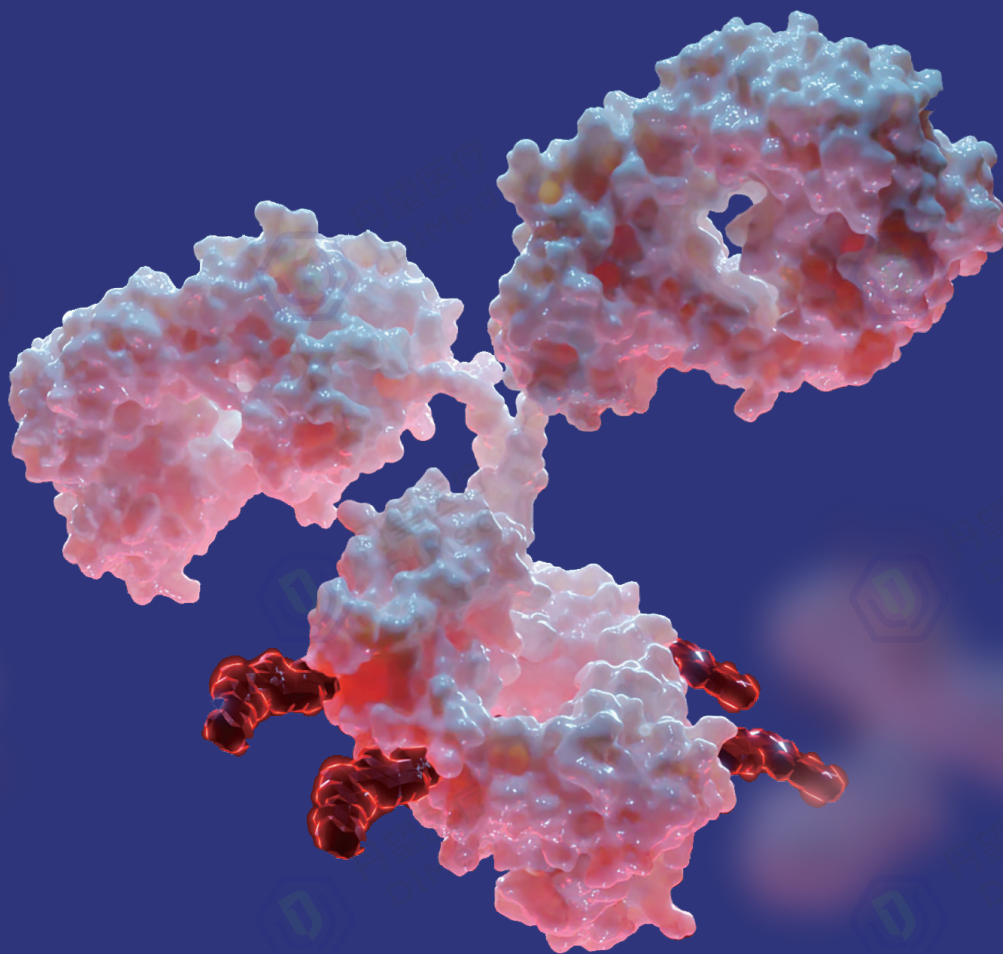




类器官 —加速抗肿瘤药物的研究

ACCELERATING ONCOLOGY
DRUG DISCOVERY WITH ORGANOIDS

类器官在ADC药物研发中的
应用案例



INTRODUCTION

前言

长期以来,药物研发过程低效、缓慢且昂贵。据统计,2021年开发一款新药的平均成本降至近七年最低,仍高达约20亿美元。在肿瘤治疗药物研发方面,经过临床前研究开发的药物中,只有5%能够在临床试验中展现出效果。以上痛点,主要由于当前临床前模型并不能准确预测人体反应,在异质性和免疫微环境等方面表现欠佳,使得临床前和临床的结果无明确相关性。

传统的标志物筛选和评价主要依赖于2D培养的细胞模型和患者来源的异种移植(PDX)模型。但2D培养细胞在进行药效评估方面存在一定的局限性,动物模型存在实验周期长、成本高、不能高通量筛选等问题。患者来源的肿瘤类器官(PATIENT-DERIVED ORGANIDS, PDO)作为研究肿瘤的新型工具,在保留肿瘤原有的生物学特征之外,还能够稳定的传代,因此,类器官可能会改变复杂而昂贵的临床药物研发过程。

患者来源类器官(PATIENT DERIVED ORGANOID, PDO)是一种新型的3D体外系统,可以直接从患者活检或切除的肿瘤中产生,因此它保留了患者体内肿瘤的形态学、基因组和病理生理学特征,并且具有相似的药理学特征和治疗反应,同时可进行大规模高通量筛选,可大幅度缩短临床前试验与临床试验的周期,提高准确度,降低新药开发成本与风险,提供新药开发临床前生物数据支持,为新药研发提供最优质的平台。



在进行生命科学基础研究及药物研发时，常常需要借助与人类相似的实验动物以及2D细胞系等实验模型来进行疾病机理和诊断治疗方法的研究。



LIMITATIONS OF ANIMAL MODELS

动物模型的局限性

动物模型作为人体的替代者进行药物试验已有漫长的历史，并形成了完整的药物临床前评价体系，动物试验数据也成为FDA批准IND必不可少的申报材料之一。最常见的实验动物，主要为啮齿类（包括大鼠、小鼠、地鼠、豚鼠等）、非人灵长类（包括食蟹猴及猕猴等）、犬类（比格犬等）、猪类、兔类等。其中，啮齿类实验动物应用最为广泛。但动物模型存在许多天然缺陷。

01 建模难度大，实验周期长：

动物实验通常需要3-6个月的建模周期，且动物模型需要专业化的场地和技术人员进行饲养和维护，增加了实验成本和时间周期。

02 与人体存在种属差异：

传统动物模型无法避免与人类的种属差异，因此导致对实际人体反应预测能力较差，据统计，超过90%通过动物试验的药物在人体临床试验中失败。同时动物实验也存在伦理问题、动物保护、成像观察的局限性不足等问题。

03 价格高昂：

非人灵长类动物的需求量一直很大，价格高昂，且常常面对“一猴难求”的局面。

THE CHALLENGES OF
DRUG DEVELOPMENT
药物开发面临的挑战

2D细胞模型的局限性

LIMITATIONS OF 2D CELL MODELS

2D细胞培养模型在发育生物学、组织形态学、疾病机制、药物研发、大规模蛋白生产、组织工程和再生医学领域的发展发挥了重要作用。2D培养系统常常无法构建有效的肿瘤生物学模型，对临床前的药物筛选试验的准确细胞已经造成了影响。

01 永生化细胞系临床相关性有限：

永生细胞系容易获得，并且易于操作及增殖存储，在实验室中得到广泛应用。然而，这些细胞系的生理结构和遗传特征与原代细胞差异较大，往往导致对疾病和药物效果的预测性与人体实际情况可能会存在巨大差异。

02 缺乏微环境：

传统的2D细胞系往往为单层细胞培养，缺乏各种细胞外基质。同时也缺少血管、免疫系统等，难以真实模拟人体复杂的生理结构和功能。

03 缺乏细胞间的交流：

2D细胞系缺乏与邻近细胞的相互作用，难以模拟细胞-细胞相互作用、细胞-基质相互作用。而在人体中是维持正常功能所不可或缺的。导致其对药物的反应方式不能反映体内的功能。

指标	动物实验			2D细胞模型	3D类器官
					
建模难易程度	难度大	难度最大	难度大	最简单	适中
建模周期	很长	很长	很长	短	适中
构建成本	成本很高	成本非常高	成本很高	成本最低	成本较低
通量	很低	很低	很低	最高	高
临床相关性	较高	很高	较高	较低	高
实时精准操作	难	难	难	最容易	容易
体外观测难度	难	难	难	小	较小
基因编辑难度	较难	较难	较难	简单	简单
标准化难度	较难	较难	较难	简单	简单

类器官：突破传统药物测试新希望

ORGANOIDS: NEW HOPE FOR BREAKING THROUGH TRADITIONAL DRUG TESTING

类器官 (ORGANOIDS) 指利用成体干细胞或多能干细胞进行体外三维 (3D) 培养而形成的具有一定空间结构的组织类似物。近年来, 肿瘤类器官技术逐渐发展和成熟, 肿瘤类器官模型具有经长期传代还保留亲本肿瘤的特征和异质性、培养成功率高、周期短、成本低和可高通量筛选药物等优点, 为研究患者内部和患者之间的药物反应和异质性提供了一个令人兴奋的机会。大量研究证明类器官可为临床治疗方案的选择提供重要依据, 实现真正的个性化精准治疗。另一方面, 类器官作为一种“替身”也为探索药物敏感、耐药和联合用药机制, 以及药物治疗过程中耐药进化研究提供有效模型。



类器官的应用

APPLICATION OF ORGANOIDS



体外疾病建模



药物新靶点发现



肿瘤精准治疗临床验证



高通量药物筛选



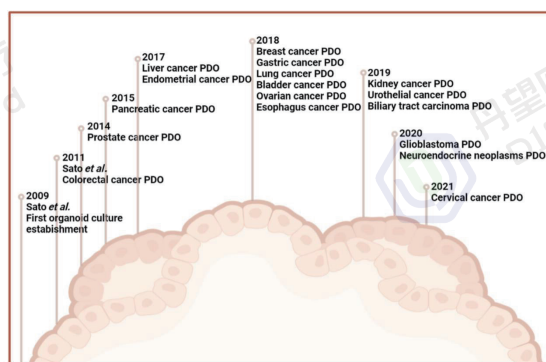
耐药机制研究



干细胞再生机制研究

自2009年HANS CLEVERS团队成功将LGR5+肠道干细胞在体外培养成具有三维结构的小肠类器官模型之后, 类器官的应用研究进入新时代, 此后, 世界各地的研究人员相继建立了多种组织来源的肿瘤类器官和正常类器官。

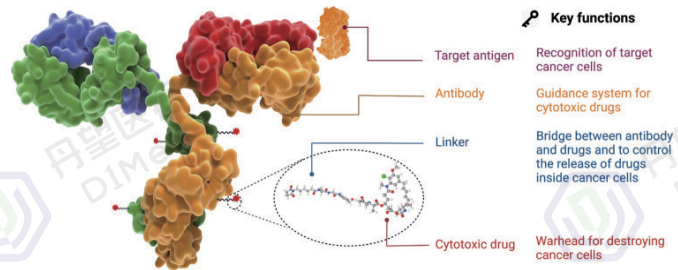
2022年9月29日, 美国参议院通过了美国食品药品监督管理局现代化法案 (FDA MODERNIZATION ACT 2.0), 该法案强调了不再需要在动物身上测试新的或正在开发的药物的强制要求, 旨在未来几年里大幅减少动物试验的使用。动物试验的准确度也在药物研究的历史里饱受诟病, 而来自各种研究的大规模基因组和功能分析表明, 肿瘤来源的类器官可以真实地概括移植后体外和体内原发性肿瘤的表型和基因组特征 [1,2,3,4,5]。由于类器官具备替代动物的种种优势, 这也为药物临床前药物开发提供了巨大机遇。重要的是, 类器官连续传代后保留了肿瘤异质性和克隆动力学, 表明这些“微型肿瘤”在遗传上是稳定的, 具有巨大的临床适用性[6]。



各种类器官建立的关键里程碑研究和突破 (10.1111/JGH.15930)

案例：丹望医疗类器官助力新型ADC研发

抗体-药物偶联物（ANTIBODY-DRUGCONJUGATE,ADC）是由抗体、细胞毒性有效载荷和化学接头组成（图1），它结合了高度特异性靶向能力和高效杀伤效果的优点，实现了对癌细胞的准确高效消除。2000年第一个被FDA批准的ADC药物MYLOTARG用于治疗复发的CD33阳性急性髓性白血病，虽然其后MYLOTARG因毒性问题在美国退市一段时间，但它仍然被认为是ADC药物开发的里程碑，为基于ADC的癌症治疗开创了先例。目前，多家生物制药公司不断拓展ADC研发管线，而功能评价、成药性和开发成本则是ADC药研制胜的关键。因此，选用更快捷准确的功能评价模型，加速ADC药物研发的总体进程，成为了ADC赛道的助跑器。



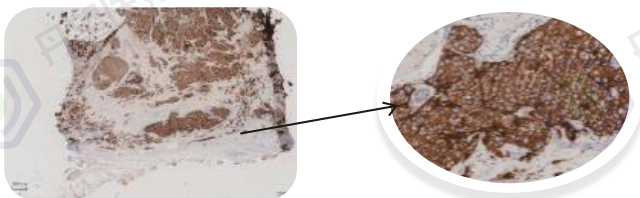
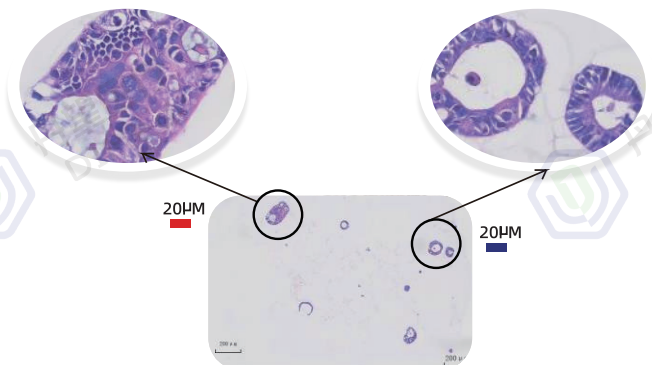
ADC的结构和特征

目前常用的ADC如 T-DXd和DS-8201A等，虽然具有较高的安全性，但由于肿瘤的异质性和多重耐药作用，无法完全高效地作用于目标肿瘤。EXATECAN具有更强的杀伤能力，并且受多重耐药影响小，但是由于自身的疏水性，过去无法将其组装成ADC。

丹望医疗类器官药物平台参与了一类新型的ADC药物“T moiety- Exatecan ADC”的研发过程并为其药效评估做出重要贡献，这款药物从结构上能够隐藏Exatecan的疏水性，从而发挥更强的肿瘤杀伤作用。该研究发表在今年4月的Cancer Discovery杂志上[7]。

基于全球最大消化道肿瘤类器官库和全面的类器官鉴定标准化流程，为ADC研究提供充足的样本，保证ADC药效分析数据真实可靠

丹望医疗类器官库拥有相当规模的消化道肿瘤类器官样本，是全球最大的消化道肿瘤类器官库。并且，丹望践行的是对所有入库的类器官进行包括WES测序，病理检测等在内的标准化鉴定体系。在本研究中，为了验证针对HER2靶点的TRASTUZUMAB-T1000-EXATECAN（MTX-1000）的药效，首先对HER2阳性患者的肠癌组织进行了IHC染色，确认HER2高表达（图4A）；另外，丹望对患者来源的肠癌类器官分别进行了HE染色（图4B）鉴定，观察到类器官与来源组织在病理形态学中高度一致，证实了类器官对来源组织的代表性。

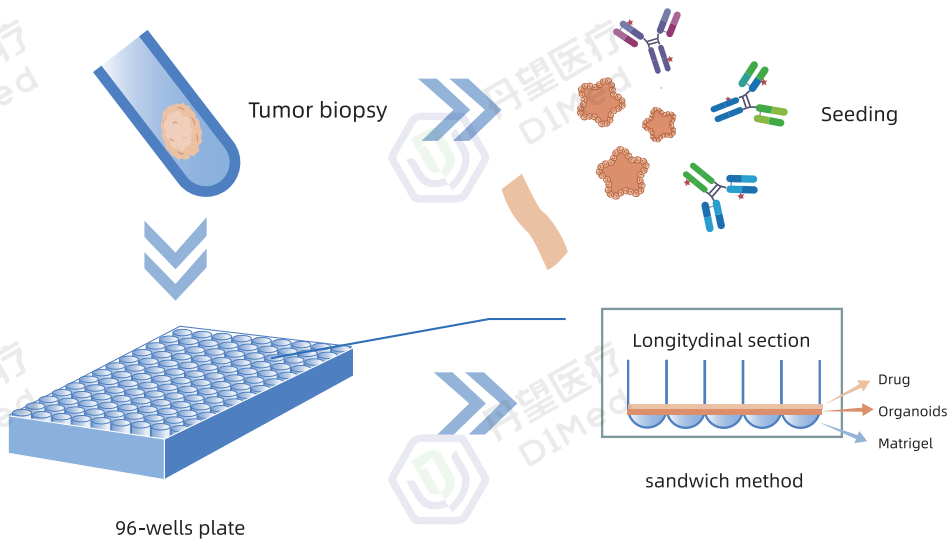


Staining intensity	0	1+	2+	3+
Positive coll (%)	2	0	0	98

来源于患者组织样本的肠癌类器官培养与鉴定

类器官自动化工作站，实现ADC快速高通量筛选

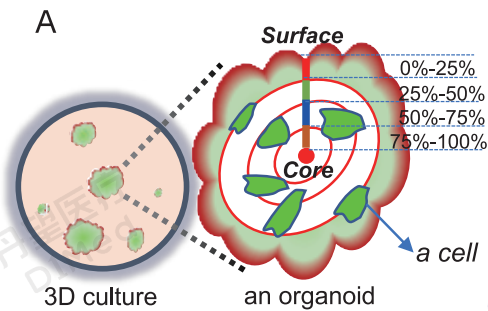
丹望医疗类器官自动化工作站可实现类器官培养及图像采集的全流程自动化操作。借助类器官工作站，实现了对本研究所涉及的候选ADC在96孔板中的全自动铺板、加药及筛选（图5）。在提高效率、节约成本的同时，明显提升实验的精准度。



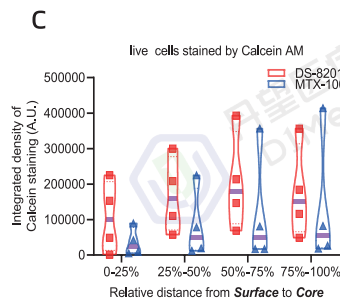
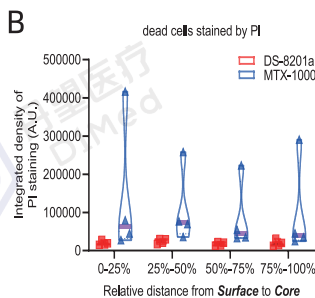
ADCs自动化高通量筛选流程示意图

Z-stack高通量成像技术进行药敏分析，评估ADC对结肠癌PDO的杀伤能力

丹望医疗通过自研Z-STACK成像技术结合活细胞荧光染色，并对数十万张类器官影像数据进行AI建模，实现了对类器官的高通量实时动态观察。借助Z-STACK技术，丹望分别用MTX-1000和DS-8201A处理构建的结肠癌PDO模型，并在第0天和第6天进行染色成像。结果显示，相较于DS-8201A，MTX能够明显抑制结肠癌类器官生长*。除此之外，Z-STACK技术成功呈现并比较分析了两种ADC对肿瘤类器官的穿透能力——对死细胞染色（PI染色）信号分析，显示MTX-100在PDO核心附近仍有较强的细胞杀伤能力，而DS-8201A则一直维持在较低水平（图6）。

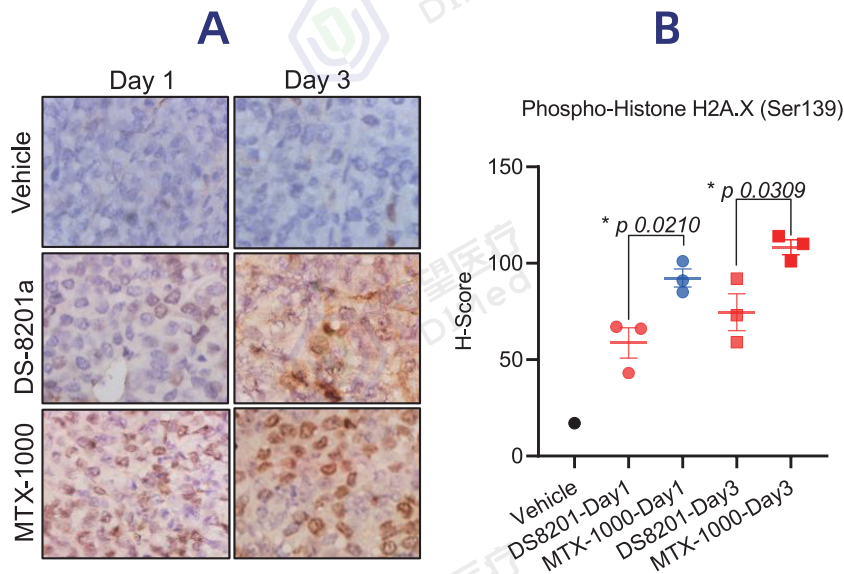


MTX-1000具有更强更深的肿瘤穿透能力



基于肠癌PDO模型的药效分析同动物实验高度一致

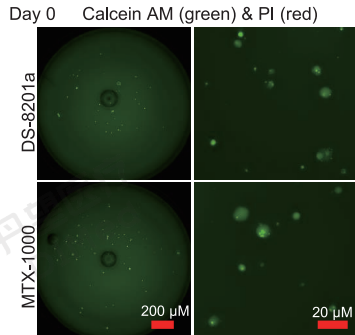
类器官作为自组装三维组织类似物，能在结构和功能上模拟真实器官，并且具有稳定的表型和遗传学特性，并能够长期稳定传代培养。基于这些特性，结合MTX-1000在肠癌PDO模型中表现出的优越的穿透能力，提示MTX-1000在动物模型中可能有同样的表现。研究者通过对XENOGRAFT模型的肿瘤组织进行IHC染色发现， γ H2AX在MTX-1000组表达较其余两组明显增强，提示MTX-1000有更强的肿瘤穿透性（图7），这一结果与丹望在肠癌PDO模型中得到的结论相匹配（图6）。同样的，MTX-1000在体内实验中也表现出了明显优于其他药物的肿瘤抑制效果（图8D-E），这也同肠癌PDO模型中观察到的现象不谋而合*（图8 A-C）。但与动物实验相比，基于PDO模型的实验周期却很大程度上被缩短了



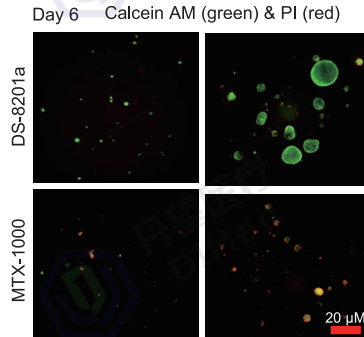
Group	Vehicle	MTX-1000 Day 1	MTX-1000 Day 3	Ds-8201a Day 1	Ds-8201 Day 3
H-Score	14.0	93.3	108.3	67.0	94.0
	13.0	98.3	85.0	81.3	61.7
	13.0	60.0	128.3	47.7	71.7
	13.0	88.3	93.3	64.3	90.0
	17.0	103.3	70.3	52.7	56.7
	33.0	53.7	100.0	38.3	73.3
Average	17.2	82.8	97.6	58.6	74.6

MTX-1000在Xenograft模型中同样具有更强的穿透能力

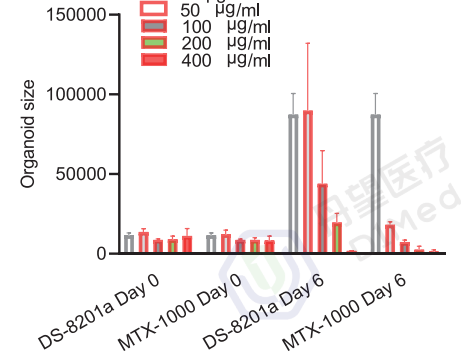
A



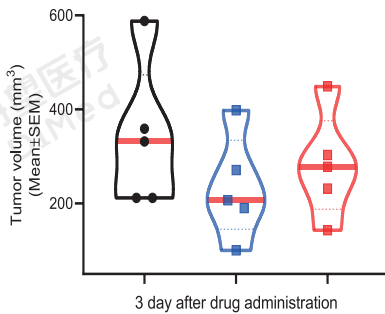
B



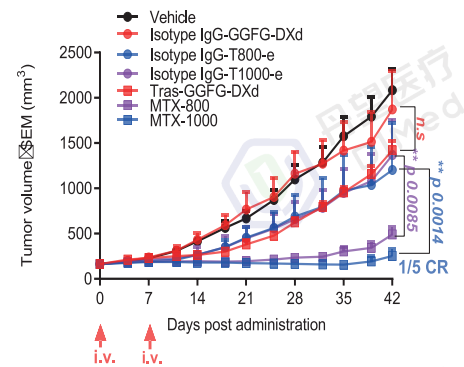
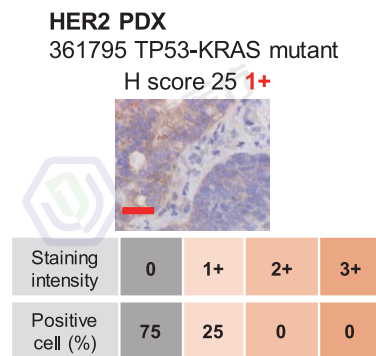
C



D



E



MTX-1000在肠癌PDO模型中的药效和动物实验高度一致。

小结:

该案例研究为丹望医疗类器官在ADC药物开发的应用提供了有力的证据，凭借其更好地预测患者药物反应的能力，提供一种崭新的药物开发方法。

ADC是一个包括了生物和化学原件的整合体，需要全体系的设计和验证，包括连接子和载荷化学，ADC整体的分子作用机制，生物学和药理等。本研究的方法学可以为ADC领域提供一个标准和参考，持续提升ADC研究的高度和深度。

亮点:

本案例研究中使用的HER2阳性的肠癌类器官，与来源组织在病理形态学中高度一致，证实了类器官对来源组织的代表性。并表现出药物优越的穿透能力，其药效分析同动物实验高度一致，实验周期却很大程度上被缩短。为新药开发提供了一种革命性的方法。

丹望医疗 类器官一体化链式服务平台

丹望医疗利用自身技术优势和庞大的类器官疾病模型库，建立了国际领先的基于类器官技术的药物研发服务平台（NGDD™-platform），实现从药物研发到临床测试，从医院到科研，从试剂到模型的全方位一体化链式服务：

PHARMACEUTICAL R&D SERVICES

3.1 药企研发服务

丹望医疗利用自身技术优势和庞大的类器官疾病模型库，建立了国际领先的基于类器官技术的药物研发服务平台（NGDD™-platform），实现从药物研发到临床测试，从医院到科研，从试剂到模型的全方位一体化链式服务：

ORGANOIDS SCIENTIFIC RESEARCH SERVICES

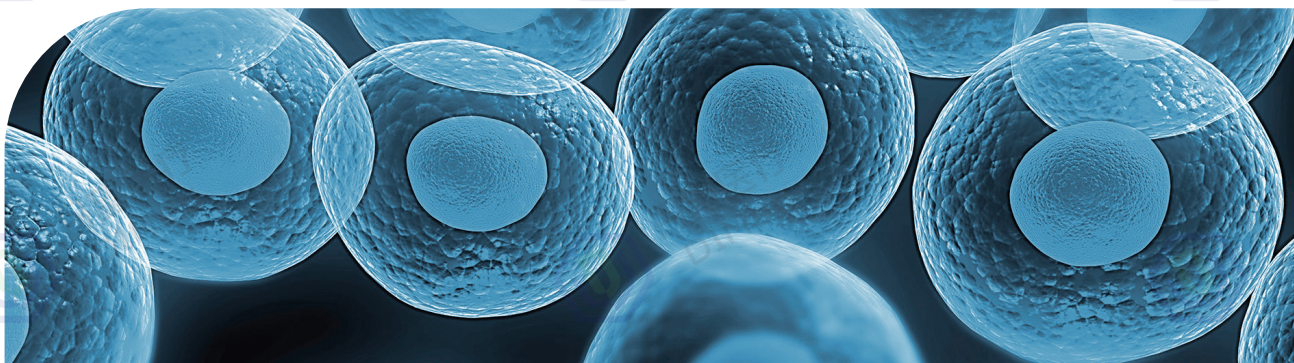
3.2 类器官科研服务

丹望医疗目前已同多家院校机构达成合作，协助完成了多个科研项目。丹望可以提供包括人源类器官模型构建、人源类器官化合物筛选、肠毒性评价、血管化类器官芯片模型等多种服务。

ORGANOIDS CULTURE KIT

3.3 类器官培养试剂盒

基于不同的组织和癌种，丹望医疗目前拥有NGC Organoid® 肿瘤类器官培养试剂盒、NGC Organoid® 正常类器官培养试剂盒、类器官全流程试剂，集类器官复苏、培养、传代为一体，为类器官培养提供全流程支持。



患者来源类器官为新药研发的每一个阶段保驾护航



REFERENCES

参考文献:

- Boj SF, Hwang CI, Baker LA, Chio II, Engle DD, Corbo V, Jager M, Ponz-Sarvisse M, et al. Organoid models of human and mouse ductal pancreatic cancer. *Cell* 160: 324–338, 2015. doi: 10.1016/j.cell.2014.12.021.
- Gao D, Vela I, Sboner A, Jaquinta PJ, Karthaus WR, Gopalan A, Dowling C, Wanjala JN, et al. Organoid cultures derived from patients with advanced prostate cancer. *Cell* 159: 176–187, 2014. doi: 10.1016/j.cell.2014.08.016.
- Lee JJ, Wedow R, Okbay A, Kong E, Maghzian O, Zacher M, Nguyen-Viet TA, Bowers P, et al. Social Science Genetic Association Consortium . Gene discovery and polygenic prediction from a genome-wide association study of educational attainment in 1.1 million individuals. *Nat Genet* 50: 1112–1121, 2018. doi: 10.1038/s41588-018-0147-3.
- Sachs N, de Ligt J, Kopper O, Gogola E, Bounova G, Weeber F, Balgobind AV, Wind K, Gracanin A, et al. A living biobank of breast cancer organoids captures disease heterogeneity. *Cell* 172: 373–386.e10, 2018. doi: 10.1016/j.cell.2017.11.010
- van de Wetering M, Francies HE, Francis JM, Bounova G, Iorio F, Pronk A, van Houdt W, et al. Prospective derivation of a living organoid biobank of colorectal cancer patients. *Cell* 161: 933–945, 2015. doi: 10.1016/j.cell.2015.03.053.
- Bolck HA, Corró C, Kahraman A, von Teichman A, Toussaint NC, Kuipers J, Chiovaro F, et al. Tracing clonal dynamics reveals that two- and three-dimensional patient-derived cell models capture tumor heterogeneity of clear cell renal cell carcinoma. *Eur Urol Focus*. In press. doi: 10.1016/j.euf.2019.06.009.
- [7] Weng W, Meng T, Zhao Q, etc. Antibody-Exatecan Conjugates with a Novel Self-immolative Moiety Overcome Resistance in Colon and Lung Cancer[J]. *Cancer Discov*. 2023 Apr 3;13(4):950-973.