



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 113265441 B

(45) 授权公告日 2023. 02. 28

(21) 申请号 202110452817.2

(22) 申请日 2021.04.26

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 113265441 A

(43) 申请公布日 2021.08.17

(73) 专利权人 丹望医疗科技(上海)有限公司

地址 201802 上海市嘉定区沪宜公路1185
号1幢1层JT3140室

(72) 发明人 富国祥 程春燕 李俊强

(74) 专利代理机构 北京清亦华知识产权代理事

务所(普通合伙) 11201

专利代理师 肖阳

(51) Int. Cl.

C12Q 1/02 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 112176021 A, 2021.01.05

CN 111197030 A, 2020.05.26

CN 111534564 A, 2020.08.14

审查员 刘慧

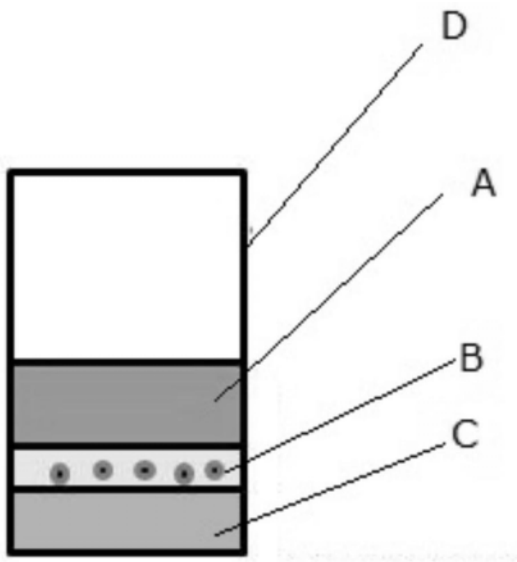
权利要求书1页 说明书8页 附图3页

(54) 发明名称

三明治夹层培养体系用于检测类器官对大
分子药物敏感性的方法

(57) 摘要

本发明涉及生物医药技术领域,具体地,本
发明涉及三明治夹层培养体系用于检测类器官
对大分子药物敏感性的方法。本发明提供一种检
测类器官对药物敏感性的方法,在三明治夹层培
养体系中,将类器官与待测药物接触,以便检测
所述类器官对所述待测药物的敏感性,其中,将
类器官置于10-30% (V/V) 的基质胶中与条件培
养基接触,能够改善类器官对药物的敏感性,解
决了大分子药物在现阶段的类器官培养体系中的
药物敏感性不高的问题。



1. 一种检测类器官对药物敏感性的方法,其特征在于,所述方法包括:
在三明治夹层培养体系中,将类器官与待测药物接触,以便检测所述类器官对所述待测药物的敏感性,
其中,所述三明治夹层培养体系自上而下包括条件培养基层、中间层以及包被层,
所述类器官在所述中间层中培养,所述中间层含有10-30% (V/V) 的基质胶;
所述待测药物选自抗体药物、抗体偶联药物和双抗体药物中的至少之一;所述待测药物分子量为100-1000KDa。
2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述待测药物分子量为100-500KDa。
3. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述类器官选自肿瘤组织来源类器官、正常组织来源类器官或干细胞来源类器官。
4. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述类器官为肿瘤组织来源类器官。
5. 根据权利要求1或3或4所述的方法,其特征在于,所述类器官源自商用胚胎干细胞、多能干细胞或成体体细胞。
6. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述条件培养基层中含有类器官培养基。
7. 根据权利要求6所述的方法,其特征在于,所述中间层中对所述基质胶进行稀释的稀释剂为所述类器官培养基。
8. 根据权利要求6所述的方法,其特征在于,所述包被层包括50-100% (V/V) 的基质胶,所述包被层用于防止所述类器官与培养所述类器官的容器的底部接触。
9. 根据权利要求6所述的方法,其特征在于,对所述包被层中的基质胶进行稀释的稀释剂为所述类器官培养基。
10. 权利要求1-9中任一项所述的检测类器官对药物敏感性的方法在筛选药物中的用途,其特征在于,利用所述检测类器官对药物敏感性的方法,以便筛选出对所述类器官达到预定敏感性标准的药物和/或筛选出达到预定敏感性标准的药物的最适用量;
所述药物选自抗体药物、抗体偶联药物和双抗体药物中的至少之一;
所述药物分子量为100-1000KDa。
11. 根据权利要求10所述的用途,其特征在于,所述药物分子量为100-500KDa。
12. 一种筛选药物的方法,其特征在于,所述方法包括利用权利要求1-9中任一项所述的检测类器官对药物敏感性的方法,以便筛选出对所述类器官达到预定敏感性标准的药物,
所述药物选自抗体药物、抗体偶联药物和双抗体药物中的至少之一;
所述药物分子量为100-1000KDa。
13. 根据权利要求11所述的筛选药物的方法,其特征在于,所述药物分子量为100-500KDa。
14. 一种筛选药物最适用量的方法,其特征在于,利用权利要求12或13所述的筛选药物的方法获得对所述类器官达到预定敏感性标准的药物,将所述类器官与不同浓度梯度的所述药物接触,以便筛选出所述药物最适用量。

三明治夹层培养体系用于检测类器官对大分子药物敏感性的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生物医药技术领域,具体地,本发明涉及三明治夹层培养体系用于检测类器官对大分子药物敏感性的方法。

背景技术

[0002] 在药物开发过程中,使用准确的临床前模型对药物进行药效筛选和评价是十分关键的步骤。目前肿瘤药物的体外筛选模型主要有两种,一种是利用二维培养的肿瘤细胞筛选模型,其优势是成本低,效率高,但是细胞系往往是单克隆来源,不能反映肿瘤的异质性,和药物在体内的真实状态也有较大的差距。第二种是利用人源肿瘤异体移植模型,将患者肿瘤组织移植到免疫缺陷的小鼠中。该模型可以比较真实地反映体内的状态,保留肿瘤的异质性,但由于其周期长、成本高,并且在很多肿瘤中尚未成功建系,因此具有一定的使用局限性。

[0003] 类器官是利用胚胎干细胞,多能干细胞或成体体细胞在一定的培养环境和细胞外基质的支撑作用下形成的具有三维结构的、在功能上接近器官的多细胞结构。相比于细胞系培养,类器官具有三维结构,更接近体内组织的状态,在肿瘤模型中能保留肿瘤的异质性。相比于异体移植瘤模型,类器官效率高,成本低,能更好地实现高通量药物筛选。由于类器官在其培养和特性上的特殊优势,近年来,类器官技术被广泛应用于药物研究和开发领域。在肿瘤精准医疗领域,类器官可用于个体化药物检测,为患者精准用药提供指导。

[0004] 类器官的培养需要两个重要的条件:第一是条件培养基,包含需要的生长因子和抑制剂,第二是维持类器官三维结构的细胞外基质。培养类器官中常用基质胶作为支撑基质。基质胶的主要成分主要包括黏连蛋白、IV型胶原、巢蛋白、硫酸肝素糖蛋白等组成,还包含生长因子和基质金属蛋白酶等。基质胶可以液态的形式保存在低温(2~4℃)环境中,但在培养温度,如37℃中,基质胶则不可逆地转化成固态,这一特点使其能用于类器官的三维培养中。在实验操作中,常在低温的状态下将液态的基质胶和类器官混合,放置于37℃环境中似基质胶成分交联,从而让类器官-基质胶的悬液变成固态,实现类器官的三维生长。在基质胶固化后,加入条件培养基支持类器官的生长。在类器官生长到一定程度后,加入适当浓度的药物,检测类器官对药物的敏感性。

[0005] 目前的抗肿瘤药物主要有传统的化疗药物和靶向治疗药物两类,而市面上的靶向治疗药物主要包括大分子药物和小分子抑制剂。在类器官药物敏感性实验中,由于类器官生长在交联的基质胶中,药物对类器官的抑制效率可能会受到基质胶环境的影响。尤其是抗体药物,通过与受体中的特定的抗原表位特异性的结合发挥抑制作用,类器官上受体的抗原表位在环境中的暴露直接影响药物的抑制效率。因此在药敏筛选过程中,类器官的培养环境对于药敏实验的有效性起着关键作用。

[0006] 目前,尚未开发出特异性针对大分子的类器官药物筛选技术。

发明内容

[0007] 实践中涉及大分子肿瘤药物筛选的体外筛选体系的技术方案中,最快速的是利用二维细胞培养体系的药敏检测系统。在药物筛选的临床前模型中,最经济的是肿瘤细胞培养体系。该方法主要是将肿瘤原代细胞或细胞系培养于细胞培养板中,培养体系主要是细胞系特异性的培养基。细胞系以单细胞的形式贴壁生长或悬浮生长在细胞培养板中。细胞系培养基一般选择添加了血清的条件培养基。在进行药物敏感性实验时,将药物直接添加至培养基中,细胞系会对不同的药物产生不同的反应。一般靶向抗体类药物可以在1周内观察到细胞的生长、增殖、分化等指标的变化。

[0008] 然而,细胞系筛药的一大缺点是,二维的细胞系和体内的真实状态差异较大,细胞系只能反映细胞水平上肿瘤对药物的反应,但在一个体内,细胞处于一个有结构的组织中,细胞的分布具有极性,不同的细胞在组织中的功能也不相同,因此单从细胞层面上观察到的现象不足以反映体内的真实状态。此外,肿瘤细胞系往往是单克隆来源,而肿瘤是由多种细胞构成的,是多克隆组织,具有瘤内异质性。而细胞系经过特定培养条件的筛选和克隆挑选后,组成成分单一。因此相对于具有复杂组成的肿瘤组织,细胞系的重演性并不理想。

[0009] 目前有公开的利用类器官进行药物敏感性测试的平台中,主要采用的是基质胶培养类器官后在培养基中加入药物进行测试。其主要的技术方案是:1) 采集新鲜肿瘤组织,消化后形成单细胞悬液;2) 细胞计数后用基质胶重悬,接种于细胞培养板后放入培养箱等待基质胶凝固;3) 将类器官特殊培养基加入没过基质胶进行培养;4) 类器官长到一定程度后将培养基替换成含有药物的培养基进行培养。

[0010] 三维培养体系中的类器官需要依靠基质胶的支撑维持其三维结构,基质胶是由动物细胞分泌的细胞外基质组成,主要由黏连蛋白组成。基质胶包被在细胞外表面会具有一定的张力,凝固后的基质胶具有一定的粘弹性。并且基质胶的孔径,黏弹性和降解性都会影响基质胶中类器官的生长。因此在类器官药敏筛选中必须考虑药物在基质胶体系中的作用效果。但在目前公布的类器官筛药体系中,并没有针对基质胶的特性对类器官的药敏筛查体系进行优化。

[0011] 目前利用类器官进行药物敏感性测试的方法,通常采用100%的基质胶,然而,发明人发现100%基质胶会限制大分子药物,特别是大分子抗体药物(分子量>100KDa,包括抗体药物、抗体偶联药物和双抗体药物)与类器官上受体的抗原表位接触,从而影响药物的敏感性。为解决此问题,发明人创造性的发现一种利用三明治夹层培养体系检测类器官对大分子药物敏感性的方法,解决了大分子药物在现阶段的类器官培养体系中的药物敏感性不高的问题。

[0012] 为此,本发明一方面提供了一种检测类器官对药物敏感性的方法。根据本发明的实施例,所述方法包括:

[0013] 在三明治夹层培养体系中,将类器官与待测药物接触,以便检测所述类器官对所述待测药物的敏感性,

[0014] 其中,所述三明治夹层培养体系自上而下包括条件培养基层、中间层以及包被层,

[0015] 所述类器官在所述中间层中培养,所述中间层含有10-30% (V/V) 的基质胶。

[0016] 在本发明中,首次考虑了基质胶的特性对类器官药物筛选体系的影响。由于许多药物是通过和细胞表面受体的特异性结合抑制其功能。因此,类器官和基质胶之间的物理

和化学作用力将有可能影响到其表面特异性受体与药物之间的结合作用,特别是大分子药物往往作用于细胞表面受体的特定抗原表位,抗原表位的暴露直接影响药物的作用,此外也需要考虑不同浓度的基质胶下大分子药物的渗透率,以及类器官的表面受体在不同浓度基质胶中的状态。

[0017] 现有的利用类器官进行药物敏感性测试的方法,通常采用100%的基质胶,然而,发明人发现100%基质胶会限制大分子药物,特别是大分子抗体药物(分子量>100KDa,包括抗体药物、抗体偶联药物和双抗体药物)与类器官上受体的抗原表位接触,从而影响药物的敏感性。发明人创造性地发现,将类器官置于10-30% (V/V) 的基质胶中与条件培养基(类器官培养基)接触,不仅提高了大分子药物的渗透率,同时改善了类器官上受体的抗原表位的暴露,进而提高类器官对药物的敏感性。本发明中培养类器官的基质胶浓度是通过大量实验探索获得的,并且需要考虑维持类器官三维结构、类器官上受体的抗原表位的暴露、大分子药物的渗透率等诸多因素,若固定类器官的基质胶浓度过低,则无法维持类器官三维结构,若基质胶浓度超过30% (V/V),则不利于大分子抗体药物与类器官上受体的抗原表位接触,影响药物的敏感性。并且发明人发现,特别是将类器官置于10% (V/V) 的基质胶中与条件培养基(含有待测大分子药物)接触,进一步提高了大分子药物的渗透率,且进一步改善了类器官上受体的抗原表位的暴露,进而进一步提高类器官对药物的敏感性。

[0018] 根据本发明实施例的检测类器官对药物敏感性的方法,还包括以下附加技术特征的至少之一:

[0019] 根据本发明的实施例,所述待测药物选自抗体药物、抗体偶联药物和双抗体药物中的至少之一。

[0020] 根据本发明的实施例,所述待测药物分子量为100-1000KDa。

[0021] 根据本发明的实施例,所述待测药物分子量为100-500KDa。

[0022] 根据本发明的实施例,所述类器官选自肿瘤组织来源类器官、正常组织来源类器官或干细胞来源类器官。

[0023] 根据本发明的实施例,所述类器官为肿瘤组织来源类器官。

[0024] 根据本发明的实施例,所述类器官源自商用胚胎干细胞、多能干细胞或成体体细胞。

[0025] 根据本发明的实施例,所述条件培养基层中含有类器官培养基。

[0026] 根据本发明的实施例,所述中间层中对所述基质胶进行稀释的稀释剂为所述类器官培养基。

[0027] 根据本发明的实施例,所述包被层包括50-100% (V/V) 的基质胶,所述包被层用于防止所述类器官与培养所述类器官的容器的底部接触。

[0028] 根据本发明的实施例,对所述包被层中的基质胶进行稀释的稀释剂为所述类器官培养基。

[0029] 本发明中的类器官培养基不做具体限定,可根据具体需要培养类器官类型进行合理的选择。

[0030] 本发明另一方面提供所述的检测类器官对药物敏感性的方法在筛选药物中的用途,其特征在于,利用所述检测类器官对药物敏感性的方法,以便筛选出对所述类器官达到预定敏感性标准的药物和/或筛选出达到预定敏感性标准的药物的最适用量。

[0031] 根据本发明的实施例,所述待测药物选自抗体药物、抗体偶联药物和双抗体药物中的至少之一。

[0032] 根据本发明的实施例,所述待测药物分子量为100-1000KDa。

[0033] 根据本发明的实施例,所述待测药物分子量为100-500KDa。

[0034] 本发明另一方面提供一种筛选药物的方法。根据本发明的实施例,所述方法包括利用所述的检测类器官对药物敏感性的方法,以便筛选出对所述类器官达到预定敏感性标准的药物。

[0035] 本发明提供的检测类器官对药物敏感性的方法有效地优化了肿瘤筛药体系中的两个问题,一是相比于对大分子药物敏感性高的细胞系培养体系,三明治夹层的类器官体系能更真实地模拟药物在体内的状态。二是相比于其它类器官筛药体系,三明治夹层的类器官体系对基质胶支撑体系进行了优化,提高了观察大分子药物对类器官作用的灵敏度。该体系可以为在类器官中进行大分子抗体药物筛选提供良好的解决方案。

[0036] 根据本发明的实施例,所述待测药物选自抗体药物、抗体偶联药物和双抗体药物中的至少之一。

[0037] 根据本发明的实施例,所述待测药物分子量为100-1000KDa。

[0038] 根据本发明的实施例,所述待测药物分子量为100-500KDa。

[0039] 本发明另一方面提供一种筛选药物最适用量的方法。根据本发明的实施例,利用所述的筛选药物的方法获得对所述类器官达到预定敏感性标准的药物,将所述类器官与不同浓度梯度的所述药物接触,以便筛选出所述药物最适用量。

[0040] 本发明的附加方面和优点将在下面的描述中部分给出,部分将从下面的描述中变得明显,或通过本发明的实践了解到。

附图说明

[0041] 本发明的上述和/或附加的方面和优点从结合下面附图对实施例的描述中将变得明显和容易理解,其中:

[0042] 图1显示了三明治夹层培养体系的结构,其中,A表示条件培养基层;B表示培养类器官的中间层(培养层)(10%基质胶);C表示包被培养板孔的50%基质胶层;D表示培养板孔;

[0043] 图2显示了不同浓度基质胶中培养肠癌类器官6天后的生长情况,其中,左图为100%基质胶中的肠癌类器官,右图为10%基质胶中的肠癌类器官;

[0044] 图3显示了不同浓度基质胶中加入西妥昔单抗(200mg/L)6天后的类器官生长情况,其中A图显示了100%基质胶中加入西妥昔单抗6天后的类器官;图B显示了三明治体系的中间层10%基质胶中加入西妥昔单抗6天后的类器官;图C显示了三明治体系培养层中10%、20%、30%、50%、100%基质胶中加入西妥昔单抗后类器官的生长情况(向基质胶中加入西妥昔单抗是指向条件培养基中加入西妥昔单抗);

[0045] 图4显示不同浓度西妥昔单抗处理对肠癌类器官的ATP活性的影响;

[0046] 图5为显微镜下观察大分子药物(西妥昔单抗)在三明治夹层体系中培养7d后类器官的变化,对照为药物处理前类器官。

具体实施方式

[0047] 根据本发明的一些具体的实施例,本发明提供一种检测类器官对药物敏感性的方法,所述方法包括:

[0048] 在三明治夹层培养体系中,将类器官与待测药物接触,以便检测所述类器官对所述待测药物的敏感性,

[0049] 其中,所述三明治夹层培养体系自上而下包括条件培养基层、中间层以及包被层,

[0050] 所述类器官在所述中间层中培养,所述中间层含有10-30% (V/V) 的基质胶。

[0051] 根据本发明的一些具体的实施例,所述待测药物选自抗体药物、抗体偶联药物和双抗体药物中的至少之一,所述待测药物分子量为100-500KDa。

[0052] 根据本发明的一些具体的实施例,所述类器官选自肿瘤组织来源类器官、正常组织来源类器官或干细胞来源类器官。

[0053] 根据本发明的一些具体的实施例,所述待测药物为西妥昔单抗,所述类器官为肠癌类器官。

[0054] 根据本发明的一些具体的实施例,所述类器官源自商用胚胎干细胞、多能干细胞或成体体细胞。

[0055] 根据本发明的一些具体的实施例,所述条件培养基层中含有类器官培养基。

[0056] 根据本发明的一些具体的实施例,所述中间层中对所述基质胶进行稀释的稀释剂为所述类器官培养基。

[0057] 根据本发明的一些具体的实施例,所述包被层包括50-100% (V/V) 的基质胶,例如可以是50% (V/V) 的基质胶,对所述包被层中的基质胶进行稀释的稀释剂为所述类器官培养基。

[0058] 在本发明中,对条件培养基层、中间层以及包被层的相对体积比不做具体限定,包被层只需完全包被培养所述类器官的容器的底部即可;中间层的体积可根据接种的类器官大小以及接种量进行相应的调整;条件培养基层用量不做具体限定,但至少完全覆盖中间层。

[0059] 下面详细描述本发明的实施例。下面描述的实施例是示例性的,仅用于解释本发明,而不能理解为对本发明的限制。

[0060] 实施例中未注明具体技术或条件的,按照本领域内的文献所描述的技术或条件或者按照产品说明书进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者,均为可以通过市购获得的常规产品。

[0061] 以下实施例以肠癌类器官为模型,尝试了不同浓度的基质胶下肠癌类器官对大分子药物(西妥昔单抗)的敏感性。

[0062] 实施例1肠癌类器官培养

[0063] 1、制备细胞团

[0064] 采集新鲜的肠癌组织,预冷PBS(加入100X青霉素/链霉素(penicillin/streptomycin))洗5min X 5次。在无菌操作台上将无菌培养皿放置于冰上,倒入预冷的已灭菌PBS,将癌组织置于其中,无菌刀片切成碎片后移入37℃预热消化液(DMEM培养基+1% FBS+胶原酶IV)中,37℃水浴摇床消化40min。消化完毕后用移液枪吹打20次左右,取20μL镜下观察;冰上放置数分钟待肿瘤碎片沉淀后取上清后加入预冷PBS继续吹打,依次取3-4次

上清,直至肿瘤碎片消失为止。随后200g离心5min沉淀所有细胞团;接着用预冷PBS 69g洗五次,每次5min;然后200g离心沉淀所有细胞团(离心前取20 μ L镜下观察计算细胞团数量)。

[0065] 2、培养基培养细胞

[0066] 提取后用预冷1mL枪头加入适量基质胶(康宁,#356231),使每50 μ L基质胶中细胞团数量为200个左右,随后用200 μ L预冷枪头悬浮混匀,接种于预热培养板中,每孔50 μ L。接种后培养板置于37℃恒温培养箱中孵育5min-8min拿出,每孔加入500 μ L类器官培养基(丹望医疗,Cat#K20001)后镜下观察接种情况,随后置于培养箱中培养。每日观察类器官生长情况并拍照;每3日更换培养基。

[0067] 3、制备类器官

[0068] 传代时,将培养孔内培养基吸去,加入500mL预冷PBS,将培养板置于冰盒上放置片刻,预冷枪头将基质胶吹散,移入15mL无菌离心管中吹打,将基质胶完全吹散混匀,69g在4℃下离心5min,将上清及沉淀在底部的基质胶吸去;再加入预冷PBS重复洗三次可除去基质胶。加入5mL左右预冷PBS重新悬浮管底类器官,吹打50-100次将类器官吹打成细胞团(镜下观察细胞团已被吹打成单细胞或细胞团即可)后69g在4℃下离心5min沉淀。按类器官培养流程继续培养(关于类器官的培养流程为本领域公知技术,在此不再赘述);接种时按每孔传代4孔的比例接种,通过上述培养流程获得肠癌类器官。

[0069] 实施例2三明治夹层培养体系

[0070] 分别配制50%基质胶和10%基质胶(稀释剂为条件培养基)。先将50%的基质胶加入新的平底细胞培养板中,以防止类器官与培养板底部接触。待基质胶凝固后,将实施例1中的肠癌类器官重悬于10%基质胶中,接种到包被好50%基质胶的培养板中。再次放入培养箱中待基质胶凝固后,加入含有大分子药物(西妥昔单抗)的类器官培养基。三明治夹层培养体系的具体结构如附图1所示,图中A表示条件培养基层(含有类器官培养基),B表示培养类器官的中间层(培养层)(10%基质胶),C表示包被培养板孔的50%基质胶层,D表示培养板孔。

[0071] 实施例3三明治夹层培养体系促进类器官的生长

[0072] 实验组1:分别配制50%基质胶和10%基质胶,先将50%的基质胶加入新的平底细胞培养板中,以防止类器官与培养板底部接触。待基质胶凝固后,将实施例1中的肠癌类器官重悬于10%基质胶中,接种到包被好50%基质胶的培养板中,之后加入条件培养基,培养6天。

[0073] 对照组1:取部分实施例1获得的肠癌类器官,将其接种到100%基质胶中,之后加入条件培养基,培养6天。

[0074] 上述实验组1和对照组1中培养的肠癌类器官来源于实施例1中的同一培养批次,两组中肠癌类器官在基质胶中的接种量相同,且除了对照组1用100%基质胶替换实验组1中的50%基质胶+10%基质胶之外,其他所有培养条件、培养基组成、培养过程完全相同。

[0075] 以下表1显示了不同体系培养类器官生长情况。

[0076] 表1

组别	类器官增长百分比
实验组1	398%
对照组1	339%

[0078] 经过6天培养后,观察实验组1和对照组1中获得的类器官形态如图2所示,并结合表1中结果,表明与现有的培养类器官的体系(100%基质胶+条件培养基)相比,肠癌类器官在50%基质胶+10%基质胶+条件培养基的三明治夹层体系中,也能够稳定生长。说明本发明提供的三明治夹层体系能够稳定培养肠癌类器官。

[0079] 实施例4不同浓度基质胶中西妥昔单抗杀伤性对比

[0080] 将实施例1中的肠癌类器官调整至最佳状态,准备48孔板。收集需要药敏处理的类器官,PBS重悬洗涤,按照传代的方式将类器官接种于48孔板,接种量为每孔15 μ L基质胶包含200 $\pm$ 50个类器官,加入300 μ L类器官培养基,每个药敏浓度3个复孔。培养2-3天后开始加入药物进行药敏处理。

[0081] 对实施例2中的三明治夹层培养体系的中间层(培养层)设置不同的基质胶浓度梯度,分别为10%、20%、30%、50%、100%基质胶,分别进行药敏实验,以探索西妥昔单抗(200mg/L)对在不同浓度的基质胶中生长的类器官的影响。

[0082] 上述实验中向基质胶中加入西妥昔单抗实际上是指向条件培养基中加入西妥昔单抗,该药物进而与在基质胶中固定的类器官接触。

[0083] 图3中A图显示了100%基质胶中加入西妥昔单抗6天后的类器官,图B显示了三明治体系的中间层10%基质胶中加入西妥昔单抗6天后的类器官,图C显示了三明治培养层中10%、20%、30%、50%、100%基质胶中加入西妥昔单抗后类器官的生长情况。以下表2显示了10%基质胶和100%基质胶中加入西妥昔单抗(200mg/L)6天后类器官的生长情况,

[0084] 表2

[0085]	基质胶浓度	类器官增长百分比
	10%基质胶	52%
	100%基质胶	331%

[0086] 根据图3以及表2中结果,表明肠癌类器官在三明治夹层培养体系的中间层中10-30%的基质胶中,西妥昔单抗能发挥稳定的杀伤活性,而当中间层中基质胶浓度高于30%,例如50%或者100%,则西妥昔单抗杀伤活性随时间推移而减弱。

[0087] 通过上述三明治夹层培养体系培养类器官,检测西妥昔单抗在肠癌类器官中的药物敏感性。在三明治夹层体系中,可以观察到西妥昔单抗对结直肠癌类器官的敏感性和作用时间,提示可以用三明治夹层培养体系检测类器官对大分子药物敏感性。

[0088] 实施例5三明治夹层培养体系中肠癌类器官对西妥昔单抗的敏感性

[0089] 根据实施例4中方法,在三明治夹层培养体系(中间层10%基质胶)中培养肠癌类器官,将其置于不同药敏体系中培养7天以后,观察类器官的生长状态,采用面积法和ATP法检测培养体系中类器官的大小和活力,从而得出在三明治夹层体系中,类器官对西妥昔单抗的敏感性。图4结果表明,在200mg/L和400mg/L的西妥昔单抗浓度下,肠癌类器官的ATP活性受到了显著的抑制,表明在本发明的培养体系中,肠癌类器官对西妥昔单抗较敏感。图5为显微镜下观察大分子药物(西妥昔单抗(200mg/L))在三明治夹层体系中培养7d后类器官的变化,对照为药物处理前类器官,表明西妥昔单抗能够杀伤肠癌类器官,肠癌类器官对西妥昔单抗处理较敏感。

[0090] 在本说明书的描述中,参考术语“一个实施例”、“一些实施例”、“示例”、“具体示例”、或“一些示例”等的描述意指结合该实施例或示例描述的具体特征、结构、材料或者特

点包含于本发明的至少一个实施例或示例中。在本说明书中,对上述术语的示意性表述不必针对的是相同的实施例或示例。而且,描述的具体特征、结构、材料或者特点可以在任一个或多个实施例或示例中以合适的方式结合。此外,在不相互矛盾的情况下,本领域的技术人员可以将本说明书中描述的不同实施例或示例以及不同实施例或示例的特征进行结合和组合。

[0091] 尽管上面已经示出和描述了本发明的实施例,可以理解的是,上述实施例是示例性的,不能理解为对本发明的限制,本领域的普通技术人员在本发明的范围内可以对上述实施例进行变化、修改、替换和变型。

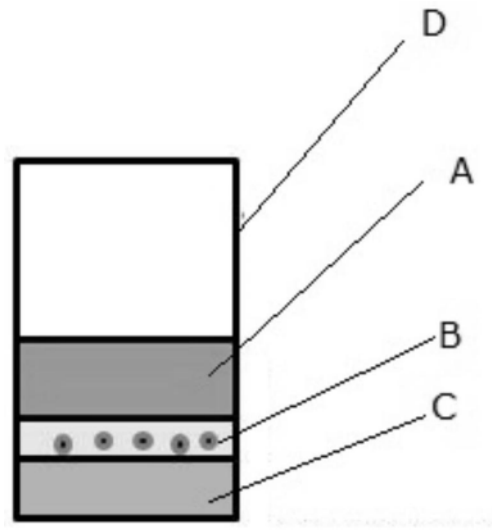


图1

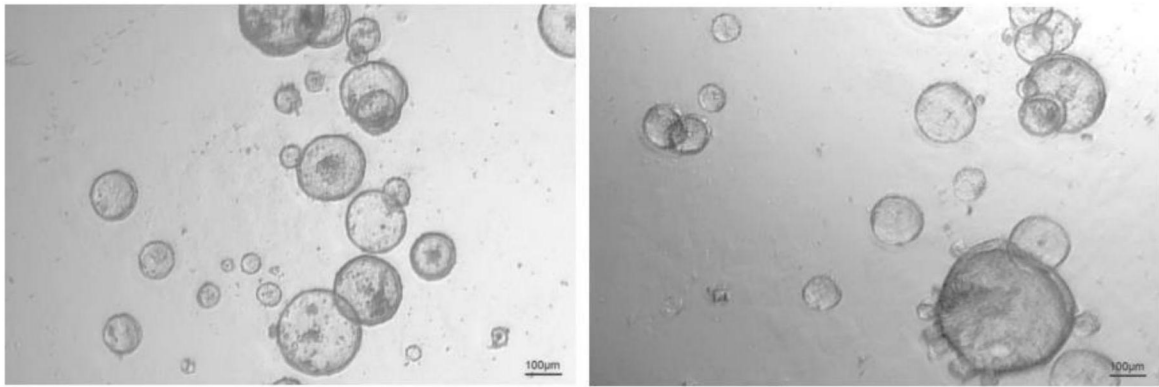


图2

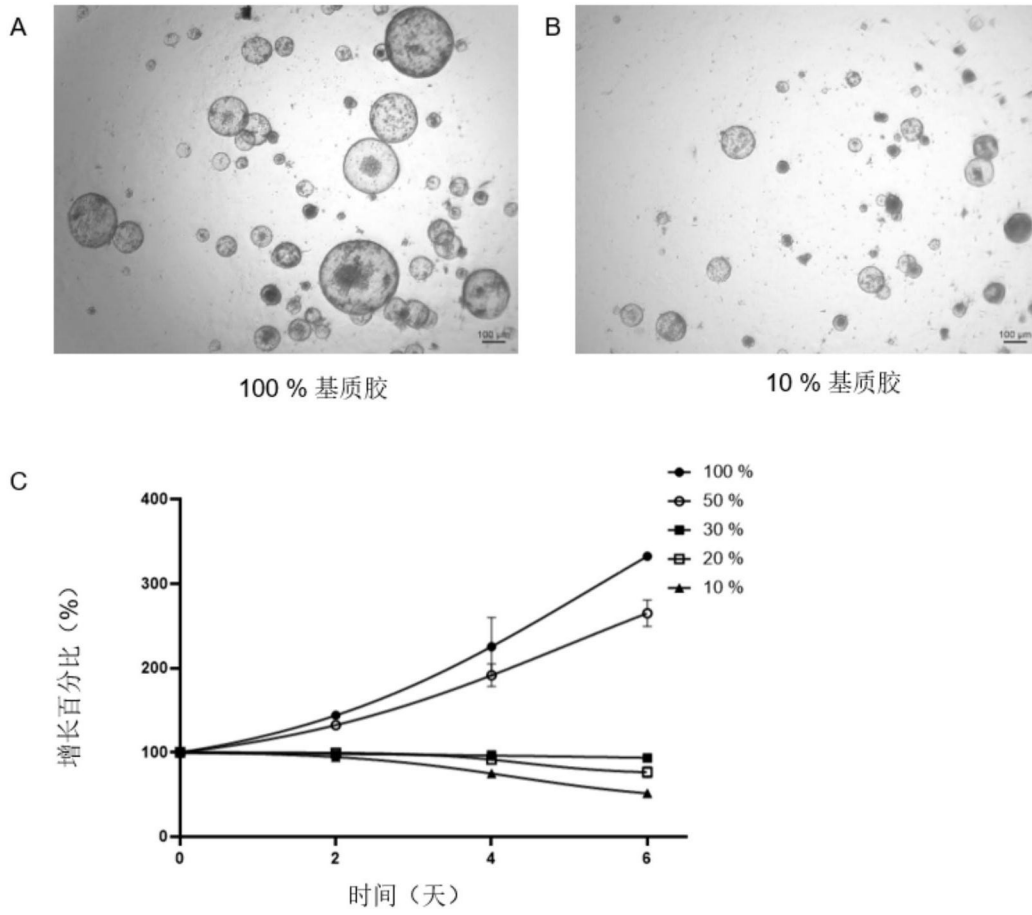


图3

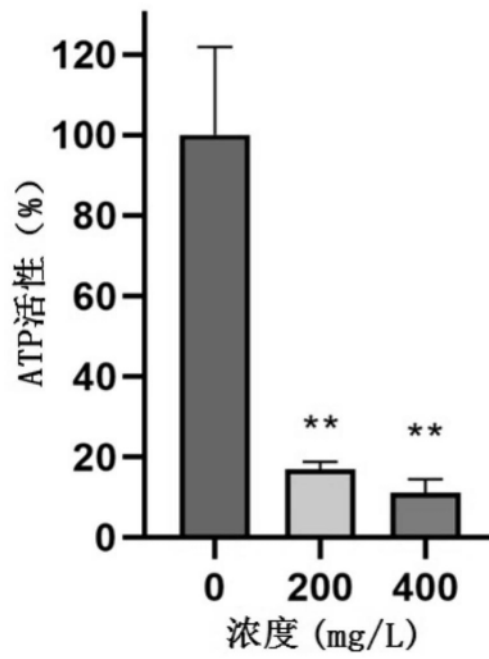
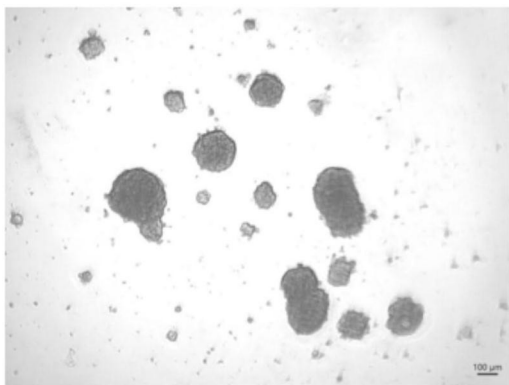
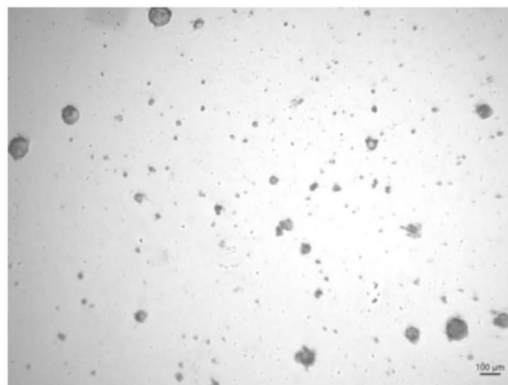


图4



对照



大分子药物处理后

图5