C		1 μ M	长春新碱=VI				30 μ M		泼尼松龙=PR			
D	DMSO 0.34%	1 μ M	米托蒽醌=MI				1 μ M		2-氯脱氧腺苷=2CdA			
E		3 μ M	夫拉平度=FL				30 μ M		美法仑=ME			星形孢菌素 50 Mm
F		300 μ M	甲基泼尼松龙=MEPR				120 μ M		苯达莫司汀=BE			
G			CHOP: MA+DO+VI+PR						MA+DO+VI			
H			CA: MA+DO+PR						COP/CVP: MA+VI+PR			

图13A

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		10μM 西罗莫司脂化物 = Te					10μM 替吡法尼 = Ti					
B		10μM 顺铂 = cP					100μM 依托泊甙 = E					VIVIA007 50 μM
C			MP						LD			
D			VD						TD			
E				CP					MPT			星形孢菌素
F				MPL					VMP			50 mM
G				VAD					VTP			
H				VTD					VCD			

图14B

12	VIVIA007 50 μ M			星形孢菌素 50 mM			
11							
10							
9	ML	VP	AD	VP	VC	CP	VcP
8							
7							
6							
5							
4	MT	VM	VA	VT	TP	CD	VL
3							
2							
1	DMSO 0,34%						
	A	B	C	D	E	F	G

图14D

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A				TA					CA			
B				EA					cPA			
C				cPC					cPE			
D				VE					DE			
E				TE					LcP			
F				LA					LC			
G				LE					TC			
H				AM					AP			

图14E

12	VIVIA007 50 μ M			星形孢菌素 50 mM			
11							
10							
9	VIC	ViP	BM	ViA	BA		
8							
7							
6							
5							
4	VIB	ViM	BC	BP	ViD	BD	
3							
2							
1	DMSO 0,34%						
	A	B	C	D	E	F	G

图14F

孔1 氨甲喋呤	孔2 6-巯基嘌呤	孔3 阿糖胞苷	孔4 柔红霉素	孔5 阿霉素	孔6 米托蒽醌	孔7 依托泊甙	孔8 替尼泊甙	孔9 环磷酰胺	孔10 异环磷酰胺
孔11 长春新碱	孔12 长春地辛	孔13 门冬酰胺酶	孔14 伊马替尼	孔15 利妥昔单抗	孔16 泼尼松	孔17 氯化可的松	孔18 地塞米松	孔19 亚叶酸	孔20 Mesna
孔21 奥美拉唑	孔22 恩丹西酮	孔23 别嘌醇	孔24 非格司亭	孔25 V + DNR + P	孔26 V + P + M + ARA-C	孔27 V + DNR + L-ASA + CF + P	孔28 MTX + ARA-C + HC (鞘内)	孔29 DXM + V + MTX + ARA-C	孔30 DXM + V + MTX + CF + L-ASA + M
孔31 DXM + ARA-C + VM-26 + L-ASA	孔32 MTX + VM-26 + ARA-C + 6MP	孔33 V + DNR + CF + L-ASA + DXM	孔34 MTX + 6MP	孔35 MTX + 6MP + V + L-ASA + P	孔36 DXM + V + MTX + ARA-C + HC + O + Allop + Foli + Om + GCSEF	孔37 DXM + V + MTX + CF + L-ASA + M + ARA-C + HC + O + Allop + Foli + Om + GCSEF + Mesna	孔38 DXM + ARA-C + VM-26 + L-ASA + MTX + ARA-C + HC + O + Allop + Om + GCSEF	孔39 MTX + VM-26 + ARA-C + 6MP + HC + O + Allop + Foli + Om + GCSEF	孔40 V + DNR + CF + L-ASA + DXM + MTX + ARA-C + HC + O + Allop + Om + GCSEF + Mesna
孔41 MTX + 6MP + ARA-C + HC + O + Allop + Foli + Om + GCSEF	孔42 MTX + 6MP + V + L-ASA + P + ARA-C + HC + O + Allop + Foli + Om + GCSEF	孔43 V + DNR + P + MTX + ARA-C + HC + O + Allop + Om + GCSEF	孔44 V + P + M + ARA-C + MTX + HC + O + Allop + Om + GCSEF	孔45 V + DNR + L-ASA + CF + P + MTX + ARA-C + HC + O + Allop + Foli + Om + GCSEF + Mesna	孔46 V + DNR + ARA-C + IMAT + P	孔47 MTX + VM-26 + ARA-C + IMAT	孔48 V + DNR + CF + L-ASA + DXM + IMAT	孔49 V + DNR + ARA-C + IMAT + P + MTX + HC + O + Allop + Om + GCSEF	孔50 MTX + VM-26 + ARA-C + IMAT + HC + O + Allop + Om + GCSEF

图15

3L51	3L52	3L53	3L54	3L55	3L56	3L57	3L58	3L59	3L60
V + DNR + CF + L-ASA + DXM + IMAT + MTX + ARA-C + HC + O + Allop + Om + GCSF + Mesna	CF + P	R + DXM + VR + MTX + IFOS + VM-26 + ARA-C	R + DXM + VR + MTX + CF + ADRIA	VR + DXM + VIND + VP-16 + ARA-C	R + DXM + MTX + IFOS + ARA-C + VM-26	R + DXM + CF + ADRIA	CF + P + MTX + ARA-C + O + Allop + Om + GCSF + Mesna	R + DXM + IFOS + MTX + VM-26 + ARA-C + HC + ADRIA + Om + GCSF + Mesna	R + DXM + V + IFOS + MTX + HC + ADRIA + Om + GCSF + Mesna
3L61	3L62	3L63	3L64	3L65	3L66	3L67	3L68	3L69	3L70
R + DXM + VIND + MTX + VP-16 + ARA-C + HC + O + Allop + Om + GCSF + Mesna	R + DXM + IFOS + HC + O + Allop + Om + GCSF + Mesna	R + DXM + MTX + CF + ARA-C + HC + O + Allop + Om + GCSF + Mesna	V + M + MTX + DXM	V + MTX + ARA-C + DXM	V + MTX + L-ASA + ARA-C + VM-26	M + MTX + ARA-C + VM-26	M + MTX + L-ASA + ARA-C + VM-26	M + MTX + L-ASA + ARA-C + VM-26	M + MTX + L-ASA + ARA-C + VM-26
3L71	3L72	3L73	3L74	3L75	3L76	3L77	3L78	3L79	3L80
IMAT + V + DNR	IMAT + V + ARA-C	IMAT + L-ASA + V	IMAT + CF + V	R + CF + P	R + V + IFOS	R + V + MTX	R + V + MTX + ARA-C + VM-26	R + VIND + VP-16	R + MTX + IFOS + VP-16 + ARA-C
3L81	3L82	3L83	3L84	3L85	3L86	3L87	3L88	3L89	3L90
V + M + MTX + DXM + ARA-C + O + Allop + Om + GCSF	V + MTX + ARA-C + O + Allop + Om + GCSF	V + MTX + L-ASA + ARA-C + O + Allop + Om + GCSF	M + MTX + ARA-C + O + Allop + Om + GCSF	M + MTX + DXM + L-ASA + ARA-C + O + Allop + Om + GCSF	M + MTX + ARA-C + O + Allop + Om + GCSF	M + MTX + ARA-C + O + Allop + Om + GCSF	M + MTX + ARA-C + O + Allop + Om + GCSF	M + MTX + ARA-C + O + Allop + Om + GCSF	M + MTX + ARA-C + O + Allop + Om + GCSF

3L91	3L92	3L93	3L94	3L95	3L96
R + VIND + VP-16 + ARA-C + HC + O + Allop + Om + GCSF	R + MTX + VP-16 + ARA-C + HC + O + Allop + Om + GCSF	IMAT + V + ARA-C + HC + O + Allop + Om + GCSF	IMAT + V + MTX + ARA-C + HC + O + Allop + Om + GCSF	IMAT + CF + MTX + ARA-C + HC + O + Allop + Om + GCSF	R + CF + P + MTX + ARA-C + HC + O + Allop + Om + GCSF

图15续

图15续

1° 单独应用药物			2° 根据不同Pethema SMD/98 的联合用药	
孔1 促红细胞生成素	孔2 非格司亭	孔3 沙利度胺	孔19 Fluda + ARA-C + Ida + GCSF	孔20 Fluda + ARA-C
孔4 环孢素	孔5 胸腺球蛋白	孔6 三氧化二砷	孔21 Fluda + Ida	孔22 Fluda + GCSF
孔7 氮杂胞苷	孔8 地西他滨	孔9 氟达拉滨	孔23 ARA-C + Ida	孔24 ARA-C + GCSF
孔10 依托泊甙	孔11 阿糖胞苷	孔12 伊达比星	孔25 Ida + GCSF	孔26 ARA-C + Ida + GCSF
孔13 卡铂	孔14 泼尼松	孔15 恩丹西酮	孔27 Fluda + ARA-C + Ida + GCSF + Ondan + Om + Alop + Cotri + AcF	孔28 Fluda + ARA-C + Ondan + Om + Alop + Cotri + AcF
孔16 奥美拉唑	孔17 别嘌醇	孔18 复方磺胺 甲噁唑+叶酸	孔29 Fluda + Ida + Ondan + Om + Alop + Cotri + AcF	孔30 Fluda + GCSF + Ondan + Om + Alop + Cotri + AcF
Cetlam SMD < 65 年			孔31 ARA-C + Ida + Ondan + Om + Alop + Cotri + AcF	孔32 ARA-C + GCSF + Ondan + Om + Alop + Cotri + AcF
孔37 Ida + ARA-C + VP-16	孔38 Ida + VP-16		孔33 Ida + GCSF + Ondan + Om + Alop + Cotri + AcF	孔34 ARA-C + Ida + GCSF + Ondan + Om + Alop + Cotri + AcF
孔39 ARA-C + VP-16	孔40 Ida + ARA-C + VP-16 + Ondan + Om + Alop		孔35 Carbop + GCSF	孔36 Carbop + GCSF + Ondan + Om + Alop + Cotri + AcF
孔41 Ida + VP-16 + Ondan + Om + Alop	孔42 ARA-C + VP-16 + Ondan + Om + Alop		Fluda: 氟达拉滨 ARA-C: 阿糖胞苷 Ida: 伊达比星 GCSF: 非格司亭 Carbop: 卡铂	
VP-16: 依托泊甙			Pethema ATG-CsA 2002	
3° 所用的其它药物组合			孔43 ATG + CsA + Pred	孔44 ATG + CsA
孔52 氮杂胞苷 + Ondans + Om + Alop	孔53 地西他滨 + Ondans + Om + Alop		孔45 CsA + Pred	孔46 ATG + Paracet + Polar
孔54 EPO + 非格司亭	孔55 沙利度胺 + Ondans + Om + Alop		孔47 ATG + CsA + Pred + Ondan + Om + Alop	孔48 ATG + Pred + Ondan + Om + Alop
孔56 三氧化二砷 + Ondan + Om + Alop			孔49 CsA + Pred + Ondan + Om + Alop	
EPO: 促红细胞生成素			ATG: 兔抗胸腺细胞球蛋白 CsA: 环孢素 Pred: 泼尼松	

图16

孔1 柔红霉素	孔2 伊达比星	孔3 ARA-C	孔4 米托蒽醌	孔5 依托泊甙	孔6 氟达拉滨	孔7 Dauno + ARA-C	孔8 Ida + ARA-C	孔9 Fluda + Ida + ARA-C + GCSF	孔10 Fluda + Ida
孔11 Fluda + ARA-C	孔12 Fluda + GCSF	孔13 Fluda + Ida + GCSF	孔14 Fluda + ARA-C + GCSF	孔15 Ida + ARA-C + VP-16	孔16 Ida + VP-16	孔17 VP-16 + ARA-C	孔18 Mitox + ARA-C	孔19 Dauno + Om + Ondans + Alop	孔20 Ida + Om + Ondans + Alop
孔21 ARA-C + Om + Ondans	孔22 Mitox + Om + Ondans + Alop	孔23 VP-16 + Om + Ondans + Alop	孔24 Fluda + Om + Ondans + Alop + Cotri + AcF	孔25 Dauno + ARA-C + Om + Ondans + Alop	孔26 Ida + ARA-C + Om + Ondans + Alop	孔27 Fluda + Ida + ARA-C + GCSF + Om + Ondans + Alop + Cotri + AcF	孔28 Fluda + Ida + Om + Ondans + Alop + Cotri + AcF	孔29 Fluda + ARA-C + Om + Ondans + Alop + Cotri + AcF	孔30 Fluda + GCSF + Om + Ondans + Alop + Cotri + AcF
孔31 Fluda + Ida + GCSF + Om + Ondans + Alop + Cotri + AcF	孔32 Fluda + ARA-C + GCSF + Om + Ondans + Alop + Cotri + AcF	孔33 Ida + ARA-C + VP-16 + Om + Ondans + Alop	孔34 Ida + VP-16 + Om + Ondans + Alop	孔35 VP-16 + ARA-C + Om + Ondans + Alop	孔36 Mitox + ARA-C + Om + Ondans + Alop	孔37 Amasrine *	孔38 Carboplatin	孔39 AMSA + ARA-C	孔40 ARA-C + Ida + GCSF
孔41 Ida + GCSF	孔42 Carbop + GCSF	孔43 AMSA + Om + Ondans + Alop	孔44 Carbop + Om + Ondans + Alop	孔45 AMSA + ARA-C + Om + Ondans + Alop	孔46 ARA-C + Ida + GCSF + Om + Ondans + Alop + Cotri + AcF	孔47 Ida + GCSF + Om + Ondans + Alop	孔48 Carbop + GCSF + Om + Ondans + Alop + Cotri + AcF	孔49 Dauno lipo	孔50 Dauno lipo + ARA-C
孔51 Mitox + ARA-C + VP-16	孔52 Mitox + VP-16	孔53 Dauno lipo + Mitox	孔54 Dauno lipo + VP-16	孔55 Dauno lipo + Om + Ondans + Alop	孔56 Dauno lipo + ARA-C + Om + Ondans + Alop	孔57 Mitox + ARA-C + VP-16 + Om + Ondans + Alop	孔58 Mitox + VP-16 + Om + Ondans + Alop	孔59 Dauno lipo + Mitox + Om + Ondans + Alop	孔60 Dauno lipo + VP-16 + Om + Ondans + Alop
孔61 Dauno + Fluda	孔62 Dauno + Carbop	孔63 Dauno lipo + Fluda	孔64 Dauno lipo + Carbop	孔65 Fluda + Carbop	孔66 Dauno + Mitox	孔67 Dauno + VP-16	孔68 Dauno + AMSA	孔69 Ida + Mitox	孔70 Ida + AMSA

图17

孔71 Ida + Carbop	孔72 Fluda + Mitox	孔73 Fluda + VP-16	孔74 Mitox + AMSA	孔75 Mitox + Carbop	孔76 VP-16 + AMSA	孔77 VP-16 + Carbop	孔78 AMSA + Fluda	孔79 6-巯基嘌呤	孔80 羟基脲
孔81 恩丹西酮	孔82 别嘌醇	孔83 奥美拉唑	孔84 GCSF	孔85 复方磺胺甲噁唑	孔86 Om + Ondans + Alop	孔87 Om + Ondans + Alop + Ctori + AcF	孔88 GO	孔89 GO + ARA-C	孔90 GO + Ida + ARA-C
孔91 GO	孔92 GO + Om + Ondans + Alop	孔93 GO + ARA-C + Om + Ondans + Alop	孔94 GO + Ida + ARA-C + Om + Ondans + Alop	孔95 GO + Ida + Om + Ondans + Alop					

图17续

孔1 维甲酸	孔2 伊达比星	孔3 米托蒽醌	孔4 阿糖胞苷	孔5 6-巯基嘌呤	孔6 氮甲喋呤	孔7 恩丹西酮	孔8 别嘌醇	孔9 奥美拉唑	孔10 地塞米松
孔11 ATRA + Ida	孔12 ATRA + Ida + Ondans + Alop + Om	孔13 ATRA + Ida + Ondans + Alop + Om + Dexa	孔14 ATRA + Mitox	孔15 ATRA + Ida + ARA-C	孔16 ATRA + ARA-C	孔17 Ida + ARA-C	孔18 Ida + Mitox	孔19 ATRA + Mitox + Ondans + Alop + Om	孔20 ATRA + Ida + ARA-C + Ondans + Alop + Om
孔21 ATRA + ARA-C + Ondans + Alop + Om	孔22 Ida + ARA-C + Ondans + Alop + Om	孔23 Ida + Mitox + Ondans + Alop + Om	孔24 6-MP + MTX + ATRA	孔25 6-MP + MTX	孔26 ATRA + 6-MP	孔27 ATRA + MTX	孔28 6-MP + MTX + ATRA + Om	孔29 6-MP + MTX + Om	孔30 ATRA + 6-MP + Om
孔31 ATRA + MTX + Om	孔32 ARA-C + Mitox + ATRA	孔33 ARA-C + Mitox + ATRA + Ondans + Alop + Om	孔34 ARA-C + Mitox + ATRA + Ondans + Alop + Om	孔35 ARA-C + Mitox + Ondans + Alop + Om	孔36 ATRA + Dauno	孔37 ATRA + VP-16	孔38 ATRA + Fluda	孔39 ATRA + Carbop	孔40 Dauno lipo
孔41 ATRA + Dauno + Ondans + Alop + Om	孔42 ATRA + VP-16 + Ondans + Alop + Om	孔43 ATRA + Fluda + Ondans + Alop + Cotri + FAC	孔44 ATRA + Carbop + Ondans + Alop + Om	孔45 ATRA + Dauno lipo + Ondans + Alop + Om					

图18

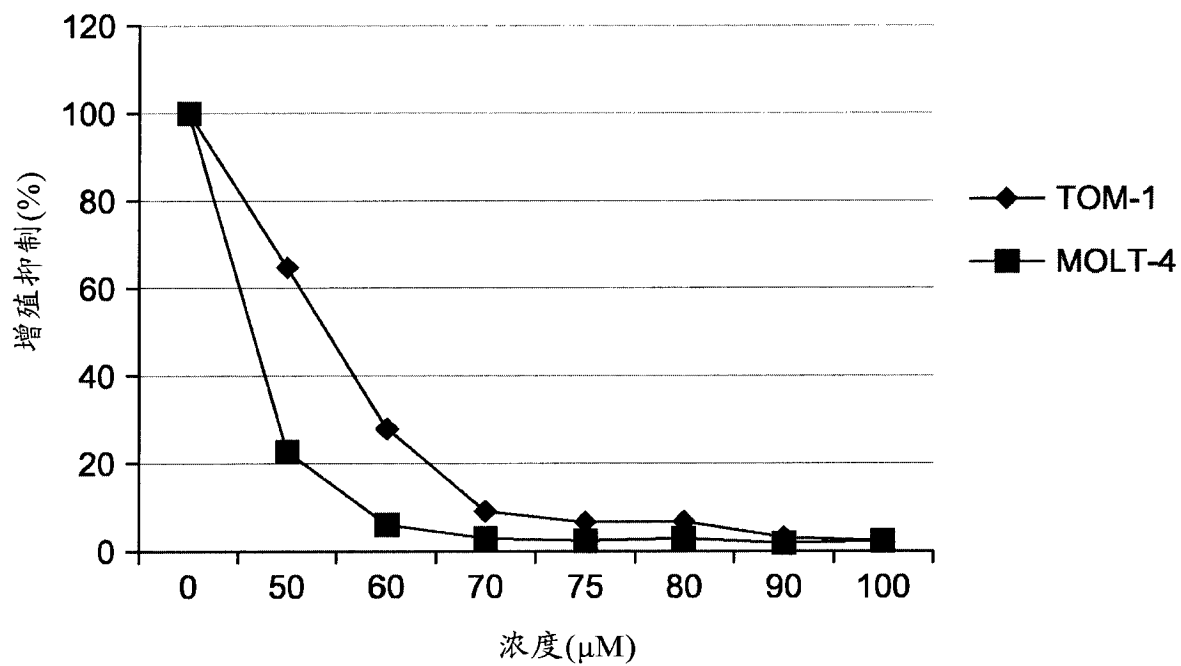


图19

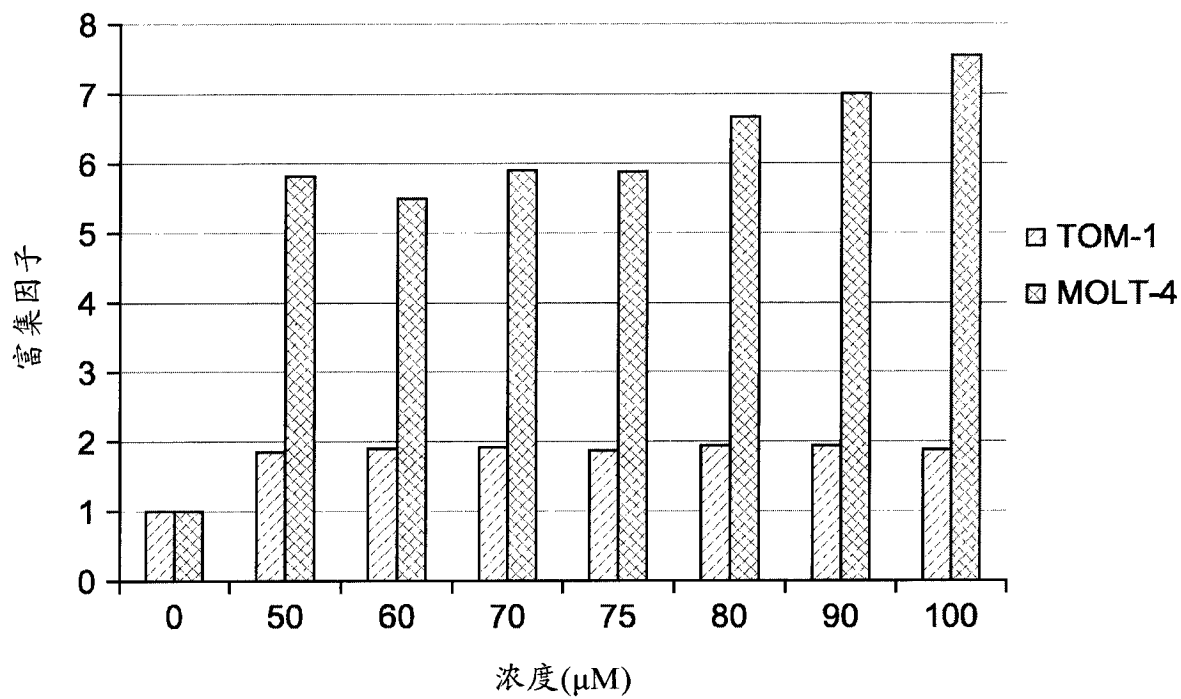


图20

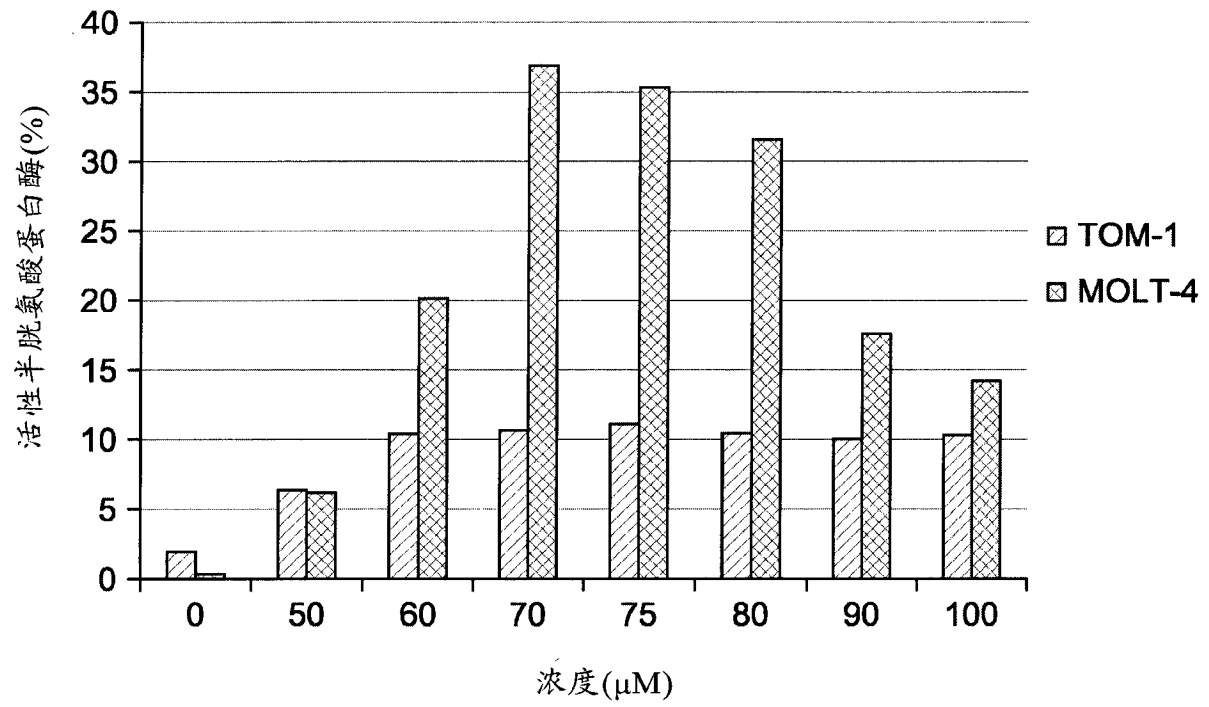


图21

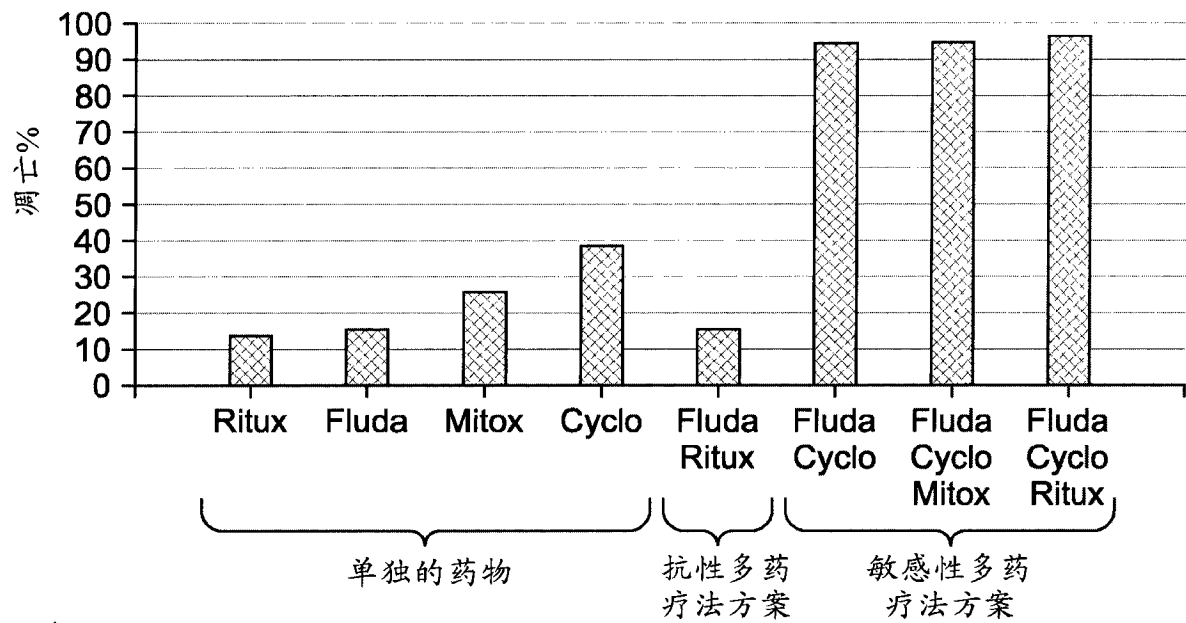


图22

(μM)	氟达拉宾	环磷酰胺
1	1	30
2	0.33	10
3	0.11	3.33
4	0.037	1.11
5	0.012	0.37

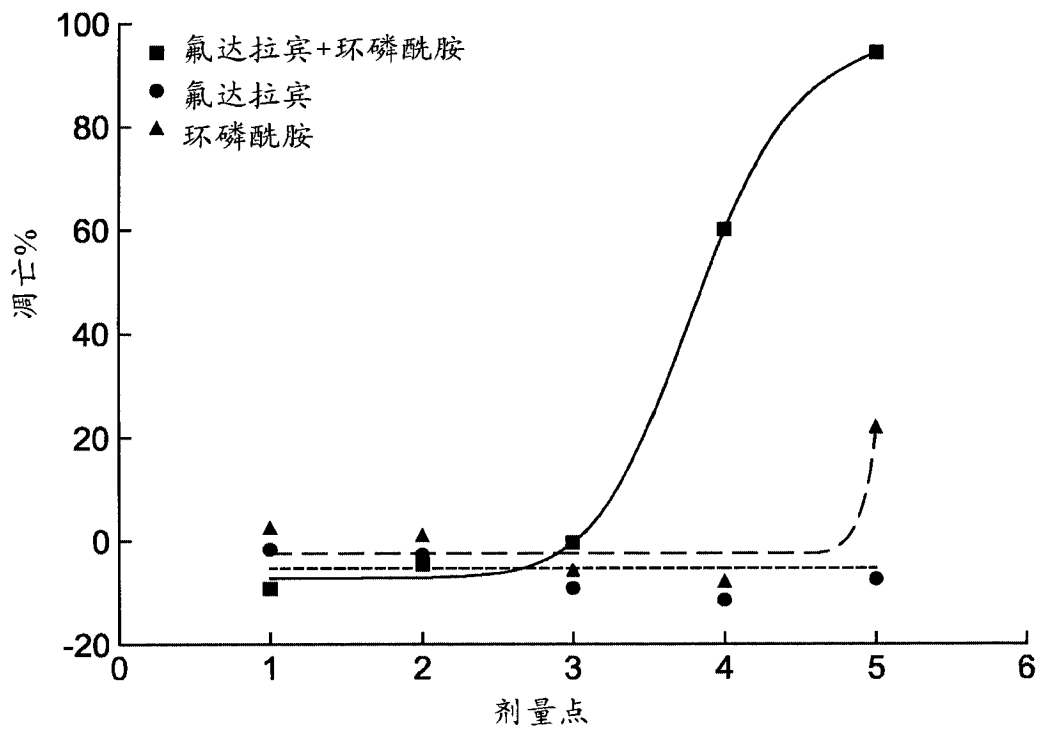


图23

(μM)	氟达拉宾	环磷酰胺	米托蒽醌
1	1	30	1
2	0.33	10	0.33
3	0.11	3.33	0.11
4	0.037	1.11	0.037

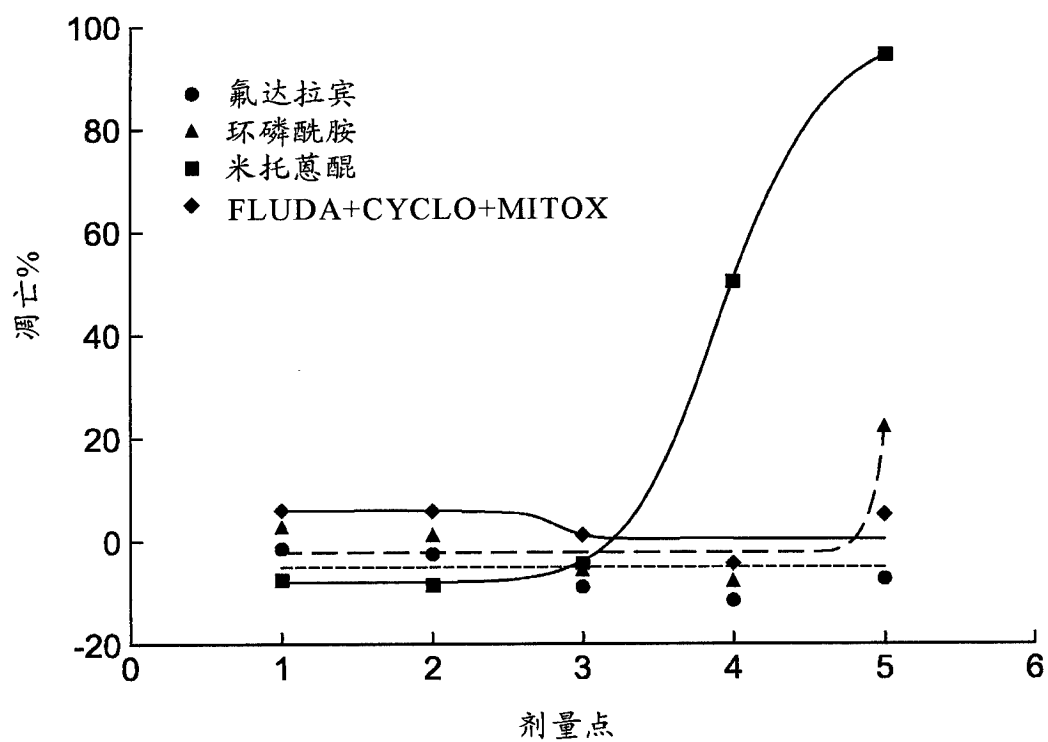


图24

(μM)	氟达拉滨	环磷酰胺	利妥昔单抗
1	1	30	30
2	0.33	10	10
3	0.11	3.33	3.33
4	0.037	1.11	1.11
5	0.012	0.37	0.37

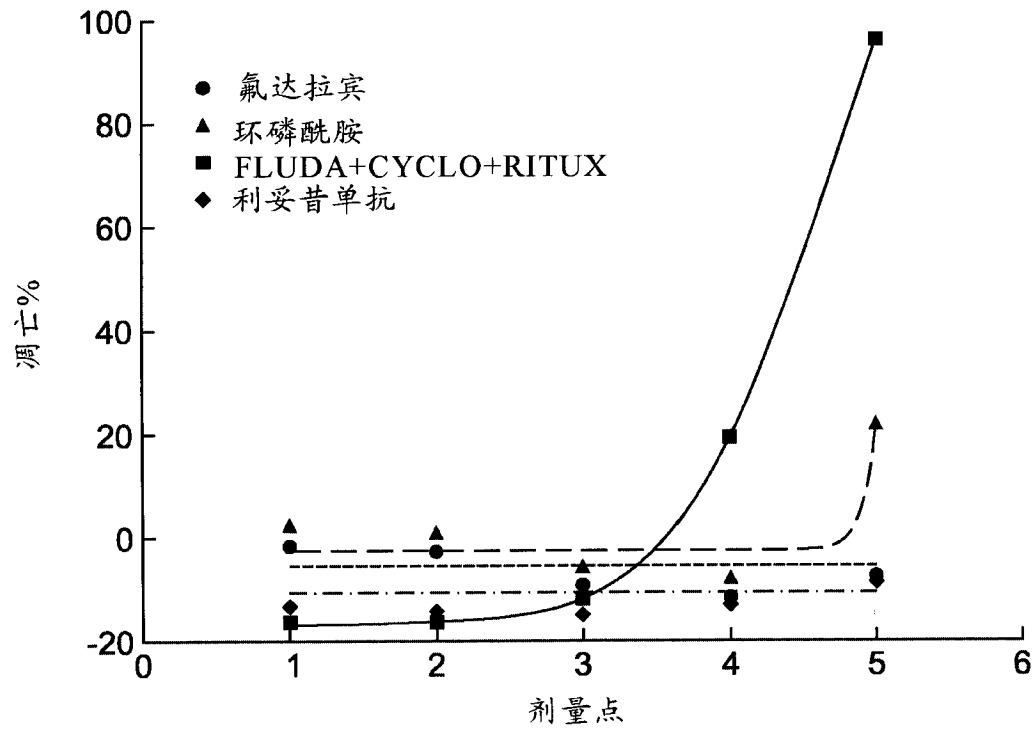


图25

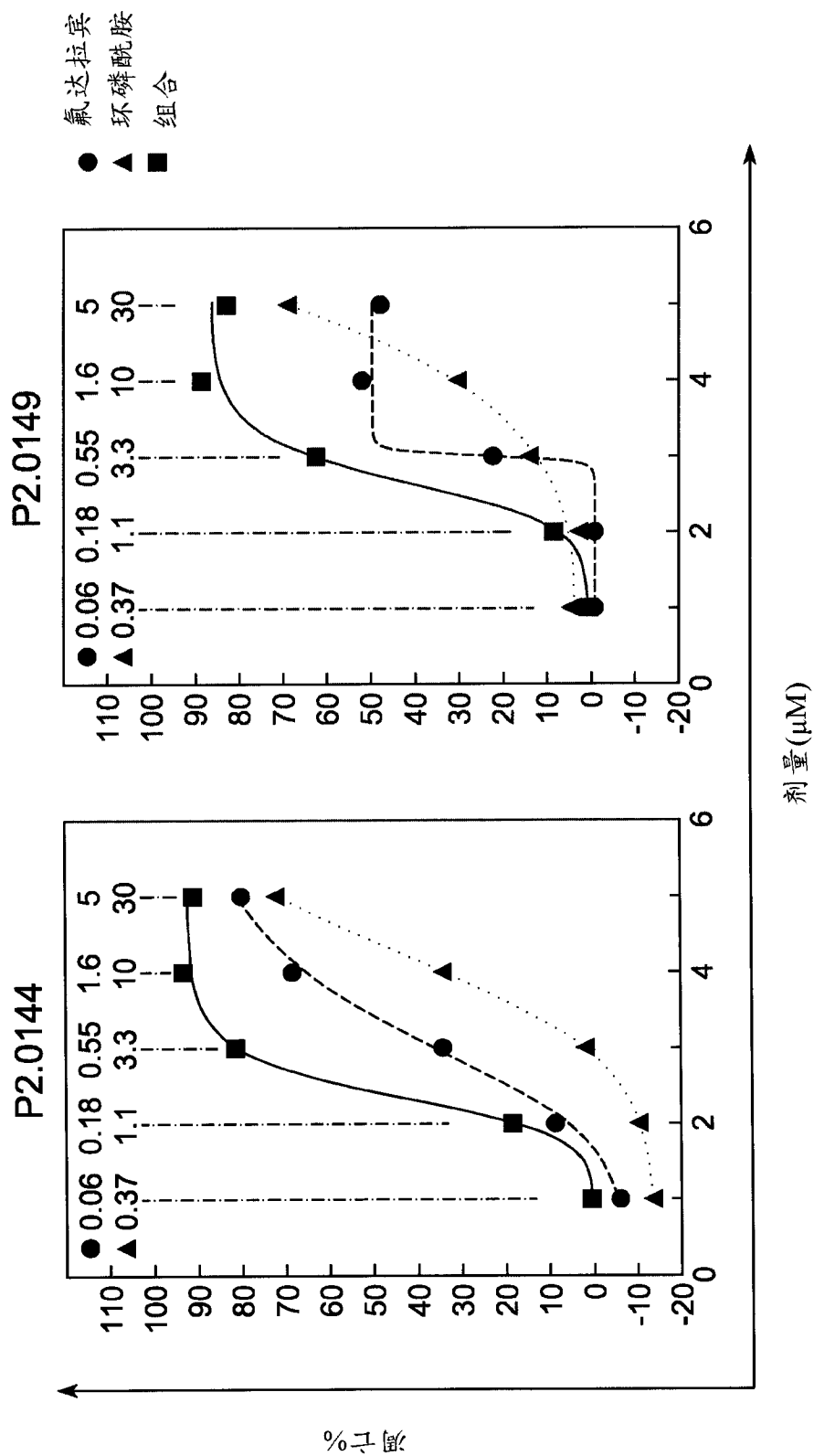


图26

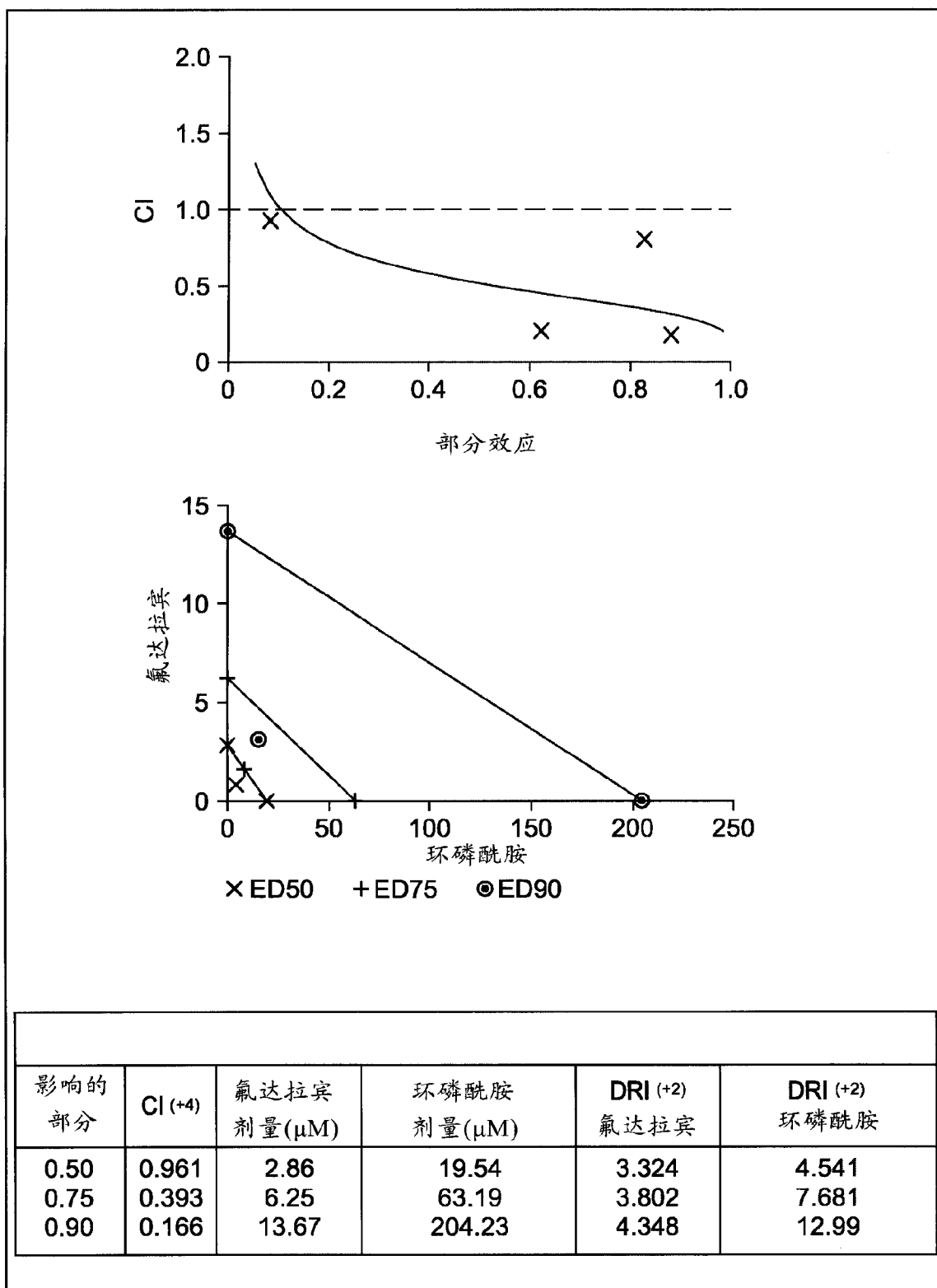


图27

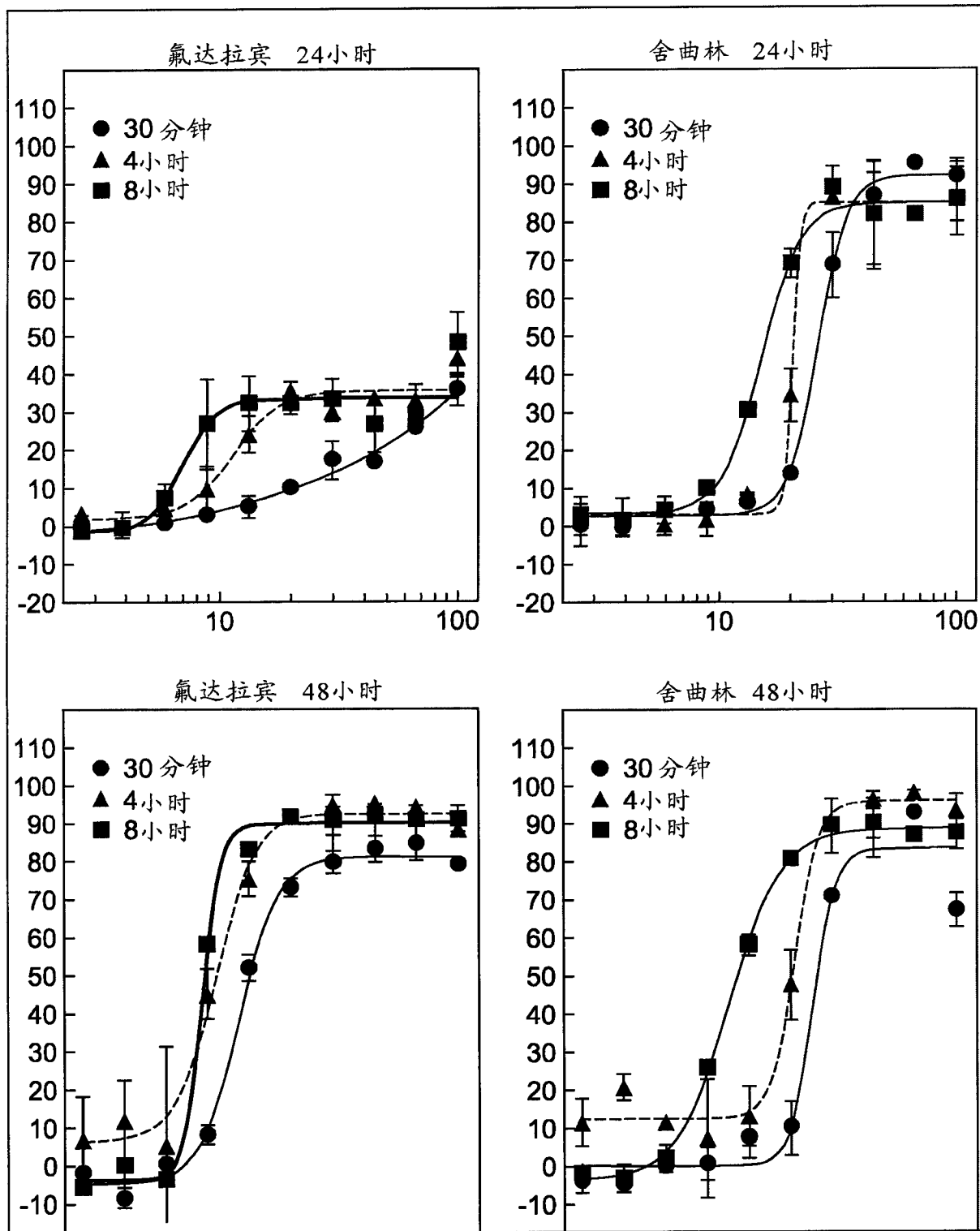


图28

	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	1,2	1,3	1,4	1,5	1,6	1,7	1,8	1,9	1,10	1,11	1,12	1,13	1,14	1,15
2		2,3	2,4	2,5	2,6	2,7	2,8	2,9	2,10	2,11	2,12	2,13	2,14	2,15
3			3,4	3,5	3,6	3,7	3,8	3,9	3,10	3,11	3,12	3,13	3,14	3,15
4				4,5	4,6	4,7	4,8	4,9	4,10	4,11	4,12	4,13	4,14	4,15
5					5,6	5,7	5,8	5,9	5,10	5,11	5,12	5,13	5,14	5,15
6						6,7	6,8	6,9	6,10	6,11	6,12	6,13	6,14	6,15
7							7,8	7,9	7,10	7,11	7,12	7,13	7,14	7,15
8								8,9	8,10	8,11	8,12	8,13	8,14	8,15
9									9,10	9,11	9,12	9,13	9,14	9,15
10										10,11	10,12	10,13	10,14	10,15
11											11,12	11,13	11,14	11,15
12												12,13	12,14	12,15
13													13,14	13,15
14														14,15

图29

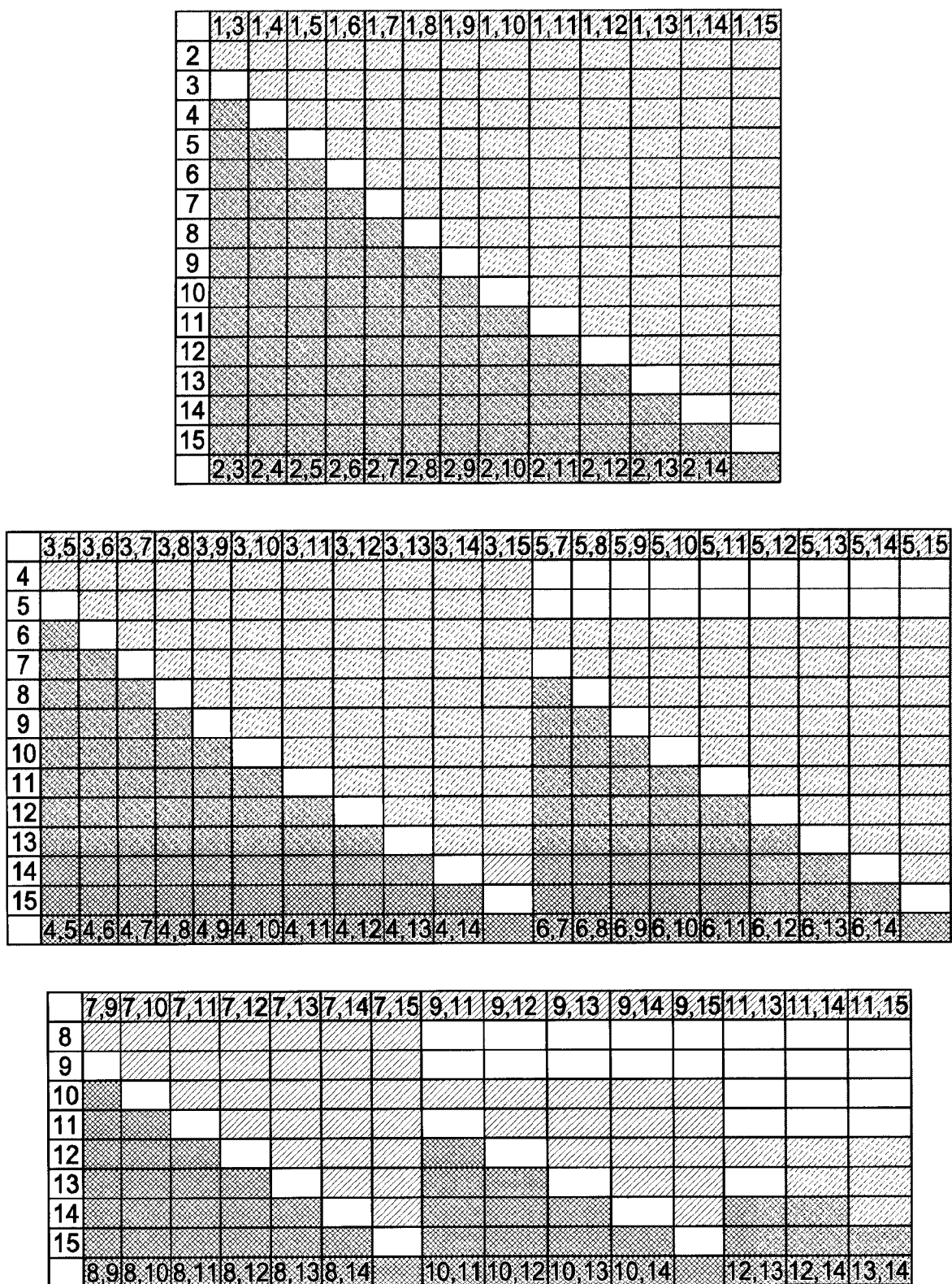


图30

图31

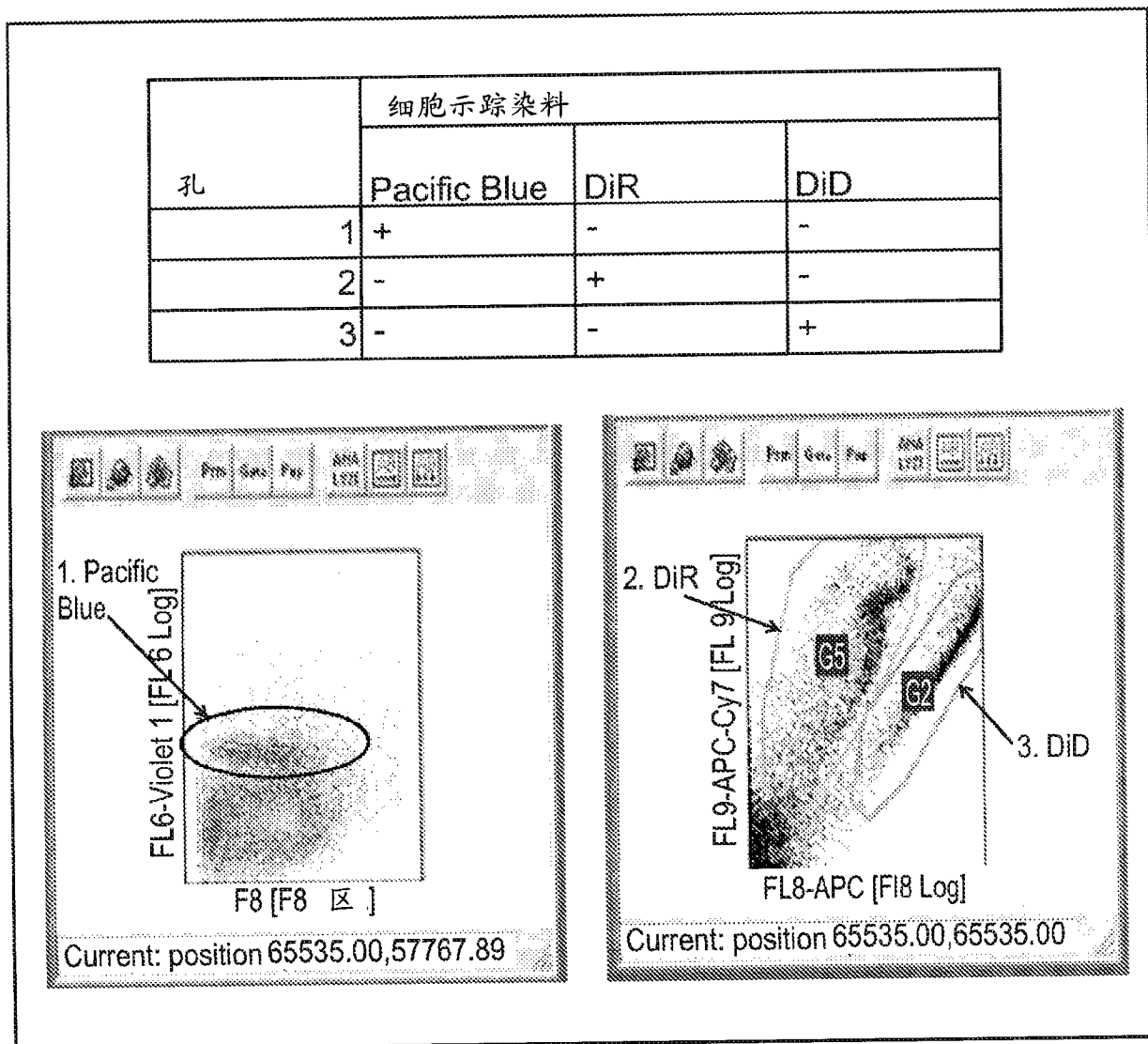


图32

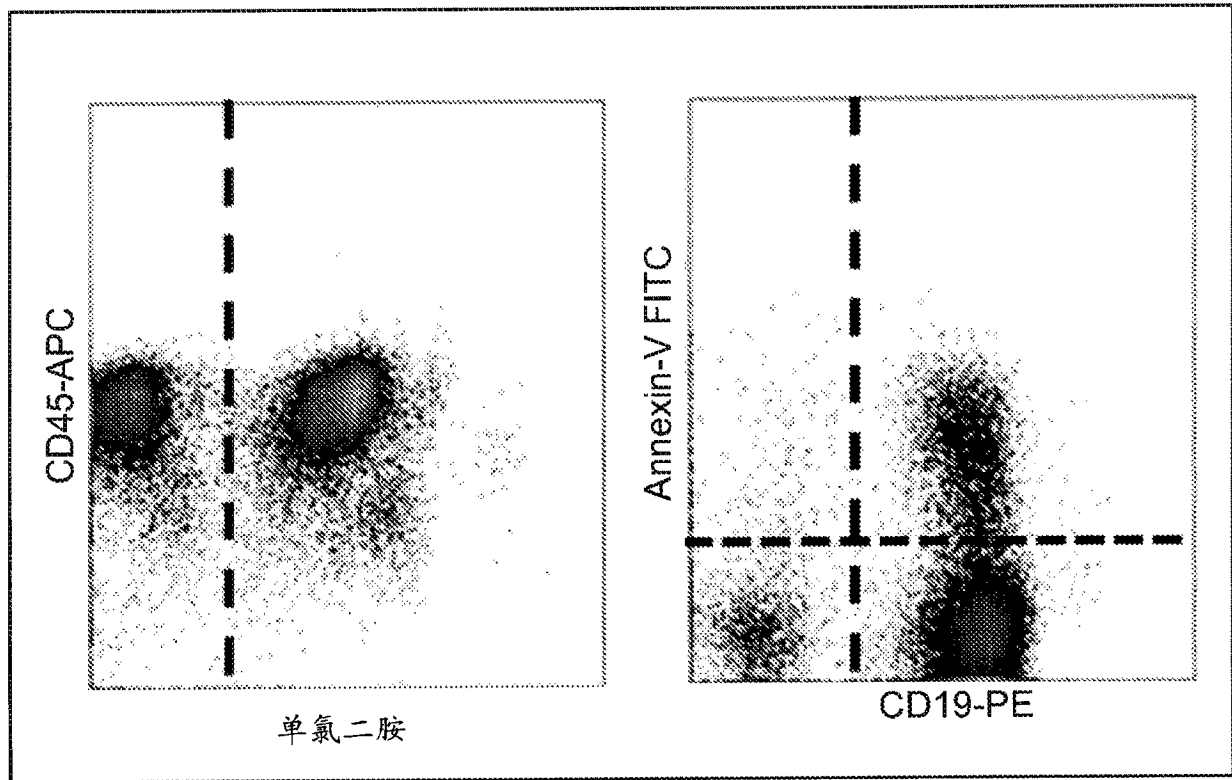


图33