

3D 细胞培养平台用于体外/ 离体癌症药理学分析

借助冠科生物3D 离体和体外分析大型平台，评价化合物，
了解 真实的原位肿瘤生物学

虽然新抗癌药物在现有体外临床前模型中表现出高度活性，但在临床实验中的失败率高达 95%^[1]。这表明需要创新型模型，以更好地进行体内肿瘤生物学模拟。目前，利用细胞培养模型进行药物发现的方式，在业界广泛应用。这是为了加快临床前肿瘤学研究过程的步伐，同时提高研究效率。然而，在扁平塑料器皿上培养细胞会引起人工的 2D 单层化。当细胞在培养瓶的塑料表面扩散和变平时，细胞会承受额外的应力，无法进行有效的细胞-细胞和细胞-基质接触。这些因素均会影响基因表达和蛋白质功能。因此，提出了 2D 细胞培养模型是否能代表相应的原位肿瘤，并具备充分保真度的问题。

组织的组成细胞遵循复杂的动态 3D 排列结构，从生理学角度看，这对它们很重要。细胞的 3D 结构影响其对外界刺激的反应能力，以及激活适当反应的能力。癌细胞（与其正常细胞高度相似）通过建立一个独特的生长生态位—肿瘤微环境（TME），从该 3D 结构间的相互作用以及与周围细胞外基质之间的相互作用获益。为研究新化合物作为抗癌药的治疗效果，需考虑肿瘤的 3D 性质及其与 TME 的通信。

3D 细胞培养模型标志着我们对真实原位肿瘤生物学有了进一步了解。在 3D 细胞培养模型中，肿瘤细胞生长时，应避免接触塑料，使其保持天然结构并实现相互影响作用，从而最大限度地降低应力并减少人为反应。3D 细胞培养模型相较于 2D 培养模型的改进比较如表 1 所示。

冠科生物 3D 细胞培养模型来源

冠科生物提供了一系列离体和体外模型用多种离体和体外 3D 分析系统，用于临床前肿瘤学研究。

我们的离体模型源自 HuPrime 和 HuKemia—冠科生物的经充分定性检测的人源肿瘤异种移植（PDX）模型库，这是目前业界最大的商业化 PDX 模型库。

表 1: 2D 和 3D 细胞培养模型比较

	2D	3D
细胞形状	扁平，厚度：3 μm	椭圆，厚度：10-30 μm
环境	约 50% 的细胞表面与培养瓶接触，极小比例的细胞与相邻细胞接触	接近 100% 的表面暴露于其他细胞或基质
细胞行为	分化 ⁽²⁾ 、药物代谢 ⁽³⁾ 、基因表达 ⁽⁴⁾ 、增殖率 ⁽⁵⁾ 、对刺激的反应 ⁽⁶⁾ 和活力 ⁽⁷⁾ 的差异	

这些模型具备丰富的原发细胞和细胞系来源资源，涵盖一系列含很多分子靶点的癌症类型。离体模型包括从 PDX 肿瘤模型中新鲜分离的细胞（分离当天立即用于分析）。目前，我们已验证了近 70 个 PDX 来源原代细胞，用于 3D 细胞培养分析。这些细胞来源于实体瘤和血癌模型（详见表 2）。

我们还提供了 3D 分析用新鲜冷冻 PDX 细胞。根据分析需要，分离、冷冻和解冻细胞悬液。这可将试验时间表压缩至 2 周，在 PDX 肿瘤供体生长的同时无滞后时间。冠科生物提供了一系列癌症类型的新鲜冷冻 PDX 细胞（如表 3 所示），更多的模型正在开发中。HuPrime 模型还用于建立专有的 PrimePanel 细胞系库⁽⁸⁾，由去除了鼠源基质细胞的人源肿瘤细胞培养物组成。

表 2: 经 3D 细胞培养分析验证的 PDX 来源原代细胞

组织起源	HuPrime 编号
ALL	AL5511, AL7443, AL7473
AML	AM5512, AM7440, AM7577
脑部	BN2276, BN2287, BN2331, BN2338
胸部	BR1282, BR1283, BR1458, BR1474
结直肠	CR0029, CR1520, CR1560, CR1574, CR2161, CR2506, CR2518, CR2520, CR2524, CR2545, CR3085
食管	ES0195, ES0201
胆囊	GL0440
肝脏	LI0050, LI0574, LI0612, LI0752, LI0941, LI1037, LI1098, LI1646
肺部	LU0038, LU0299, LU0330, LU0367, LU0377, LU0387, LU0395, LU0743, LU0755, LU0884, LU1143, LU1144, LU1147, LU1155, LU1215, LU1271, LU1380, LU1423, LU1868, LU1901, LU2503, LU2505, LU2512, LU3075, LU6409
卵巢	OV0205, OV0273, OV1658
胰腺	PA1168
胃部	GA0037, GA0087, GA0103, GA0114

橙色为新近验证的模型



我们的细胞系均为早期传代 (<10) 细胞系, 保留了原始患者肿瘤的基本组织病理学特征和遗传特征, 包括基因组突变状态、生物信号通路和对肿瘤细胞自主靶向治疗的响应。PrimePanel 提供了一个多用途的、具有高效费比的高通量筛选平台, 用于在体内研究之前评估药物的疗效。

在冠科生物, 我们建立了5个用于3D细胞培养的PrimePanel细胞系, 详见表4。

表 3: 经 3D 细胞培养分析验证的 PDX 来源的新鲜冷冻细胞

PDX 癌症模型类型	模型数	PDX 癌症模型类型	模型数
膀胱	2	肾脏	1
脑部	2	肝脏	11
胸部	5	肺部	20
宫颈	1	淋巴瘤	3
胆管癌	3	转移性癌	1
结直肠	18	卵巢	6
食管	7	胰腺	3
胆囊	2	肉瘤	3
胃部	10	总计	103
头颈	5		

为补充离体模型, 冠科生物建立了 >100 个商业化细胞系的 3D 细胞培养模型, 经我们验证, 可用于体外药物药效研究, 包括乳腺癌、肺癌、卵巢癌和胰腺癌细胞系。经验证的体外 3D 细胞系汇总见表 5。

利用上述模型进行化合物筛选的3D细胞培养平台包括, 甲基纤维素试验, 以及基于商业化解解决方案的 3DAlvetex®基质 (可用于在甲基纤维素中生长不良的细胞), 软琼脂集落形成和 3D 肿瘤生长试验 (3D TGA)。

表 4: 经 3D 细胞培养分析验证的 PrimePanel 细胞系

PrimePanel ID	癌症类型	患者和疾病背景
CR5063CL	结肠癌	27 岁女性。既往接受过 FOLFOX, Camptosar®, Erbitux®, FUDR®, 亚叶酸治疗
LU5143CL	NSCLC	78 岁男性
LU5224CL	SCLC	48 岁女性。浸润性高恶性癌
LU5381CL	NSCLC	57 岁女性。既往接受过 IFOX®, Taxol®, Gemzar® 治疗
ME5338CL	黑色素瘤	转移性黑色素瘤 (脑部)

表 5: 经 3D 细胞培养分析验证的体外细胞系

	甲基纤维素	Alvetex	软琼脂
癌症类型	细胞系		
血液	Daudi, DoHH-2, EHEB, Jurkat (clone E6-1), JVM-13, JVM-2, JVM-3, K-562, Karpas299, Kasumi, MEC-1, MEC-2, MEG-01, MoIm-16, MOLT-4, Namalwa, OCI-LY19, REH, SU-DHL-10, SU-DHL-5, SUP-B15, TF-1, THP-1, Toledo, U-937, WSU-DLCL-2		
骨骼	CADO-ES1, RD-ES		
大脑和神经	A172, H4, IMR-32, LN18, LN229, SF126, SH-SY5Y, SK-N-SH, U-118 MG, U251, U-87 MG		
胸部	T-549, DU4475, MDA-MB-231, MDA-MB-436		MDA-MB-231
结直肠	HT-29, HCT 116		HT-29, HCT-116
食管	KYSE70, KYSE270, KYSE410, TE-1		
头部和颈部	FaDu, SW579		
肝脏	HCCLM3, Hep G2, HLF, HUH-7, JHH-5, JHH-7, MHCC97H, PLC/PRF/5, SK-HEP-1, SNU-398, SNU-878, SNU-886	Hep 3B	Hep 3B, Hep G2, JHH-7, PLC/PRF/5, SK-HEP-1
肺部	A549, Calu-6, DMS53, DMS79, DMS114, EBC-1, H69AR, HCC4006, NCI-H1155, NCI-H1299, NCI-H1373, NCI-H1395, NCI-H1417, NCI-H1435, NCI-H1437, NCI-H157, NCI-H1581, NCI-H1650, NCI-H1688, NCI-H1703, NCI-H1792, NCI-H1836, NCI-H1975, NCI-H2052, NCI-H209, NCI-2227, NCI-H226, NCI-H23, NCI-H358, NCI-H446, NCI-H460, NCI-H520, NCI-H522, NCI-H526, NCI-H69, NCI-H82, SK-MES-1		NCI-H1299
卵巢	OVCAR-8, SK-OV-3, SW626, SW756		
胰腺	AsPc-1, Capan-1, MIAPaCa-2, PANC-1, PL45		CFPAC-1, MIAPaCa-2
前列腺	PC-3		
胃部	A3/KAW, AGS, AZ521, GTL-16, HGC-27, Hs 746T, IM95, IM95m, KATO III, MKN1, MKN45, MKN74, NCI-N87, NUGC-3, NUGC-4, OCUM-1, SCH, SNU-1, SNU-16, SNU-5, SNU-484, SNU601, SNU-620, SNU-638, SNU-668, SNU-719, YCC-2, YCC-7, YCC-10, YCC-11		AGS, AZ-521, GTL-16, HGC-27, MKN1



使用 HuPrime PDX 模型的甲基纤维素试验的离体模型

我们的 3D 克隆形成体外/离体甲基纤维素试验提供了低成本、高通量体外药物筛选和使用我们独特的 HuPrime 模型进行的临床相关体内药物疗效研究之间的密切联系（试验概念如图 1 所示）。上述 PDX 来源离体模型均可用于该试验。

例如，对于接种到免疫缺陷小鼠中的新鲜分离的原代细胞，一旦肿瘤达到适当大小（通常在 400 mm³ 和 800mm³ 之间），就可以对异种移植体进行采集。裂解肿瘤并以适当的稀释度将细胞接种于甲基纤维素或 3D Alvetex 平板上，使其生长成 3D 模型，并优化细胞密度以获得以保证实验结果的可重复性。

然后可从培养第 2 天至第 10 天对细胞给予待测抗癌药物。终点包括细胞的相差显微镜成像和 CellTiter-Glo® (CTG) 试验，以验证抗癌化合物的疗效。

顺铂对新鲜分离的胆囊肿瘤模型 GL0440 原代细胞的离体疗效研究示例见表 6。将顺铂以 0.1 μM、1 μM 和 100 μM 给予肿瘤细胞，并对各剂量进行相差成像（10倍），以评价药物治疗效果。然后可以生成剂量反应曲线；图 2 显示了甲基纤维素试验中 OV5397 卵巢癌 PDX 模型来源细胞对顺铂的剂量反应。

图 1：离体克隆试验（采用 HuPrime PDX 模型中新鲜分离的细胞）

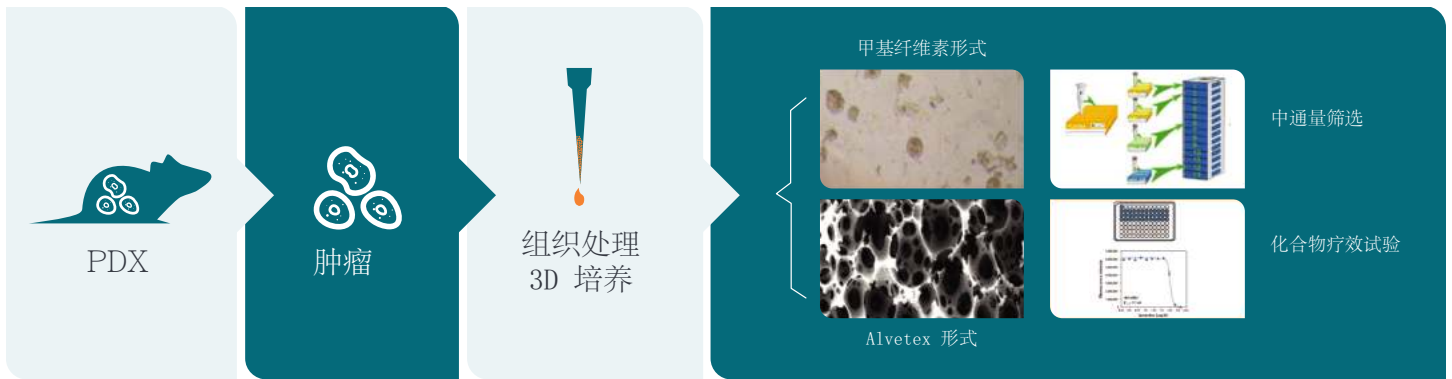


表 6：研究顺铂对原代细胞（3D 培养 GL0440 来源）的离体有效性

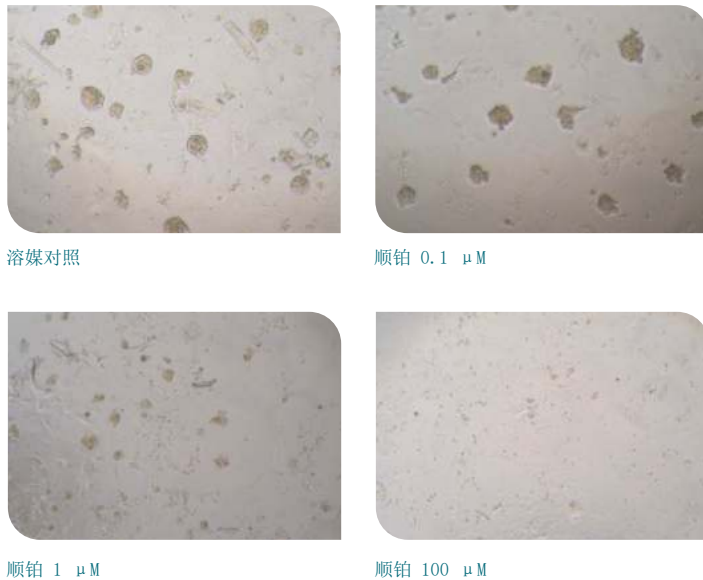
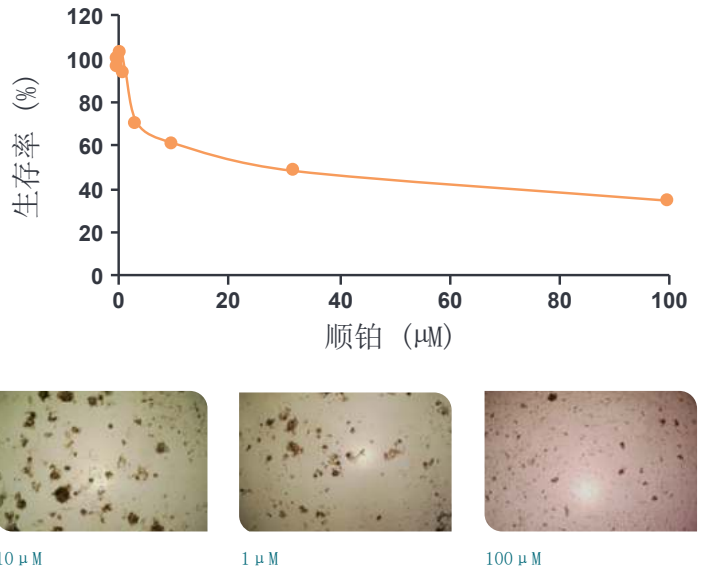


图 2：顺铂对原代细胞（3D 培养 OV5397 来源）有效性的剂量反应曲线



借助 HuPrime PDX 模型和 PrimePanel 细胞进行离体模型的 3D TGA 试验

3D TGA 分析已是一个经验证的平台，可用于肿瘤药物研发，并有多篇相关文献发表，开展的研究涵盖了一系列癌症类型^(9, 10, 11, 12)。3D TGA 分析使用低硬度富含层粘连蛋白的细胞外基质 (IrBME, Cultrex®) 包埋肿瘤细胞，并联合 hMSC (例如 IL-6、HGF) 和 CAF，提供实体瘤 TME 中存在的旁分泌信号。添加激素 (例如 DHT/E2)、限制葡萄糖 (≤ 7 mM) 并维持酸性 pH 值 (6.8)，提供了一种 3D 细胞试验方法。该方法符合“人源化”和 TME 要求，用于分析 PDX 来源细胞和药物筛选⁽⁹⁾。

表7 比较了肿瘤在人体中、2D 培养和和人源化 3D 细胞培养下的生长条件，3D 培养更接近人体环境。

我们已优化了 3D TGA 试验，使用 alamarBlue® 比色法定义细胞生长和总细胞群数量的线性范围 (3D Glo 等其他终点也可用)。也可通过荧光/生物发光读数法监测转染过的单个细胞类型。3D TGA 可与上述所有离体模型一起使用，用于药物评价和进一步研究 (根据需要)。

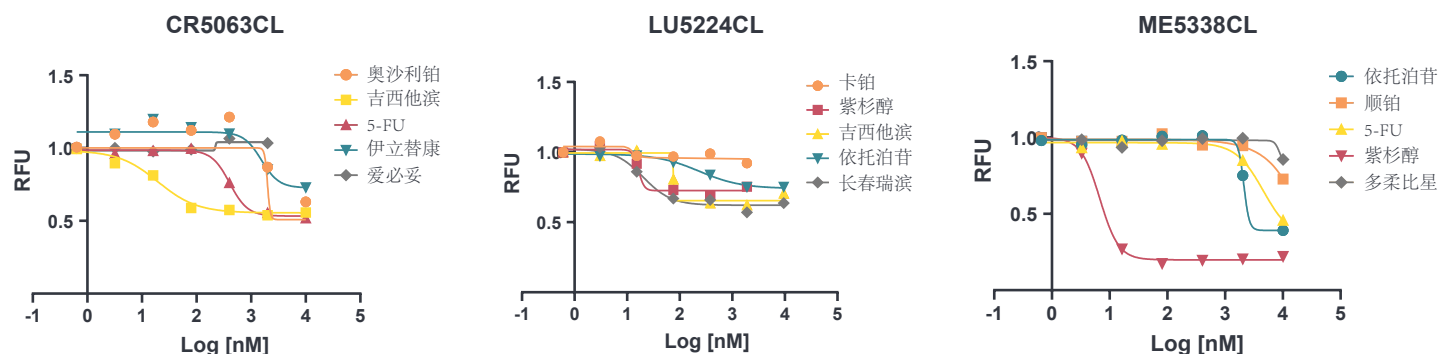
图 3 呈现了使用我们的 3D TGA 与选定的结直肠、肺和黑色素瘤 PrimePanel 细胞系进行的 IC50 评价示例。

PDX 肿瘤模型因与原始肿瘤的病理表现型具备高度相似性，所以成为抗癌药药效临床前评估的理想模型，然而，动物体内研究耗费人力、时间、通量低而成本又高，使其在早期药物研发中的使用受限。PrimePanel 细胞并非均由 PDX 生成；但是，3D TGA 系统能在 96 孔板中采用新鲜的 PDX 培养物。

表 7: 人体、2D 和 3D 培养肿瘤状况比较⁽¹¹⁾

肿瘤条件	人	2D 培养	3D-TME 培养
氧气 (缺氧条件)	0-5%	21%	$\leq 5\%$
硬度	200-4,000 Pa	3,000,000,000 Pa	200-4,000 Pa
pH 值	酸性 (≤ 7.0)	缓冲 (≥ 7.2)	酸性 (≤ 7.0)
维度	3D	2D	3D
葡萄糖可用性	< 7 mM	10-25 mM	< 7 mM

图 3: 通过 3D TGA 的 PrimePanel 细胞系对药物组 IC50 的评价



PrimePanel 细胞系	IC ₅₀ (μM)										
	5-FU	卡铂	顺铂	多柔比星	爱必妥	依托泊苷	吉西他滨	伊立替康	奥沙利铂	紫杉醇	长春瑞滨
CR5063CL	0.405	—	—	—	~0.157	—	0.020	1.54	~1.99	—	—
LU5224CL	—	~0.014	—	—	—	0.248	0.080	—	—	~0.017	0.021
ME5338CL	4.59	—	>100	8.67	—	~2.09	—	—	—	0.007	—

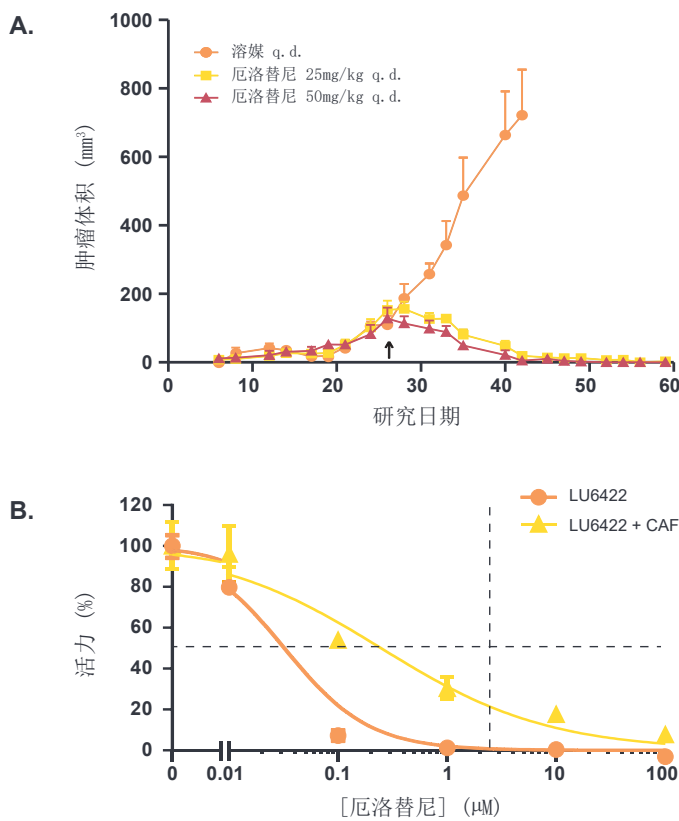


经证明，3D TGA 和体内模型中抗癌药物的反应与预期临床结局之间具备相关性。LU6422 是腺癌亚型的 NSCLC PDX 模型。PDX 模型在细胞内激酶结构域中含有杂合的c.2573T>G (L858R)，这与患者对 EGFR 靶向治疗（如厄洛替尼）的超敏反应有关。体内模型中，继皮下植入 MSC 联合 25mg/kg 和50 mg/kg 厄洛替尼治疗后，观察到该PDX 模型中所有肿瘤生长完全消退（图4A）。在 3D TGA 模型中，LU6422 来源细胞对厄洛替尼也具备高度敏感性，与体内反应相关（图4B）。这些研究数据最近由我们与合作者在 Molecular Cancer Therapeutics 中发布⁽⁹⁾。

3D TGA 大规模筛选

PDX 模型可用于小鼠临床实验 (HuTrials)，以区分应答者和非应答者群体，并充分阐明临床中患者分层的特征和预测性生物标志物。这些PDX 来源细胞还可用于3D TGA 实验，进行大规模药效筛选，以确定最有可能使个体患者获益的药物与组合⁽⁹⁾。

图 4: 体内和 3D TGA 的 LU6422 PDX 响应相关性



使用细胞系的甲基纤维素和软琼脂分析的体外模型

为完善离体分析，冠科生物已验证了3D 分析用一系列商业化体外细胞系。已采集处于生长状态的细胞，并接种在经一定程度稀释的甲基纤维素、软琼脂或其他市售基质上，以实现针对各细胞系（例如，5000 个细胞/孔）优化的最终细胞密度。从第 2 天开始，根据所需的浓度设计对每个孔给予抗癌化合物。借助 CTG 分析法对细胞计数时，在终点之前，每天监测细胞生长情况。图 5 显示了FaDu 头颈癌细胞系的剂量反应曲线。FaDu 在 3D 模型中生长，并用递增剂量的实验性抗癌化合物进行处理，以测试其药效。

我们还提供了低贴壁 96 孔板中的软琼脂分析。将细胞系以 3×10^3 个细胞/孔铺板于 0.4% 琼脂中，覆盖 0.6% 琼脂的基层。向生长培养基中添加被测药物，终点是 CTG 或成像分析。图 6 显示了软琼脂分析两个终点时顺铂剂量反应的比较图像。EC50 计算值具有可比性，验证了成像是该分析的终点。

图 5: FaDu 头颈癌细胞系的剂量响应曲线

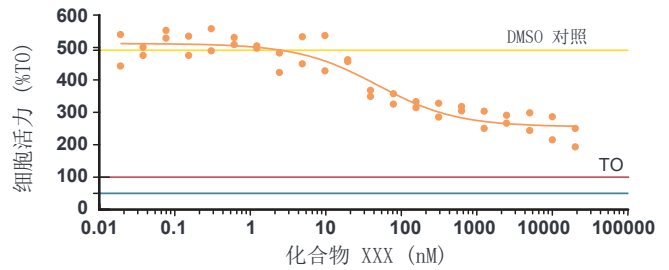
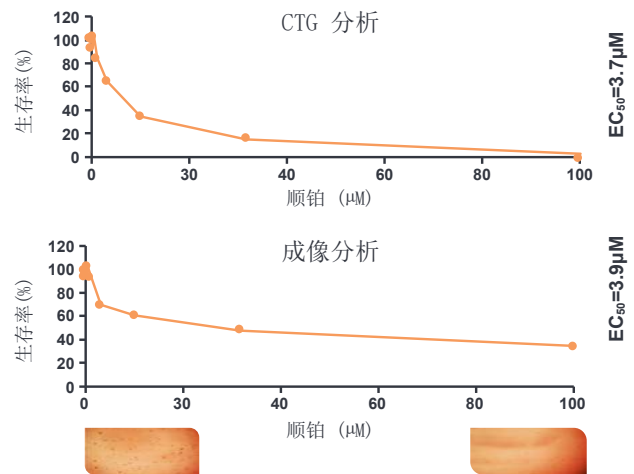


图 6: 顺铂处理 CFPAC-1 癌细胞系的剂量响应曲线





总结

肿瘤属于 3D 病理学实体。评估新抗癌药的药效时，应考虑它们的 3D 性质，因为会影响其对外部刺激（如化疗）的反应。肿瘤药物研发时的失败率明显高于其他疾病领域的药物。在现有临床前模型中，只有 5% 的抗癌药物在成功通过 III 期实验后获得许可，这些药物在现有临床前模型中具备活性[1]。药物失败大多与药效有关，而不是与毒理学问题有关。证实了目前的临床前肿瘤学 2D 细胞培养系统并不能代表相应的原位 3D 肿瘤，保真度不足。

冠科生物研发了多种离体和体外模型，用于 3D 培养和临床前肿瘤学研究。我们的离体模型来源于经定性检测和充分验证的 HuPrime 和 HuKemia PDX 模型。提供新鲜分离的细胞系、新鲜冷冻细胞以及专有 PrimePanel 细胞系，这些细胞系为早期传代 (<10) 细胞系，保持了原始患者肿瘤的基本组织病理学特征和遗传特征。为了完善这些资源，我们还提供了 >100 个商业化细胞系，这些细胞系经验证

能用于 3D 培养。我们的离体和体外模型可用于一系列 3D 分析。冠科生物提供 3D 克隆体外/离体甲基纤维素分析，该方法将低成本、高通量体外药物筛选和临床相关体内药物疗效研究密切联系起来。软琼脂分析具备相似的功能，根据需要提供 CellTiter-Glo 或成像终点。

我们还提供了 3D TGA，已成为经验证的临床前肿瘤药物平台。

3D TGA 与 TME 具高度相似性，上皮细胞在无血清条件下与基质细胞和细胞外基质联合培养，实现了更具有临床相关性的培养方法。3D TGA 与 PDX 模型结合使用，可通过实现多种单一和组合药物的快速和可扩展的离体药物敏感性筛选，来加快研究速度[9]。欲想了解 3D 细胞培养平台的任何其他问题或信息，或任何其他冠科生物产品和服务的其他信息，可登录网址 busdev@crownbio.com 与我们联系。



参考文献

¹Hutchinson L, Kirk R. High drug attrition rates - where are we going wrong? *Nature Reviews Clinical Oncology* 2011; 8:189-190.

²Tian XF, Heng BC, Ge Z *et al.* Comparison of osteogenesis of human embryonic stem cells within 2D and 3D culture systems. *Scandinavian Journal Clinical Laboratory Investigation* 2008;68(1): 58-67.

³Elkayam T, Shaprut S, Dvir-Ginzberg M *et al.* Enhancing drug metabolism activities of C3A - A human hepatocyte cell line - By tissue engineering within scaffolds. *Tissue Engineering* 2006;12(5): 1357-1368

⁴Shoeters G, Leppens H, Van Gorp U, and Van Den Heuvel R. Haemopoietic long-term bone marrow cultures from adult mice show osteogenic capacity in vitro on 3-dimensional collagen sponges. *Cell Proliferation* 1992;25(6): 587-603.

⁵Scaglione S, Braccini A, Wendt D *et al.* Engineering of osteoinductive grafts by expansion of ovine bone marrow stromal cells directly on 3D ceramic scaffolds. *Biotechnology and Bioengineering* 2005;93(1): 181-187.

⁶Debeb BG, Zhang X, Krishnamurthy S *et al.* Characterizing cancer cells with cancer stem cell-like features in 293T human embryonic kidney cells. *Molecular Cancer* 2010;9: 180.

⁷Laurencin CT, El-Amin SF, Ibim SE *et al.* A highly porous 3-dimensional polyphosphazene polymer matrix for skeletal tissue regeneration. *Journal Biomedical Materials Research* 1996;30(2): 133-138.

⁸Zhang Y, Ge Y, Liu Y *et al.* PrimePanel provides a high throughput in vitro drug screening platform that intimately links to in vivo pharmacological analysis in PDX models [abstract]. In: Proceedings of the 104th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research; 2013 Apr 6-10; Washington, DC. Philadelphia (PA): AACR; *Cancer Research* 2013;73(8 Suppl):Abstract nr 2787.

⁹Onion D, Argent RH, Reece-Smith AM *et al.* 3-Dimensional Patient-Derived Lung Cancer Assays Reveal Resistance to Standards-of-Care Promoted by Stromal Cells but Sensitivity to Histone Deacetylase Inhibitors. *Molecular Cancer Therapeutics* 2016;15(4): 753-756.

¹⁰Casneuf T, Axel AE, King P *et al.* Interleukin-6 is a potential therapeutic target in interleukin-6 dependent, estrogen receptor- α -positive breast cancer. *Breast Cancer: Targets and Therapy* 2016;8: 13-27.

¹¹Krausz E, de Hoogt R, Gustin E *et al.* Translation of a Tumor Microenvironment Mimicking 3D Tumor Growth Co-culture Assay Platform to High-Content Screening. *Journal of Biomolecular Screening* 2013;18(1): 54-66.

¹²Spaeth EL, Dembinski JL, Sasser AK *et al.* Mesenchymal Stem Cell Transition to Tumor-Associated Fibroblasts Contributes to Fibrovascular Network Expansion and Tumor Progression. *PLoS ONE* 2009;4(4): 34992.

联系



销售

太仓 0512-53879999

busdevcn@crownbio.com
www.crownbio.com



科学

consultation@crownbio.com

