

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2024 年 9 月 26 日 (26.09.2024)



(10) 国际公布号
WO 2024/192567 A1

(51) 国际专利分类号:
C12N 5/071 (2010.01) *C12N 5/09* (2010.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2023/082192

(22) 国际申请日: 2023 年 3 月 17 日 (17.03.2023)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(71) 申请人: 北京大学 (**PEKING UNIVERSITY**) [CN/
CN]; 中国北京市海淀区颐和园路 5 号,
Beijing 100871 (CN)。

(72) 发明人: 邓宏魁 (**DENG, Hongkui**); 中国北京市海
淀区颐和园路 5 号, Beijing 100871 (CN)。 屈
默龙 (**QU, Molong**); 中国北京市海淀区颐和
园路 5 号, Beijing 100871 (CN)。 熊亮 (**XIONG,**
Liang); 中国北京市海淀区颐和园路 5
号, Beijing 100871 (CN)。

(74) 代理人: 中科专利商标代理有限责任公司(**CHINA**
SCIENCE PATENT & TRADEMARK AGENT LTD.);
中国北京市海淀区西三环北路 87 号 4-312
室, Beijing 100089 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家
保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG,
BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU,
CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI,
GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ,
IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ,
LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN,
MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA,
PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD,
SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ,
UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

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

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第21条(3))。
- 包括说明书序列表部分(细则5.2(a))。

(54) **Title:** NOVEL HUMAN INTESTINAL TRACT AND COLORECTAL TUMOR ORGANOID CULTURE SYSTEM

(54) 发明名称: 建立新型人肠道及结直肠肿瘤类器官培养体系

(57) **Abstract:** Provided is a composition used for obtaining and/or culturing a human intestinal tissue-derived organoid or a human colorectal tumor tissue-derived organoid, the composition comprising an ALK inhibitor, a WNT agonist, an EGF agonist, and an FGF agonist. Further provided is a composition used for obtaining and/or culturing an organoid having a proliferative intestinal crypt tissue feature and/or an "intermediate plastic state" cell, the composition comprising an ALK inhibitor, a WNT agonist, an EGF agonist, an EBP1 and IκB dual regulator, and a P38 inhibitor.

(57) 摘要: 提供了一种用于获得和/或培养人肠道组织来源类器官或人结直肠肿瘤组织来源类器官的组合物, 其包括ALK抑制剂、WNT激动剂、EGF激动剂和FGF激动剂。还提供了一种用于获得和/或培养具有增生性肠道隐窝组织特征的一类器官和/或"中间可塑性状态"细胞的组合物, 其包括ALK抑制剂、WNT激动剂、EGF激动剂、EBP1及IκB双重调节剂和p38抑制剂。

WO 2024/192567 A1

说明书

发明名称：建立新型人肠道及结直肠肿瘤类器官培养体系

技术领域

[0001] 本发明涉及人类肠道组织及结直肠肿瘤组织来源的类器官，特别涉及人肠道及结直肠肿瘤类器官，其用途以及获得它们的方法。

背景技术

[0002] 类器官技术的发展允许干细胞在体外进行自组织，模拟了体内组织的复杂结构和功能。目前已经在多种组织器官上开发了类器官培养技术，这为研究分化发育和疾病治疗提供了宝贵的工具。然而，传统人肠道类器官培养技术难以捕获原位肠道及肿瘤组织的上皮细胞异质性，同时类器官扩增速率慢。这些缺陷严重限制了人肠道类器官技术的临床应用。除此之外，传统人肠道类器官技术难以捕获中间可塑性状态特征，导致其难以重建结直肠肿瘤发生发展以及抵抗治疗等方面的特征。为了弥补传统人肠道类器官技术的不足，在此，我们建立了一种新的人体肠道类器官技术，能够在体外捕获和维持与原位肠道及结直肠肿瘤组织特征相似的类器官；同时，我们能够在新型人肠道类器官体系中捕获中间可塑性状态，从而获得结直肠肿瘤发生发展以及抵抗治疗等方面的特征。

[0003] 发明内容

[0004] 三维类器官具有模拟生理状态下组织结构和功能的能力，为体外建模和疾病研究提供了宝贵的工具。然而，传统人肠道类器官培养技术难以捕获原位肠道及结直肠肿瘤组织特征。在此，我们建立了一种新的人体肠道类器官培养系统，能够捕获并维持原位肠道及结直肠肿瘤组织的关键特征。与传统肠道类器官相比，人肠道及结直肠肿瘤组织来源的类器官显著富集了上皮细胞异质性，如杯状细胞谱系基因的启动，并且类器官的增殖及扩增能力有了显著的增强。进一步地，单细胞分析显示，在本发明所述条件下培养的结直肠肿瘤类器官中存在一种在结直肠病人肿瘤进展过程中出现的“中间可塑性状态”，简称为IPS。在肿瘤类器官中捕获IPS，可以获得长期药物反应能力。此外，在肠道类器官中捕获IPS可以诱导获得人增生性肠道隐窝特征，同时启动肿瘤特异性基因表

达。综上，我们的研究建立了一个新的人肠道及结直肠肿瘤组织来源类器官的体外模型，为探索人体肠道组织发育和肿瘤发生发展开辟了新的途径。

[0005] 具体地，本发明提供了用于培养获得具有原位肠道及结直肠肿瘤组织特征的新型人肠道类器官的组合物和方法。具体地，本发明提供了以下技术方案：

[0006] 1. 一种组合物，其特征在于，包括(1)ALK抑制剂，(2)WNT激动剂，(3)EGF激动剂和(4)FGF激动剂，优选地所述组合物用于获得和/或培养人肠道组织来源类器官或人结直肠肿瘤组织来源类器官。

[0007] 2. 根据项目1所述的组合物，其中，所述(1)ALK抑制剂选自由以下各项组成的组中的一种或多种：LDN193189，LDN214117，LDN212854，ML347，K02288；优选为LDN214117。

[0008] 3. 根据项目1所述的组合物，其中，所述(2)WNT激动剂选自由以下各项组成的组中的一种或多种：CHIR-99021，CHIR-98014，CHIR-98023，CHIR-98024，GSK3 β inhibitor XV，TD114-2，BIO-acetoxim；优选为CHIR-99021。

[0009] 4. 根据项目1所述的组合物，其中，所述(3)EGF激动剂选自由以下各项组成的组中的一种或多种：EGF，HB-EGF，AREG，EREG，NRG1，NRG2，NRG3，NRG4；优选为EGF。

[0010] 5. 根据项目1所述的组合物，其中，所述(4)FGF激动剂选自由以下各项组成的组中的一种或多种：FGF1，FGF2，FGF3，FGF4，FGF5，FGF6，FGF7，FGF8，FGF9，FGF10，FGF11，FGF12，FGF13，FGF14，FGF15，FGF16，FGF17，FGF18，FGF19，FGF20，FGF21，FGF23；优选为FGF2。

[0011] 6. 根据项目1所述的组合物，其还包含(5)EBP1及I κ B双重调节剂；

[0012] 任选地，所述(5)EBP1及I κ B双重调节剂选自由以下各项组成的组中的一种或多种：WS3，WS6，(+)-Usnic acid，Pim-1/2激酶抑制剂1，RMC-5552，Sauchinone，PS-1145；优选为WS6。

[0013] 7. 获得和/或培养人肠道组织来源类器官或人结直肠肿瘤组织来源类器官的方法，其特征在于，在培养基中进行培养，优选地在培养基中将正常人肠道隐窝

组织或人结直肠肿瘤组织进行培养，其中所述培养基包含项目1-6任一项所述的组合物。

[0014] 8. 根据项目7所述的方法，其中，使用DMEM/F12作为基础培养基；

[0015] 优选地，所述基础培养基中还添加有HEPES、GlutaMAX、B27、1mM N-Acetylcysteine。

[0016] 9. 项目7所述的方法获得的人肠道组织来源类器官或人结直肠肿瘤组织来源类器官。

[0017] 10. 项目9所述的人肠道组织来源类器官或人结直肠肿瘤组织来源类器官，其特征在于，其表达标志基因LGR5、OLFM4、CHGA、CHGB、MUC2、AQP8、LYPD8中的一种或多种。

[0018] 11. 项目9所述的人结直肠肿瘤组织来源类器官，其包括具有“中间可塑性状态”细胞，所述“中间可塑性状态”细胞提高泛癌上皮-间充质可塑性标志基因，并显著提高标志物DPP4，EMP1，ITGA2，ANXA1中的一种或多种的表达。

[0019] 12. 项目9所述的人结直肠肿瘤组织来源类器官，其能够长期维持“中间可塑性状态”细胞。

[0020] 13. 项目9所述的人结直肠肿瘤组织来源类器官，其用于体外研究肿瘤抗治疗能力、转移侵袭等能力，用于筛选高效抑制或杀伤肿瘤细胞的治疗化合物，或用作重建肿瘤发展过程的体外模型。

[0021] 14. 组合物，其包括(1)ALK抑制剂，(2)WNT激动剂，(3)EGF激动剂，(4)EBP1及I κ B双重调节剂和(5)p38抑制剂，优选地所述组合物用于获得和/或培养具有增生性肠道隐窝组织特征的组织器官和/或“中间可塑性状态”细胞。

[0022] 15. 项目14所述的组合物，其中，所述(1)ALK抑制剂选自由以下各项组成的组中的一种或多种：LDN193189，LDN214117，LDN212854，ML347，K02288；优选为LDN214117。

[0023] 16. 项目14所述的组合物，其中，所述(2)WNT激动剂选自由以下各项组成的组中的一种或多种：CHIR-99021，CHIR-98014，CHIR-98023，CHIR-98024，GSK3 β inhibitor XV，TD114-2，BIO-acetoxim；优选为CHIR-99021。

- [0024] 17. 项目14所述的组合物, 其中, 所述(3)EGF激动剂选自由以下各项组成的组中的一种或多种: EGF, HB-EGF, AREG, EREG, NRG1, NRG2, NRG3, NRG4; 优选为EGF。
- [0025] 18. 项目14所述的组合物, 其中, 所述(4)EBP1及I κ B双重调节剂选自由以下各项组成的组中的一种或多种: WS3, WS6, (+)-Usnic acid, Pim-1/2 kinase inhibitor 1, RMC-5552, Sauchinone, PS-1145; 优选为WS6。
- [0026] 19. 项目14所述的组合物, 其中, 所述(5)p38抑制剂选自由以下各项组成的组中的一种或多种: SB202190, Pexmetinib, SB203580, BIRB 796, LY2228820, VX-702, PH-797804, VX-745, TAK-715, BMS-582949; 优选为SB202190。
- [0027] 20. 获得和/或培养人具有增生性肠道隐窝组织特征的肠道类器官和/或“中间可塑性状态”细胞的方法, 其特征在于, 在培养基中进行培养, 优选地在培养基中将人正常肠道隐窝组织或增生性肠道隐窝组织或项目9所述的人肠道组织来源类器官进行培养, 其中所述培养基包含项目14-19中任一项所述的组合物。
- [0028] 21. 项目20所述的方法, 其中, 使用DMEM/F12作为基础培养基;
- [0029] 优选地, 所述基础培养基中还添加有HEPES、GlutaMAX、B27、1mM N-Acetylcysteine。
- [0030] 22. 项目21所述的方法获得的人具有增生性肠道隐窝组织特征的肠道类器官和/或“中间可塑性状态”细胞。
- [0031] 23. 项目22所述的人具有增生性肠道隐窝组织特征的肠道类器官, 其特征在于, 显著下调部分分化谱系基因, 如CHGA、CHGB、MUC2、AQP8、LYPD8中的一种或多种。
- [0032] 24. 项目22所述的人具有增生性肠道隐窝组织特征的肠道类器官, 其特征在于可以长期维持“中间可塑性状态”细胞。
- [0033] 25. 项目22所述的人具有增生性肠道隐窝组织特征的肠道类器官, 其用于体外研究肿瘤起始发生, 用于筛选高效抑制或杀伤肿瘤细胞的治疗化合物, 或用作研究肿瘤发生的体外模型。
- [0034] 本发明的技术效果

[0035] 利用本发明中的新型人肠道类器官培养体系，能够建立一个与体内原位肠道及结直肠肿瘤组织有相似特征的新型人肠道类器官系统。在我们的类器官培养系统中，类器官具有与体内原位肠道及结直肠肿瘤组织相类似的上皮细胞异质性。本发明培养体系所获得的肠道类器官可用于模拟体内肠道组织的复杂结构和功能，为研究分化发育和肠道疾病治疗提供了宝贵的工具。

[0036] 进一步还发现了，本发明所获得的新型结直肠肿瘤类器官能够捕获并维持病人来源的结直肠肿瘤进展过程中出现的“中间可塑性状态”IPS细胞，使其获得长期的药物反应能力。值得注意的是，在正常组织来源的肠道类器官中通过本发明的培养体系诱导IPS程序可以获得具有增生性肠道隐窝组织特征的一类器官，因为获得IPS程序对于诱导及捕获肿瘤起始和进展特征发挥了重要的作用。

[0037] 实验材料和操作方法

[0038] 1. 肿瘤及癌旁组织获取

[0039] 肿瘤组织和邻近的正常组织从北京大学首钢医院获得，均已签署知情同意书并获得伦理委员会批准。本研究中患者的临床资料见表1。

[0040] 表1患者临床治疗

病人 编号	肿瘤类型	位置	性别	年龄	肿瘤病理分期	临床分期	微卫星
----------	------	----	----	----	--------	------	-----

P1	中低分化腺癌	升结肠	女	82	pT3N2aM0	III	微卫星稳定
P2	中分化腺癌	直肠	女	80	pT3N0M0	II	微卫星稳定
P3	低分化腺癌伴 粘液腺癌	乙状结 肠	男	72	pT3N0M0	II	微卫星不稳定
P4	高分化腺癌	升结肠	男	90	pT3N0M0	II	微卫星稳定
P5	中分化腺癌	直肠	女	78	pT3N0M0	II	微卫星稳定
P6	中分化腺癌	直肠	男	59	pT3N2bM0	III	微卫星稳定
P7	中分化腺癌	降结肠	女	58	pT4bN1bM0	III	微卫星稳定
P8	中分化腺癌	直肠	女	66	pT4aN0M0	II	微卫星稳定
P9	中分化腺癌	直肠	女	80	pT3N0M0	II	微卫星稳定
P10	微乳头腺癌	乙状结 肠	女	53	rypT4bN2aM0	III	微卫星稳定
P11	中分化腺癌	升结肠	男	62	pT3N0M0	II	微卫星稳定
P12	中分化腺癌	乙状结 肠	男	62	pT3N0/pT2N1bM0	II	微卫星稳定
P13	中分化腺癌	直肠	男	57	pT3N1b, cM1a	IV	微卫星稳定
P14	中分化腺癌	横结肠	男	72	pT4aN2bM1c	IV	微卫星稳定
P15	中分化腺癌	直肠	男	58	pT3N2a, cM1a	IV	微卫星稳定
P16	中分化腺癌	直肠	男	63	pT3N0M0	II	微卫星稳定
P17	中分化腺癌	横结肠	女	57	pT3N2a, cM1c	IV	微卫星稳定
P18	中低分化腺癌 伴粘液腺癌	乙状结 肠	男	59	pT3N2bM0	III	微卫星稳定
P19	中分化腺癌	直肠	男	77	pT3N0M0	II	微卫星稳定
P20	中分化腺癌	直肠	男	77	ypT2N0M0	I	微卫星稳定
P21	粘液腺癌	升结肠	女	67	pT4aN2a	IV	微卫星稳定

[0041] 2. 组织分离与类器官培养

[0042] 从手术切除组织中分离肿瘤及邻近正常组织，用含2%青霉素/链霉素(GIBCO)的预冷PBS冲洗至少10次。肿瘤细胞和结肠隐窝分离培养方式如下。简单地说，将相邻的正常结肠切成2~4mm的片段，置于5mM EDTA中4℃孵育30分钟，期间轻轻摇晃，之后在预冷的PBS中剧烈摇晃以释放结肠隐窝。将肿瘤组织切碎成0.5mm³的小碎片，放入10cm无菌皿中，加入含有500U/mL胶原酶IV(Sigma-aldrich, C9407)、1.5mg/mL胶原酶II(Solarbio, C8150)、20mg/mL透明质酸酶(Solarbio, h8030)、0.1mg/mL diase II(Sigma-aldrich, D4693)、10 μ M Y27632和1%胎牛血清的5ml消化液，37℃消化30-60分钟。并500g离心5min采集肿瘤细胞。将结肠隐窝和肿瘤细胞悬浮在Matrigel中，以20 μ L的液滴分布在预热48孔板上，在37℃，5%CO2培养箱中培养10-15分钟。待Matrigel聚合后，加入500 μ L Advanced DMEM/F12(Gibco)培养基，其中含10mM HEPES(Gibco)、1X GlutaMAX(Gibco)、1%盘尼西林/链霉素(Gibco)、1X

N2 Supplement(Gibco)、1X B27 Supplement(Gibco)和1.25mM n-乙酰半胱氨酸(Sigma-Aldrich)。传统条件人结直肠正常组织来源类器官培养条件：50%Wnt条件培养基、20%R-Spondin条件培养基、100ng/ml Noggin、50ng/ml EGF、10mM Niacinamide、10nM Gastrin、500nM A83-01、3 μ M SB202190和10nM前列腺素E2的培养基。传统条件人结直肠肿瘤组织来源类器官培养条件：20%R-Spondin条件培养基、100ng/ml Noggin、50ng/ml EGF、10mM Niacinamide、10nM Gastrin、500nM A83-01、3 μ M SB202190和10nM前列腺素E2的培养基。对于肠道组织来源类器官和结直肠肿瘤组织来源类器官，培养基中含有ALK抑制剂(例如0.2 μ M LDN-214177)、EGF激动剂(例如50ng/ml EGF)、WNT激动剂(例如3 μ M CHIR-99021)和FGF激动剂(例如100ng/ml FGF2)，即4C条件。对于5C增生性人肠道类器官培养，培养基中含有ALK抑制剂(例如0.2 μ M LDN-214177)、EGF激动剂(例如50ng/ml EGF)、WNT激动剂(例如3 μ M CHIR-99021)、EBP1及I κ B双重调节剂(例如0.5 μ M WS6)和p38抑制剂(例如3 μ M SB202190)。培养基每隔一天更新一次。传代时，从Matrigel中去除类器官或类肿瘤，并与TrypLE Express(Gibco)混合。在37℃孵育5分钟后，类器官或类肿瘤解离成小块，然后悬浮在Matrigel中并分配到新的48孔中。传代每1-2周进行一次，传统条件类器官或类肿瘤的传代比例为1：6，肠道组织来源类器官或结直肠肿瘤类器官的传代比例为1：16。单细胞传代时，将消化时间延长至20~30分钟，然后用40 μ m细胞过滤器过滤细胞，以4000个细胞/20 μ L Matrigel的浓度悬浮在Matrigel中，单细胞传代后的前2天推荐使用10 μ m Y-27632。类器官培养的试剂细节见表2。

[0043] 表2试剂来源

名称	供货商	货号
LDN-214117	MCE	HY-16712
CHIR-99021	MCE	HY-10182
A 83-01	MCE	HY-10432

SB 202190	MCE	HY-10295
WS6	MCE	HY-12461
PD0325901	MCE	HY-10254
Prostaglandin E2	MCE	HY-101952
Nicotinamide	MCE	HY-B0150
N-Acetylcysteine	Sigma	A9165
Gastrin I	R&D	3006
重组人 EGF	PeproTech	AF-100-15
Recombinant Murine Noggin	PeproTech	250-38
重组人 R-Spondin-1	PeproTech	120-10C
FGF2 (NM_002006) 人重组蛋白	Origene	TP750002

[0044] 3. 免疫组化及免疫荧光染色

[0045] 免疫荧光染色时，用细胞恢复液(Corning)从Matrigel中释放类器官，并用4%多聚甲醛(DingGuo)室温固定15分钟。用含0.1%Triton X-100(Sigma-Aldrich)的PBS进行细胞通透后，加入一抗并在4℃孵育过夜，然后用二抗在37℃孵育1小时。细胞核用DAPI(Roche Life Science)染色。免疫组化染色采用标准组织学方案包埋切片后，对8 μ M石蜡包埋组织切片进行处理。用Tris-EDTA(pH 9.0)缓冲液热诱导抗原提取，用封闭液(PBS、0.1%Triton X-100、5%二抗同源血清)在室温下封闭载片1h。将载玻片在4℃下用一抗孵育一夜，然后在室温下用二抗孵育1小时。用DAPI(Roche Life Science)染色细胞核。使用抗体细节见表3。

[0046] 表3抗体信息

名称	供货商	货号
OLFM4 蛋白抗体	abcam	ab96280
MUC2 蛋白抗体	abcam	ab11197
Chromogranin A 蛋白抗体	abcam	ab45179
Cytokeratin 20 蛋白抗体	abcam	ab854
Ki67 蛋白抗体	abcam	ab15580
EpCAM 蛋白抗体	abcam	ab223582
CDX2 蛋白抗体	Biogenex	MU392A-UC
β -catenin 蛋白抗体	BD Biosciences	610153

PE 结合的人 CD26 蛋白抗体	BioLegend	302705
647 荧光基团标记抗山羊 IgG (H+L)抗体	Jackson ImmunoResearch Laboratories	705-605-147
Cy TM 3 荧光基团标记抗兔 IgG (H+L)抗体	Jackson ImmunoResearch Laboratories	711-165-152
Cy TM 3 荧光基团标记抗小鼠 IgG (H+L)抗体	Jackson ImmunoResearch Laboratories	715-165-150

[0047] 4. 荧光定量PCR分析

[0048] 使用RNeasy Mini试剂盒(QIAGEN, 74106)从培养类器官的整个孔中提取总RNA。使用Trans-Script First-Strand cDNA Synthesis SuperMix(全式金)将RNA反转录为cDNA。qPCR使用KAPA SYBR_FAST qPCR Kit Master Mix试剂(KAPA Biosystems)和CFX ConnectTM Real-Time System(Bio-Rad)仪器。数据采用delta-delta Ct法进行分析。 β -actin被用作归一化基因表达的内参。本研究中使用的qPCR引物序列见表4。

[0049] 表4 qRT-PCR引物

基因	正向序列	反向序列
<i>β-ACTIN</i>	GACAGCAGTCGGTTGGAGCG (SEQ ID NO: 1)	GGGACTTCCTGTAACAACGCATC (SEQ ID NO: 2)
<i>VIM</i>	AGTCCACTGAGTACCGGAGAC (SEQ ID NO: 3)	CATTTACGCATCTGGCGTTC (SEQ ID NO: 4)
<i>TGFB1</i>	TACAGCACGGTATGCAAGCC (SEQ ID NO: 5)	GCAACCGATCTAGCTCACAGAG (SEQ ID NO: 6)
<i>HTRA1</i>	TCCCAACAGTTTGCGCCATAA (SEQ ID NO: 7)	CCGGCACCTCTCGTTTAGAAA (SEQ ID NO: 8)
<i>EMP3</i>	CCTGAATCTCTGGTACGACTGC (SEQ ID NO: 9)	GCCATTCTCGCTGACATTACTG (SEQ ID NO: 10)
<i>FSTL1</i>	GAGCAATGCAAACCTCACAAAG (SEQ ID NO: 11)	CAGTGTCCATCGTAATCAACCTG (SEQ ID NO: 12)
<i>TNC</i>	TCCCAGTGTTCGGTGGATCT (SEQ ID NO: 13)	TTGATGCGATGTGTGAAGACA (SEQ ID NO: 14)
<i>TIMP3</i>	CATGTGCAGTACATCCATACGG (SEQ ID NO: 15)	CATCATAGACGCGACCTGTCA (SEQ ID NO: 16)
<i>LGALS1</i>	TCGCCAGCAACCTGAATCTC (SEQ ID NO: 17)	GCACGAAGCTCTTAGCGTCA (SEQ ID NO: 18)
<i>SERPINE1</i>	CCTGGGCACTTACAGGAAGG (SEQ ID NO: 19)	GGTCCGATTTCGTCGTCAAATAAC (SEQ ID NO: 20)
<i>ITGA5</i>	GGCTTCAACTTAGACGCGGAG (SEQ ID NO: 21)	TGGCTGGTATTAGCCTTGGGT (SEQ ID NO: 22)
<i>LYZ</i>	CCGCTACTGGTGTAAATGATGG (SEQ ID NO: 23)	CATCAGCGATGTTATCTTGCAG (SEQ ID NO: 24)
<i>MUC2</i>	GCCAGCTCATCAAGGACAG	GCAGGCATCGTAGTAGTGCTG

	(SEQ ID NO: 25)	(SEQ ID NO: 26)
<i>CHGA</i>	TGACCTCAACGATGCATTC (SEQ ID NO: 27)	CTGTCCTGGCTCTTCTGCTC (SEQ ID NO: 28)
<i>LGR5</i>	CAGCGTCTTCACCTCCTACC (SEQ ID NO: 29)	TGGGAATGTATGTCAGAGCG (SEQ ID NO: 30)
<i>OLFM4</i>	ACCTTTCCCGTGGACAGAGT (SEQ ID NO: 31)	TGGACATATTCCTCATTGGA (SEQ ID NO: 32)
<i>AQP8</i>	GCGAGTGTCTGGTACGAAC (SEQ ID NO: 33)	CAGGCACCCGATGAAGATGAA (SEQ ID NO: 34)
<i>LYPD8</i>	TCCCCTGAAGAACGTGTCCA (SEQ ID NO: 35)	GCACGAGACTCTAGACTCAATG (SEQ ID NO: 36)

[0050] 5. 流式分析

[0051] 除去细胞培养基，加入TrypLE Express(Gibico)。在37℃孵育10分钟后，类器官被消化成分离的单细胞，用PE anti-human DPP4(BioLegend)在4℃染色30分钟，PBS洗涤3次。细胞使用40 μ m细胞过滤器过滤。最后，使用BD LSRFortessa仪器进行流式分析实验。使用FlowJo软件(Ashland)进行数据分析。

[0052] 6. 放化疗处理

[0053] 收集肿瘤类器官，并按照上述传代程序分离成单细胞。将含有4000个细胞的20 μ L Matrigel接种于48孔板中，在不同的培养基中培养。使用FOLFOXIRI方

案(其中5-Fu:伊立替康:奥沙利铂=1:1:1)进行化疗治疗时,将各药物终浓度调整为0.3、1、3、10、20、50 μ M。对于放射治疗,使用GammaCell 40照射器,将细胞暴露在单剂量2, 4, 6, 8, 12, 16Gy的照射下。之后每2~3天更新培养基,并在处理结束时,使用Cell Counter Kit-8(CCK-8)试验评估细胞活力,通过将处理孔与溶剂对照孔进行比较计算剂量响应曲线。

[0054] 7. 肾包囊移植

[0055] 将100万个肿瘤细胞用50 μ l的Matrigel重悬,并注射至6周龄雄性NPG小鼠(购买自北京维通达生物技术有限公司)的肾下极(肾包膜下方)。待观察到水泡形成,并且肿瘤细胞悬浮液几乎不再渗漏后,将针取出。研究中使用的动物在注射胶囊时形成了明显可见的水泡,且漏液量非常小。移植6周后处死小鼠。室温下用10%和20%的福尔马林固定整个肾脏24h。石蜡包埋后,切5 μ m切片贴于载玻片上进行免疫组化染色。并采用苏木精-伊红(H&E)染色法进行组织和细胞鉴定。

[0056] 8. 整体RNA测序分析

[0057] 将整体RNA测序计数数据转移到transcripts per Million(TPM)并对数归一化,通过ComBat_seq函数对批次效应进行校正。利用hclust对样本进行聚类 and 距离计算。利用DESeq2程序包(v1.34.0)获得差异表达基因(DE基因),分别在火山图和热图中显示。对DE基因进行基因集富集分析(GSEA)。对11个不同的EMT相关特征进行基因集变异分析(Gene Set Variation Analysis, GSVA),通过GSVA R包,根据这些EMT相关特征的log-TPM,寻找这些EMT相关特征在样本中的差异表达。GSVA评分用热图和箱线图进行可视化。基于iCMS scRNA-seq数据, MuSiC包(v1.0.0)用于预测不同条件培养下的肿瘤类器官细胞状态组成。

[0058] 9. 单细胞RNA测序分析

[0059] 测序数据经DNBelab_C_Series_HT_scRNA-analysis-software处理。根据转录本的数量和线粒体转录本的百分比对细胞进行过滤。使用Seurat包(v4.1.1)将表达式矩阵转换为Seurat对象。对iCMS数据集中49155个上皮细胞的scRNA-seq计数数据进行了重新分析。我们使用cNMF包进行了共识非负矩阵分解(cNMF),使用了6000个高变量基因。根据稳定性和误差选择K为6,密度阈值为0.1。

使用这6个cNMF分量进行无监督聚类(分辨率=0.2),得到10个细胞状态。通过FindAllMarkers找到每个状态的标记基因,通过AddModuleScore_UCell确定泛癌上皮-间充质可塑性相关的标记基因表达水平。采用UMAP-learn方法在cNMF的基础上进行UMAP分析。我们传统肿瘤类器官与结直肠肿瘤组织来源类器官的scRNA-seq数据经过质量过滤和对数归一化后合并在一起。12,718个细胞数据的组合由FindVariableFeatures、ScaleData和RunPCA处理,所有参数均为默认参数。然后我们使用RunHarmony函数来消除两种不同培养条件下产生的批次效应,使用PCA的前50个维度。我们使用带有默认参数的FindTransferAnchors和TransferData,将iCMS scRNA-seq数据(还原=cNMF,分辨率=0.2)中的细胞状态标签转移到传统肿瘤类器官与结直肠肿瘤组织来源类器官中。通过FindAllMarkers检测各细胞状态的标记基因。我们还检测了泛癌上皮-间充质可塑性相关特征在这些不同细胞状态下的表达,使用AddModuleScore_UCell计算每个细胞的UCell评分,并对每个状态的伪体进行基因集变异分析(Gene Set Variation Analysis, GSVA)(伪体是通过计算细胞状态的平均归一化表达得到的)。然后根据和谐约简的结果和之前识别的细胞状态进行线性判别分析(LDA),然后使用所有9个LDA分量和UMAP-learn方法进行UMAP降维。

[0060] 10. 细胞谱系划分

[0061] 将原位肿瘤组织、传统肿瘤类器官与结直肠肿瘤组织来源类器官中细胞制成Seurat集合体。我们使用package Harmony的RunHarmony函数来消除批次效应,然后以1:20维度的Harmony进行RunUMAP和FindNeighbors分析。利用scGate(v1.4.1)包的gating_model函数,首先根据上皮细胞的已知特征将细胞分为上皮细胞和非上皮细胞。我们进一步聚类20,223个上皮细胞,分析具有FindAllMarkers功能的差异表达基因。通过将标记物与已知的上皮谱系标记物进行比较,对10种细胞类型进行了注释。细胞类型及主要标志物如下:干细胞(LGR5、SMOC2、ASCL2、OLFM4);快速扩增细胞_1(MKI67, TOP2A, HIST1H4C, 和CENPF);快速扩增细胞_2(HILPDA, LGALS1和RBP1);肠细胞祖细胞(PYCARD);肠上皮细胞(EPCAM, FABP1, PHGR1和CA2);成熟肠上皮细胞(SLC26A3, SLC26A3和AQP8);分泌前体细胞(FCGBP和TFF3);

杯状细胞(FCGBP, TFF3, MUC2和SPINK4); 簇细胞(LRMP和BMX); 肠内分泌细胞(CHGA, CHGB, SCGN和FEV)。

[0062] 11. 全外显子测序分析

[0063] 采用最大精确匹配比对(BWA-MEM)v0.7.8-r455进行测序, 由人类参考基因组GRCh37进行比对。根据最佳实践指南, 我们使用Genome Analysis Toolkit(GATK)v3.8.0来处理bam文件, 包括标记重复项、重新调整索引和基础重新校准。我们将参考数据和肿瘤或类器官测序数据提供给MuTect2(涉及GATK v3.8.0), 并使用默认参数识别体细胞突变。通过使用anno var, 我们添加了效果预测和注释。为了高质量地检测体细胞CNAs, 通过Control-FREEC v11.4对BAM文件的读取深度变化进行解释, 并将肿瘤或类器官与参考细胞进行比较。利用Mutational Patterns R包v3.4分析突变特征, 确定所有体细胞snv的基因组, 并确定“人类癌症突变过程的特征”在原位肿瘤与肿瘤类器官样本中的贡献。

[0064] 12. CNV分析

[0065] 使用单细胞转录组数据的CNV推断是基于先前发表的经过inferCNV软件修改的方法。只有在单个细胞中平均相对表达超过1.5并通过所有质量控制的基因才被用于CNV推断。首先, 将一个基因的CNV评分降低到其100个邻近基因的平均表达水平。然后, 通过减去所有细胞的平均CNV分数, 将CNV分数聚合到零。最后, 利用平均10M CNV窗口内所有基因的CNV得分计算相对CNV得分。

[0066] 13. 肿瘤纯度预测

[0067] 为了计算肿瘤纯度, 我们应用inferCNV从单细胞转录组数据中估计拷贝数。推断的ecnv分析在体内肿瘤组织中鉴定了6组具有不同拷贝数变异模式的细胞。6组中, 第6组所有染色体均无拷贝数变异, 我们认为其为非恶性细胞。按照同样的策略, 传统条件培养的肿瘤类器官中的第6组和结直肠肿瘤组织来源类器官条中的第8组被认为是非恶性细胞, 其余的细胞被认为是恶性细胞。然后通过计算每个样本中恶性细胞数量与总细胞数量的比例来确定肿瘤的纯度。基于上述方法, 我们最终发现体内肿瘤组织、传统肿瘤类器官与结直肠肿瘤组织来源类器官中恶性细胞占总细胞的比例分别为87%、90%和94.2%。

[0068] 14. 肿瘤组织来源类器官脾脏异种移植

[0069] 将肿瘤组织来源类器官植入6-8周龄、18-20g雄性免疫缺陷小鼠(NOD. Cg-PrkdcscidII2rgtm1 Sug/JicCr1)脾脏, 小鼠购自北京维通利华实验动物科技公司。小鼠被安置在无病原体的环境中, 并按照机构动物护理指南使用。使用活体成像系统(IVIS)光谱ct(PerkinElmer)在体内生物发光成像定量肿瘤大小, 并采用盲法进行。小鼠成像60秒, 创建感兴趣区域(roi), 并测量为面积通量, 定义为平均亮度(光子/秒/cm²/立体)。使用Living Image V. 4. 0软件(Caliper Life Sciences)分析数据。在异种移植实验中, 将约 2×10^6 个细胞量的肿瘤组织来源类器官悬浮于培养基中, 与Matrigel(BD Biosciences)1:1混合, 以50 μ L的最终体积注射于脾脏囊下。免疫缺陷小鼠使用Avertin(JT 0781, 北京吉田生物科技有限公司)麻醉。肿瘤组织来源类器官在麻醉下通过腹部切口手术注入脾脏。注射后, 将脾脏轻轻放回腹腔, 恢复体内平衡。注射后第6周处死小鼠。小鼠死后20分钟内测定脾脏等器官肿瘤大小。

[0070] 15. 统计分析

[0071] 所有值均用均数 $\pm$ SEM表示。统计参数, 包括统计分析方法, 统计显著性阈值, n值在图的图例和补充图的图例中都有说明。

[0072] 16. 数据可用性

[0073] 当前研究中产生的数据均可以从GEO数据库中获取。本研究中使用的所有其他数据均在本文中作为源数据提供。

附图说明

[0074] 图1建立肠道组织来源类器官

[0075] a. 不同条件下培养的人肠道组织来源类器官的典型形态。在单细胞传代后第10天进行成像。

[0076] b. 量化不同条件下类器官的数量和大小(n=4)。

[0077] c. 不同条件下类器官在不同传代代数下的数量统计(n=3)。

[0078] d. 长期传代(20次传代)后人肠道组织来源类器官代表性图像。

[0079] e. 人肠道组织来源类器官培养超过100d的核型分析。

- [0080] f. 肠道组织来源类器官与传统肠道类器官对各谱系细胞标志物的免疫组织化学和免疫荧光染色。
- [0081] g. 不同条件培养类器官及肠道隐窝组织的单细胞转录组数据的umap可视化。左边，颜色表示无监督集分群。右，颜色表示不同样品来源。
- [0082] h. 柱状图展示不同条件培养类器官及肠道隐窝组织中各细胞类型的比例。
- [0083] i. 不同谱系细胞特征标记物的表达情况。
- [0084] j. 各细胞类型的代表性基因表达叠加展示在g图所示的UMAP上。
- [0085] k. 不同ALK抑制剂下培养的人肠道组织来源类器官的典型形态。在单细胞传代后第10天进行成像。
- [0086] l. 量化不同ALK抑制剂培养类器官的数量(n=3)。
- [0087] 缩写：Con.：传统肠道类器官培养条件；4C：新型肠道类器官培养条件。
- [0088] ***P<0.001；**P<0.01；*P<0.05。标尺100 μm。
- [0089] 图2建立结直肠肿瘤组织来源类器官
- [0090] a. 不同条件下培养的人结直肠肿瘤组织来源类器官的典型形态。在单细胞传代后第10天进行成像。
- [0091] b. 量化不同条件下肿瘤类器官的数量和大小(n=4)。
- [0092] c. 不同条件下肿瘤类器官在不同传代代数下的数量统计(n=3)。
- [0093] d. 长期传代(20次传代)后人结直肠肿瘤组织来源类器官代表性图像。
- [0094] e. 结直肠肿瘤组织来源类器官肾包囊移植及相应结直肠肿瘤患者原发肿瘤切片的免疫组织化学和免疫荧光染色。
- [0095] f. GSEA分析显示结直肠肿瘤组织来源类器官中癌症相关基因标记的富集，人肠道组织来源类器官作为对照。
- [0096] g. 热图显示不同患者的结直肠肿瘤组织来源类器官，对最近报道的肿瘤特异性基因的富集情况。患者编号显示在右侧。
- [0097] h. 肠道组织来源类器官和结直肠肿瘤组织来源类器官对整体基因表达谱进行无监督分层聚类分析。
- [0098] i. 肠道组织来源类器官和结直肠肿瘤组织来源类器官表达谱的PCA分析。

- [0099] j. 三名结直肠肿瘤患者(P12, P16, P17)的点突变类型在结直肠肿瘤组织来源类器官与原位肿瘤中所占比例的柱状统计图。
- [0100] k. 单核苷酸突变(SNVs)热图, 显示结直肠肿瘤组织来源类器官和原位肿瘤中患者特异性的突变基因。
- [0101] 缩写: Con.: 传统肠道类器官培养条件; 4C: 新型肠道类器官培养条件; CRC tumor: 体内结直肠肿瘤组织。
- [0102] *** $P < 0.001$; ** $P < 0.01$; * $P < 0.05$ 。标尺100 μm 。
- [0103] 图3结直肠肿瘤组织来源类器官上皮细胞异质性与原位肿瘤相似
- [0104] a. 来自2名患者(P19和P18)的肿瘤类器官及原位肿瘤细胞(共20223个细胞)单细胞转录组数据的umap可视化。左边, 表示无监督集群。右, 表示细胞来源。
- [0105] b. 柱状图展示2例患者(P19和P18)的肿瘤类器官及原位肿瘤中各细胞类型的比例。
- [0106] c. 各细胞类型的代表性基因表达叠加展示在a图所示的UMAP上。
- [0107] d. 不同谱系细胞特征标记物的表达情况。
- [0108] e. 热图显示不同条件培养的肿瘤类器官与原位肿瘤的大规模CNVs。每组细胞共鉴定出8个簇。
- [0109] 缩写: Con.: 传统肠道类器官培养条件; 4C: 本发明的肠道类器官培养条件; tumor: 体内结直肠肿瘤组织。
- [0110] *** $P < 0.001$; ** $P < 0.01$; * $P < 0.05$ 。标尺100 μm 。
- [0111] 图4新型人肿瘤类器官维持中间可塑性状态及长期药物反应能力
- [0112] a. 63例结直肠肿瘤患者上皮细胞(共49155个细胞)单细胞转录组数据的umap可视化, 由10个无监督聚类获得的簇着色。
- [0113] b. 泛癌上皮-间充质可塑性标志基因表达情况叠加在b图所示的UMAP上。
- [0114] c. 不同条件培养的肿瘤类器官(共12, 718个细胞)的单细胞转录组数据umap可视化。
- [0115] d. 细胞分群7标志基因表达情况叠加在d图所示的UMAP上。
- [0116] e. 左图, UMAP可视化展示通过标签转移获得的肿瘤类器官分群情况(共12, 718个细胞)。右, 柱状图显示每种细胞分群的比例。

- [0117] f. 小提琴图显示传统肿瘤类器官和结直肠肿瘤组织来源类器官中泛癌上皮-间充质可塑性标志基因的表达情况。
- [0118] g. 通过标签转移获得的肿瘤类器官中不同细胞群对细胞分群7标志基因的表达热图。
- [0119] h. 结直肠肿瘤组织来源类器官与传统肿瘤类器官中IPS代表基因表达情况 (n=2)。
- [0120] i. 不同条件及不同传代数下肿瘤类器官在放疗或FOLFOXIRI治疗下的相应曲线。在细胞接种后第2天对细胞进行放疗或FOLFOXIRI处理，在处理后第9天测量细胞活力。
- [0121] 缩写：Con.：传统肠道类器官培养条件；4C：本发明的肠道类器官培养条件。
- [0122] *** $P < 0.001$ ；** $P < 0.01$ ；* $P < 0.05$ 。
- [0123] 图5 WS6通过增强“中间可塑性状态”使结直肠肿瘤组织来源类器官获得上皮-间充质可塑性并增加转移潜力
- [0124] a. 在指定条件下培养的结直肠肿瘤组织来源类器官的代表图像和EPCAM的免疫荧光染色。
- [0125] b. 不同处理条件下结直肠肿瘤组织来源类器官中3种典型形态特征的一类器官数量定量 (n=4)。
- [0126] c. 不同处理条件下结直肠肿瘤组织来源类器官中上皮-间充质转变标记基因表达的QPCR分析。
- [0127] d. 基因集变异分析 (GSVA) 结果，(左) 热图与(右) 箱线图显示不同处理条件下结直肠肿瘤组织来源类器官中上皮-间充质转变相关基因标记的富集。
- [0128] e. 来自含有和不含WS6的结直肠肿瘤组织来源类器官的上皮细胞 (共15,279个细胞) 单细胞转录谱的UMAP可视化。左为“中间可塑性状态”标记基因的表达叠加。右，通过标记转移获得的细胞类群着色。
- [0129] f. 显示通过标签传输获得的不同处理条件下结直肠肿瘤组织来源类器官中每个c细胞类群比例的堆栈条形图。

- [0130] g. 不经过(左)和经过WS6处理(右)的结直肠肿瘤组织来源类器官原位移植到免疫缺陷小鼠脾脏。取脾脏(上)和生殖系统(右),在移植6周后通过生物荧光成像监测肿瘤生长和转移扩散。
- [0131] h. (左)通过体内成像量化形成的转移瘤数量($n=3$ 只小鼠), (右)通过特定
- [0132] 内脏器官的生物发光成像监测转移灶的平均亮度($n=3$ 只小鼠)。
- [0133] *** $P<0.001$; ** $P<0.01$; * $P<0.05$ 。标尺 $100\mu\text{m}$ 。
- [0134] 图6建立具有增生性肠道隐窝组织特征的组织类器官
- [0135] a. IPS标志基因在不同类型类器官中的表达热图($n=3$)。
- [0136] b. 基因集变异分析(GSVA)结果,热图(左)和箱线图(右)显示不同条件中上皮-间充质可塑性标志基因的富集。
- [0137] c. 来自不同类型类器官和肿瘤类器官的上皮细胞(共24279个细胞)的单细胞转录谱数据的umap可视化。左,展示细胞类型。右,由标记转移获得的细胞分群着色。
- [0138] d. 柱状图显示不同条件下类器官通过标签转移获得的各细胞分群比例。
- [0139] e. 不同条件培养的组织类器官在早期(上)和晚期(下)的代表性图像。传代早期类器官最多培养1-2周,传代晚期类器官至少培养2个月。
- [0140] f. 统计不同条件培养的组织类器官中隐窝样出芽结构域的数量($n=6$)。
- [0141] g. 热图显示不同条件培养的组织类器官中结直肠肿瘤特异性标记基因的表达($n=3$),以结肠炎相关癌症样品作为对照。
- [0142] h. QPCR检测不同条件及不同培养代数下各细胞谱系标记基因表达情况。
- [0143] 缩写: Con.: 传统肠道类器官培养条件; 4C/5C: 本发明的肠道类器官培养条件。
- [0144] *** $P<0.001$; ** $P<0.01$; * $P<0.05$ 。标尺 $100\mu\text{m}$ 。

具体实施方式

- [0145] 为使本发明的目的、技术方案和优点更加清楚明白,以下结合具体实施例,并参照附图,对本发明作进一步的详细说明。
- [0146] 定义

- [0147] 如本文所用的术语“肠道类器官”是指分离人肠道隐窝组织，通过三维培养使细胞在受控的空间内高密度地积聚而自组织成的立体的细胞组织体。在本发明中，所述“肠道类器官”包括下文所述的来自分离的人肠道隐窝组织的通过本发明的4C培养体系获得的“肠道组织来源类器官”和下文所述的来自分离的人肠道隐窝组织的通过现有技术已公开方法获得的“传统肠道类器官”。
- [0148] 如本文所用的术语“肠道组织来源类器官”是指分离人肠道的隐窝组织，并使用本发明所述的LDN214117，EGF，CHIR99021，FGF2条件(即，4C条件)培养获得的类器官。其特点为形态上具有一定隐窝-出芽结构产生，同时具有非常强的扩增能力与成克隆能力，显著富集了上皮细胞异质性，如杯状细胞谱系基因的启动，具有与体内肠道隐窝更加相似的谱系组成，相比于传统肠道类器官，其表达或显著高水平表达原位肠道组织的干性及分化功能细胞标志基因LGR5、OLFM4、CHGA、CHGB、MUC2、AQP8、LYPD8中的一种或多种。
- [0149] 如本文所用的术语“传统肠道类器官”是指分离人肠道的隐窝组织，并使用已发表的传统条件(具体请参见“实验材料和操作方法”部分)培养获得的类器官。其特点为形态上呈圆球状，几乎无任何隐窝-出芽结构产生，同时也基本只能扩增干祖细胞，缺少各种分化谱系细胞。
- [0150] 如本文所用的术语“肿瘤类器官”是指使用结直肠肿瘤细胞培养而成的类器官。在本发明中，所述“肿瘤类器官”包括下文所述的来自人结直肠肿瘤组织的通过本发明的4C培养体系获得的“结直肠肿瘤组织来源类器官”和下文所述的来自人结直肠肿瘤组织的通过现有技术已公开方法获得的“传统肿瘤类器官”。
- [0151] 如本文所用的术语“传统肿瘤类器官”是指分离人结直肠肿瘤组织，并使用已发表的传统条件(具体请参见“实验材料和操作方法”部分)培养获得的类器官。
- [0152] 如本文所用的术语“结直肠肿瘤组织来源类器官”是指分离人结直肠肿瘤组织，并使用本发明的4C条件(例如，LDN214117，EGF，CHIR99021，FGF2)培养获得的类器官。其特点为具有非常强的扩增能力与成克隆能力，同时具有与原位肿瘤组织相似的上皮细胞异质性，相比于传统肿瘤类器官，其表达或显著高水

平表达多谱系细胞标志基因LGR5、OLFM4、CHGA、CHGB、MUC2、AQP8、LYPD8中的一种或多种，并能够捕获和长期维持中间可塑性状态，获得长期药物反应能力。

[0153] 如本文所用的术语“具有增生性肠道隐窝组织特征的一类器官”是指指分离人肠道的隐窝组织，并使用本发明的5C条件(例如，LDN214117，EGF，CHIR99021，WS6，SB202190)培养获得的一类器官。其特点为中央囊腔显示出明显的收缩迹象，同时新生的隐窝样出芽结构显著增加，类似增生性息肉组织的表型。相比于传统条件下培养获得的一类器官，其显著下调部分分化谱系基因，如CHGA、CHGB、MUC2、AQP8、LYPD8等；并且具有增生性肠道隐窝组织特征的一类器官中IPS特征基因、肿瘤特异基因等有显著提升。具有增生性肠道隐窝组织特征的一类器官为研究多种人体肠道疾病、以及结直肠肿瘤的起始发生提供了理想体外模型。

[0154] 如本文所用的术语“中间可塑性状态”是指在结直肠病人肿瘤进展过程中出现，具有高度可塑性的状态。其特点是富集了多种不同程序，如营养外胚层细胞、胶质细胞和星形胶质细胞等，具有高度混合的转录程序，同时相比于在传统条件下培养获得的一类器官或细胞，其也显著提高了先前报道的泛癌上皮-间充质可塑性标志基因(参见，David P. Cook 等，“Transcriptional census of epithelial-mesenchymal plasticity in cancer”，2022)，并显著高水平表达标志物DPP4，EMP1，ITGA2，ANXA1中的一种或多种。此外，在肿瘤的发生发展、恶性程度及抗放化疗治疗中均发挥重要作用。

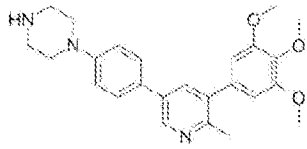
[0155] 如本文所用的术语“增生性肠道隐窝组织”是由于肠道粘膜长期受外界刺激，如炎症、感染等，出现的异常增生，其表现为黏膜的肥厚增生，隐窝结构的异常增多，增长，并且有可能进一步发展成腺瘤或者癌。

[0156] 如本文所用的术语“基质胶”，也称为细胞外基质(ECM)，由多种多糖、水、弹性蛋白和糖蛋白组成。本发明方法中使用的ECM由Matrigel™(BD Biosciences)提供，其包含层粘连蛋白、巢蛋白和胶原蛋白IV。

[0157] 组合物

[0158] (1)ALK抑制剂

[0159] 这类抑制剂与ALK受体结合，并阻止细胞因子与相对应受体的结合。



[0160] 优选的ALK抑制剂包括LDN214117，其浓度可以使用常规浓度，例如为0.2 μ M–20 μ M，优选地1 μ M–4 μ M，最优选地为2 μ M。其结构式如下：

[0161] 在本文公开的方法中也可使用其他的ALK抑制剂，它们均是本领域已知的并且是市售可获得的，包括但不限于：LDN193189，LDN214117，LDN212854，ML347，K02288。

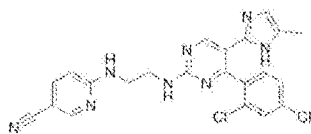
[0162] (2) EGF激动剂

[0163] 优选的EGF激动剂包括EGF，其浓度可以使用常规浓度，例如为10ng/ml–250ng/ml，优选地25ng/ml–100ng/ml，最优选地为50ng/ml。

[0164] 在本文公开的方法中也可使用其他的EGF激动剂，它们均是本领域已知的并且是市售可获得的，包括但不限于：EGF，HB-EGF，AREG，EREG，NRG1，NRG2，NRG3，NRG4。

[0165] (3) WNT激动剂

[0166] WNT激动剂可用于激活细胞中TCF/LEF介导的转录。



[0167] 优选地WNT激动剂包括CHIR-99021，其浓度可以使用常规浓度，例如为0.3 μ M–30 μ M，优选地1.5 μ M–6 μ M，最优选地为3 μ M。其结构式如下：

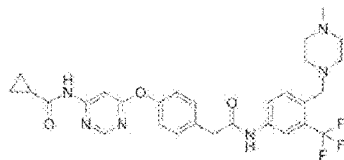
[0168] 在本文公开的方法中也可使用其他的WNT激动剂，它们均是本领域已知的并且是市售可获得的，包括但不限于：CHIR-99021，CHIR-98014，CHIR-98023，CHIR-98024，GSK3 β inhibitor XV，TD114-2，BIO-acetoxim

[0169] (4) FGF激动剂

[0170] 优选的FGF激动剂包括FGF2，其浓度可以使用常规浓度，例如为10ng/ml-1000ng/ml，优选地50ng/ml-200ng/ml，最优选地为100ng/ml。

[0171] 在本文公开的方法中也可使用其他的FGF激动剂，它们均是本领域已知的并且是市售可获得的，包括但不限于：FGF1，FGF2，FGF3，FGF4，FGF5，FGF6，FGF7，FGF8，FGF9，FGF10，FGF11，FGF12，FGF13，FGF14，FGF15，FGF16，FGF17，FGF18，FGF19，FGF20，FGF21，FGF23。

[0172] (5)EBP1及I κ B双重调节剂

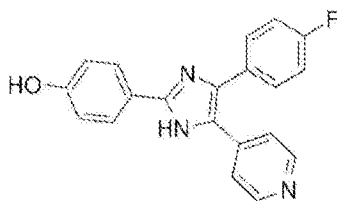


[0173] 优选的EBP1及I κ B双重调节剂包括WS6，其浓度可以使用常规浓度，例如为0.05 μ M-5 μ M，优选地0.25 μ M-1 μ M，最优选地为0.5 μ M。其结构式如下：

[0174] 在本文公开的方法中也可使用其他的EBP1及I κ B双重调节剂，它们均是本领域已知的并且是市售可获得的，包括但不限于：WS3，(+)-Usnic acid，Pim-1/2 kinase inhibitor 1，RMC-5552，Sauchinone，PS-1145。

[0175] (6)p38抑制剂

[0176] 优选的p38抑制剂包括SB202190，其浓度可以使用常规浓度，例如为1 μ M-100 μ M，优选地5 μ M-20 μ M，最优选地为10 μ M。其结构式如下：



[0177] 在本文公开的方法中也可使用其他的p38抑制剂，它们均是本领域已知的并且是市售可获得的，包括但不限于：Pexmetinib，SB203580，BIRB796，LY2228820，VX-702，PH-797804，VX-745，TAK-715，BMS-582949。

[0178] 具体实施方式

[0179] 实施例1建立人肠道组织来源类器官

[0180] 通过大规模筛选与组合，我们建立了一种新的人肠道组织来源类器官培养条件，其是在基础培养基中添加4个组分(4C；包括ALK抑制剂例如LDN214117、EGF激动剂例如EGF、WNT激动剂例如CHIR-99021、FGF激动剂例如FGF2)。相比传统条件培养类器官，4C条件下培养的人类结肠类器官显示出显著更强的生长速率与类器官形成能力(图1，a-c)。于此同时，人肠道组织来源类器官可以在4C条件下扩增超过20个代，并且维持了基因组稳定性(图1，d，e)。

[0181] 接下来，我们对肠道组织来源类器官进行免疫荧光染色，鉴定其中各细胞谱系表达与分布特征。通过免疫荧光染色，我们观察到了多种谱系细胞的标志物，包括OLFM4代表的肠道干细胞，CHGA代表的肠内分泌细胞，MUC2代表的杯状细胞和APOA1代表的肠上皮细胞，均存在于肠道组织来源类器官中，而在传统肠道类器官中缺失，这与以往的文献报道相一致(图1，f)。

[0182] 更进一步，我们通过单细胞转录谱(scRNA-seq)分析肠道组织来源类器官中的细胞谱系组成，并与传统肠道类器官和原位肠道隐窝组织进行比较。为了确认细胞异质性的长期维持情况，不同类型的类器官至少培养了2个月。我们使用已发表的人结直肠各谱系细胞的标记基因对类器官和原位肠道隐窝组织进行无监督聚类分析，得到不同细胞谱系的聚类图(图1，g，h)。值得注意的是，尽管存在不可避免的个体差异，我们发现肠道组织来源类器官与传统肠道类器官相比，分化细胞类型的丰富程度显著增加(图1，g，h)。重要的是，肠道组织来源类器官的谱系组成相比传统肠道类器官，更类似于原位肠道隐窝组织(图1，g，h)。每个细胞类群都表现出不同的基因表达模式，这些模式与人结直肠中相应的谱系一致(图1，i，j)。总的来说，这些结果表明肠道组织来源类器官可以捕获并维持与原位肠道隐窝组织相当的细胞谱系组成。

[0183] 同时，我们测试了不同ALK抑制剂，均能成功构建肠道类器官，仅扩增速率略有差异，其中LDN-214117最优(图1，k，l)。

[0184] 实施例2建立人结直肠肿瘤组织来源类器官

[0185] 我们将4C条件用于培养人结直肠肿瘤组织，有意思的是，尽管存在不可避免的个体差异，但与传统条件下培养的人结直肠肿瘤类器官(传统肿瘤类器官)相

比,在该条件下培养的人结直肠肿瘤类器官(结直肠肿瘤组织来源类器官)始终显示出更大的尺寸与更高的形成效率,以及更强大的长期扩张能力(图2, a-c)。于此同时,人结直肠肿瘤组织来源类器官可以在该条件下扩增超过20个代,并维持典型形态及扩增能力(图2, d)。

[0186] 接下来,我们以原位肿瘤组织作为对照,鉴定结直肠肿瘤组织来源类器官的特征。在免疫缺陷小鼠肾囊下异种移植结直肠肿瘤组织来源类器官后,我们在体内重建了人结直肠肿瘤组织。组织病理学特征分析显示,结直肠肿瘤组织来源类器官来源的异种移植物与相对应患者原位肿瘤组织具有相似的结构及肿瘤标记物染色分布,包括Ki-67、CK20、OLMF4和 β -catenin(图2, e)。为了进一步研究结直肠肿瘤组织来源类器官的分子特征,我们进行了整体转录谱测序(RNA-seq)分析,并与肠道组织来源类器官进行比较。基因集富集分析进一步证实了结直肠肿瘤组织来源类器官富集了肿瘤相关特征基因群(图2, f)。我们采用最近报道的人结直肠肿瘤特征基因集,发现其在结直肠肿瘤组织来源类器官中也高度富集(图2, g)。此外,整体转录谱的降维分析显示,来自结直肠肿瘤组织的结直肠肿瘤组织来源类器官与来自肠道组织的肠道组织来源类器官具有截然不同的性质(图2, h, i)。总的来说,这些数据表明结直肠肿瘤组织来源类器官的基因表达与结直肠肿瘤更加相似。

[0187] 为了确定结直肠肿瘤组织来源类器官的基因组特征,我们进行了全外显子组测序(WES),并比较了结直肠肿瘤组织来源类器官和相对应原位肿瘤组织的基因突变。我们发现,结直肠肿瘤组织来源类器官表现出与配对原位肿瘤非常相似的点突变模式(图2, j)。基因突变变异的热图显示,每个患者特征性的突变基因也在结直肠肿瘤组织来源类器官中得到重现(图2, k)。总的来说,这些结果表明结直肠肿瘤组织来源类器官可以忠实地反应原发肿瘤的组织病理学和基因组特征。

[0188] 接下来,我们进行了单细胞转录谱(scRNA-seq)分析,以进一步研究结直肠肿瘤组织来源类器官中的细胞谱系组成,并与传统肿瘤类器官和原位肿瘤组织进行比较。为了确认细胞异质性的长期维持情况,不同类型的肿瘤类器官至少培养了2个月。我们使用已发表的人结直肠各谱系细胞的标记基因对肿瘤类器官和

原位肿瘤组织进行无监督聚类分析，得到不同细胞谱系的聚类图(图3, a)。值得注意的是，尽管存在不可避免的个体差异，我们发现结直肠肿瘤组织来源类器官与传统肿瘤类器官相比，分化细胞类型的丰富程度显著增加(图3, b)。例如，以OLFM4为标记基因的干细胞类群，以CHGA、CHGB为标记基因的肠内分泌细胞、以MUC2为标记基因的杯状细胞，以及以AQP8、LYPD8为标记基因的肠上皮细胞等，在结直肠肿瘤组织来源类器官中有显著提升。重要的是，结直肠肿瘤组织来源类器官的谱系组成相比传统肿瘤类器官，更类似于原位肿瘤上皮细胞(图3, b)。每个细胞类群都表现出不同的基因表达模式，这些模式与人体内组织相应的谱系一致(图3, c, d)。总的来说，这些结果表明结直肠肿瘤组织来源类器官可以捕获并维持与原位肿瘤相当的上皮异质性。

[0189] 考虑到4C条件可以同时支持正常类器官与肿瘤类器官的培养和扩张，我们对培养的肿瘤类器官中肿瘤纯度进行了估计，以排除结直肠肿瘤组织来源类器官中正常组织污染的可能性。基于单细胞转录谱测序数据，我们通过inferCNV分析体细胞拷贝数改变(CNAs)来识别肿瘤细胞。该分析可以有效地将具有CNAs的恶性细胞与具有正常核型的非恶性细胞分开。我们发现结直肠肿瘤组织来源类器官大量保留了相应原位肿瘤的DNA拷贝数的损失和增加(图3, e)。根据恶性细胞比例计算肿瘤纯度，我们发现原位肿瘤、传统肿瘤类器官和结直肠肿瘤组织来源类器官中恶性细胞的比例分别为87%、90%和94.2%(图3, e)，这表明结直肠肿瘤组织来源类器官具有高纯度的肿瘤细胞。总的来说，这些结果表明结直肠肿瘤组织来源类器官在上皮异质性、肿瘤纯度等方面与原位肿瘤相似。

[0190] 实施例3结直肠肿瘤组织来源类器官维持“中间可塑性状态”及其长期药物反应能力的评估

[0191] 为了探索结直肠肿瘤组织来源类器官能否捕获原位肿瘤组织的特征，我们首先在单细胞水平上分析了人类结直肠肿瘤的转录谱特征。我们重新分析了最近公开的单细胞转录谱数据集，该数据集由来自63名结直肠肿瘤患者的49155个上皮细胞组成，无监督聚类显示了10个不同的细胞分群(图4, a)。通过对不同细胞分群和程序的比较，我们发现细胞分群7富集了先前报道的泛癌上皮-间充质可塑性标志基因(图4b)，表明细胞分群7是一种中间塑性状态，这种状态积极参与

并可能促进显著的表型转变，包括细胞谱系转换、上皮-间质转变和癌胚重编程过程。因此，我们将这些细胞的状态定义为中间可塑性状态(IPS)。

[0192] 接下来，我们研究结直肠肿瘤组织来源类器官能否捕获具有IPS特征的细胞群。我们使用至少培养了2个月的结直肠肿瘤组织来源类器官和传统肿瘤类器官，进行单细胞转录谱分析。并使用标签转移来注释肿瘤类器官中的细胞分群情况，我们观察到细胞分群7特征基因仅在结直肠肿瘤组织来源类器官中富集(图4c, d)。与这一结果一致，我们发现结直肠肿瘤组织来源类器官中IPS细胞的占比显著增加，泛癌上皮-间充质可塑性标志基因显著提升，而这群细胞在传统肿瘤类器官中并不存在(图4e, f)。为了比较结直肠肿瘤组织来源类器官和原位肿瘤组织中捕获的IPS的特征，我们整合了不同类型的测序数据。值得注意的是，结直肠肿瘤组织来源类器官中IPS细胞的转录组谱与原位肿瘤组织中高度相似(图4g)。我们进一步验证了IPS代表性基因DPP4、ITGA2、ANXA1和EMP3在结直肠肿瘤组织来源类器官中显著上调(图4h)。总的来说，这些数据表明结直肠肿瘤组织来源类器官可以通过维持具有IPS特征的细胞群，并进一步反映人结直肠肿瘤的表型可塑性。

[0193] 为了进一步探索结直肠肿瘤组织来源类器官的功能，我们检测了结直肠肿瘤组织来源类器官对放化疗药物的反应，并与传统肿瘤类器官进行比较。这些肿瘤来源于一名未接受任何辅助治疗的AJCC III期中分化腺癌患者，并在不同条件下培养。我们采用一线化疗药物FOLFOXIRI 检测肿瘤类器官的药物反应。细胞活力用细胞计数试剂盒-8(CCK-8)测定，并绘制肿瘤类器官对治疗的剂量-反应曲线。我们分别检测了肿瘤类器官在早期传代(从肿瘤组织培养)和晚期传代(培养至少2个月)时的治疗响应。我们发现，在早期传代时期，结直肠肿瘤组织来源类器官和传统肿瘤类器官，具有相似的对辐照和FOLFOXIRI的响应，结直肠肿瘤组织来源类器官细胞活力略有增加(图4, i)。值得注意的是，与结直肠肿瘤组织来源类器官相比，传统肿瘤类器官在长期传代后，对辐照和化疗药物的抵抗能力显著下降(图4, i)。而结直肠肿瘤组织来源类器官在传代晚期对辐照和FOLFOXIRI的抗性得到进一步增强(图4, i)。这些结果表明，结直肠肿瘤组织来

源类器官作为一种稳定的表型，可以长期维持肿瘤的耐药性，而传统肿瘤类器官缺乏耐药肿瘤细胞的维持和扩增。

[0194] 实施例4发现通过增强“中间可塑性状态”使结直肠肿瘤组织来源类器官获得上皮-间充质可塑性并增加转移潜力的小分子

[0195] 通过小分子筛选，我们发现WS6，一种EBP1及I κ B双重调节剂，能够显著诱导结直肠肿瘤组织来源类器官提升上皮-间充质样转变，表现为肿瘤细胞大量呈现间充质样的梭形形态(图5a, b)。此外，免疫荧光分析显示WS6处理的结直肠肿瘤组织来源类器官失去了顶端-基底极性，并表现出细胞-细胞粘附性降低(图5a, b)。qPCR分析进一步显示，经过WS6处理的结直肠肿瘤组织来源类器官，多种上皮-间充质样转变相关的标记基因表达显著升高，包括VIM、LGALS1、TNC和HTRA1(图5c)。基因集变异分析(GSVA)显示，11个已被报道的上皮-间充质样转变相关基因集中有10个在WS6处理后显著提升(图5d)。这些结果表明，WS6的加入可显著诱导结直肠肿瘤组织来源类器官发生上皮-间充质样转变。

[0196] 通过注释标签转移来分析加入WS6处理与否的结直肠肿瘤组织来源类器官的单细胞转录谱数据，我们发现WS6的添加将“中间可塑性状态”细胞的比例大约从6%增加到14%(图5e, f)。

[0197] 我们从一名没有转移的AJCC II期结直肠肿瘤患者中分离其肿瘤组织并培养成类器官，分别给与或不给与WS6处理，并使用小鼠体内异种移植体系验证WS6是否能够提升结直肠肿瘤组织来源类器官的转移潜力。我们将经过或不经WS6处理的结直肠肿瘤组织来源类器官植入免疫缺陷小鼠的脾脏，发现只有经过WS6处理的结直肠肿瘤组织来源类器官在腹腔和盆腔中引起转移(图5, g, h)。此外，经过WS6处理的结直肠肿瘤组织来源类器官在小鼠腹腔中形成的转移瘤数量和转移瘤的平均亮度显著增加(图5, g, h)。总的来说，这些数据表明WS6处理增加了结直肠肿瘤组织来源类器官的转移潜力。

[0198] 实施例5发现启动“中间可塑性状态”的小分子组合

[0199] IPS在结直肠肿瘤组织来源类器官中的捕获促使我们研究在肠道上皮细胞中诱导IPS程序能否触发相似的表型转变。有趣的是，我们没有在正常结肠隐窝来源的肠道组织来源类器官中观察到IPS细胞的富集。通过大规模小分子筛

选与优化，我们建立了一种新的小分子组合，其是在基础培养基中添加5个组分(5C；包括ALK抑制剂例如LDN214117、EGF激动剂例如EGF、WNT激动剂例如CHIR-99021、EBP1及I κ B双重调节剂例如WS6和p38抑制剂例如SB202190)，能够显著启动“中间可塑性状态”的表达。通过将分离的人肠道隐窝组合或者将实施例1中获得的人肠道组织来源类器官或增生性肠道隐窝组织在新的5C条件下培养，IPS特征基因相比肠道组织来源类器官及传统肠道类器官明显更加富集(图6a)，同时多个上皮-间充质可塑性标志基因显著提升(图6b)。与此结果一致，我们进行了单细胞转录谱分析，发现与肠道组织来源类器官和传统条件培养的一类器官相比，具有增生性肠道隐窝组织特征的一类器官中IPS细胞的比例显著增加(图6c, d)。总之，我们建立了新的小分子组合，能够在肠道上皮细胞中显著诱导IPS程序的表达。

[0200] 实施例6建立具有增生性肠道隐窝组织特征的人肠道类器官

[0201] 有趣的是，与肠道组织来源类器官相比，在5C条件下培养的人肠道组织类器官，中央囊腔显示出明显的收缩迹象(图6e)。相对应，其新生的隐窝样出芽结构的显著增加(图6f)。同时，多种分化功能谱系基因（例如CHGA、CHGB、MUC2、AQP8、LYPD8）有显著降低(图6h)，这与在增生性息肉组织中观察到的表型相似，我们将之定义为具有增生性肠道隐窝组织特征的人肠道类器官。重要的是，具有增生性肠道隐窝组织特征的一类器官可以作为一种稳定表型长期扩展(图6e, f, h)。这表明5C条件诱导得到的增生性肠道隐窝特征并非类器官的短暂应激反应，而是一种稳定的状态转变，模拟了体内肿瘤发生过程早期，正常肠道隐窝组织经历的增生阶段。因此，使用5C条件直接培养增生性人肠道隐窝组织，也能很好维持起增殖性肠道隐窝组织的特征。并且我们发现，与肠道组织来源类器官和传统条件下培养的一类器官相比，近期报道的结直肠癌特征基因在具有增生性肠道隐窝组织特征的一类器官中表达显著增强，尽管其程度仍低于在结肠炎相关癌症组织(图6g)。总的来说，我们建立了一个高效稳定的化学重编程系统，在肠道上皮细胞中诱导IPS程序，并进一步培养出具有增生性肠道隐窝组织特征的一类器官，其主要用于研究多种疾病模型，包括健康肠道→增生肠道→肿瘤的转变过程，为治疗肿瘤提供新的理论指导或潜在靶点。

权利要求书

- [权利要求 1] 一种组合物，其特征在于，包括(1)ALK抑制剂，(2)WNT激动剂，(3)EGF激动剂和(4)FGF激动剂，优选地所述组合物用于获得和/或培养人肠道组织来源类器官或人结直肠肿瘤组织来源类器官。
- [权利要求 2] 根据权利要求1所述的组合物，其中，所述(1)ALK抑制剂选自以下各项组成的组中的一种或多种：LDN193189，LDN214117，LDN212854，ML347，K02288；优选为LDN214117。
- [权利要求 3] 根据权利要求1所述的组合物，其中，所述(2)WNT激动剂选自以下各项组成的组中的一种或多种：CHIR-99021，CHIR-98014，CHIR-98023，CHIR-98024，GSK3 β inhibitor XV，TD114-2，BIO-acetoxim；优选为CHIR-99021。
- [权利要求 4] 根据权利要求1所述的组合物，其中，所述(3)EGF激动剂选自以下各项组成的组中的一种或多种：EGF，HB-EGF，AREG，EREG，NRG1，NRG2，NRG3，NRG4；优选为EGF。
- [权利要求 5] 根据权利要求1所述的组合物，其中，所述(4)FGF激动剂选自以下各项组成的组中的一种或多种：FGF1，FGF2，FGF3，FGF4，FGF5，FGF6，FGF7，FGF8，FGF9，FGF10，FGF11，FGF12，FGF13，FGF14，FGF15，FGF16，FGF17，FGF18，FGF19，FGF20，FGF21，FGF23；优选为FGF2。
- [权利要求 6] 根据权利要求1所述的组合物，其还包含(5)EBP1及I κ B双重调节剂；
任选地，所述(5)EBP1及I κ B双重调节剂选自以下各项组成的组中的一种或多种：WS3，WS6，(+)-Usnic acid，Pim-1/2激酶抑制剂1，RMC-5552，Sauchinone，PS-1145；优选为WS6。
- [权利要求 7] 获得和/或培养人肠道组织来源类器官或人结直肠肿瘤组织来源类器官的方法，其特征在于，在培养基中进行培养，优选地在培养基中将正常人肠道隐窝组织或人结直肠肿瘤组织进行培养，其中所述培养基包含权利要求1-6任一项所述的组合物。

- [权利要求 8] 根据权利要求7所述的方法，其中，使用DMEM/F12作为基础培养基；
优选地，所述基础培养基中还添加有HEPES、GlutaMAX、B27、1mM N-Acetylcysteine。
- [权利要求 9] 权利要求7所述的方法获得的人肠道组织来源类器官或人结直肠肿瘤组织来源类器官。
- [权利要求 10] 权利要求9所述的人肠道组织来源类器官或人结直肠肿瘤组织来源类器官，其特征在于，其表达标志基因LGR5、OLFM4、CHGA、CHGB、MUC2、AQP8、LYPD8中的一种或多种。
- [权利要求 11] 权利要求9所述的人结直肠肿瘤组织来源类器官，其包括具有“中间可塑性状态”细胞，所述“中间可塑性状态”细胞提高泛癌上皮-间充质可塑性标志基因，并显著提高标志物DP P4，EMP1，ITGA2，ANXA1中的一种或多种的表达。
- [权利要求 12] 权利要求9所述的人结直肠肿瘤组织来源类器官，其能够长期维持“中间可塑性状态”细胞。
- [权利要求 13] 权利要求9所述的人结直肠肿瘤组织来源类器官，其用于体外研究肿瘤抗治疗能力、转移侵袭等能力，用于筛选高效抑制或杀伤肿瘤细胞的治疗化合物，或用作重建肿瘤发展过程的体外模型。
- [权利要求 14] 组合物，其包括(1)ALK抑制剂，(2)WNT激动剂，(3)EGF激动剂，(4)EBP1及I κ B双重调节剂和(5)p38抑制剂，优选地所述组合物用于获得和/或培养具有增生性肠道隐窝组织特征的一类器官和/或“中间可塑性状态”细胞。
- [权利要求 15] 根据权利要求14所述的组合物，其中，所述(1)ALK抑制剂选自由以下各项组成的组中的一种或多种：LDN193189，LDN214117，LDN212854，ML347，K02288；优选为LDN214117。
- [权利要求 16] 根据权利要求14所述的组合物，其中，所述(2)WNT激动剂选自由以下各项组成的组中的一种或多种：CHIR-99021，C

HIR-98014, CHIR-98023, CHIR-98024, GSK3 β inhibitor XV, TD114-2, BIO-acetoxim; 优选为CHIR-99021。

[权利要求 17] 权利要求14所述的组合物, 其中, 所述(3)EGF激动剂选自以下各项组成的组中的一种或多种: EGF, HB-EGF, AREG, EREG, NRG1, NRG2, NRG3, NRG4; 优选为EGF。

[权利要求 18] 权利要求14所述的组合物, 其中, 所述(4)EBP1及I κ B双重调节剂选自以下各项组成的组中的一种或多种: WS3, WS6, (+)-Usnic acid, Pim-1/2 kinase inhibitor 1, RMC-5552, Sauchinone, PS-1145; 优选为WS6。

[权利要求 19] 权利要求14所述的组合物, 其中, 所述(5)p38抑制剂选自以下各项组成的组中的一种或多种: SB202190, Pexmetinib, SB203580, BIRB796, LY2228820, VX-702, PH-797804, VX-745, TAK-715, BMS-582949; 优选为SB202190。

[权利要求 20] 获得和/或培养人具有增生性肠道隐窝组织特征的肠道类器官和/或“中间可塑性状态”细胞的方法, 其特征在于, 在培养基中进行培养, 优选地在培养基中将人正常肠道隐窝组织或增生性肠道隐窝组织或权利要求9所述的人肠道组织来源类器官进行培养, 其中所述培养基包含权利要求14-19中任一项所述的组合物。

[权利要求 21] 权利要求20所述的方法, 其中, 使用DMEM/F12作为基础培养基; 优选地, 所述基础培养基中还添加有HEPES、GlutaMAX、B27、1mM N-Acetylcysteine。

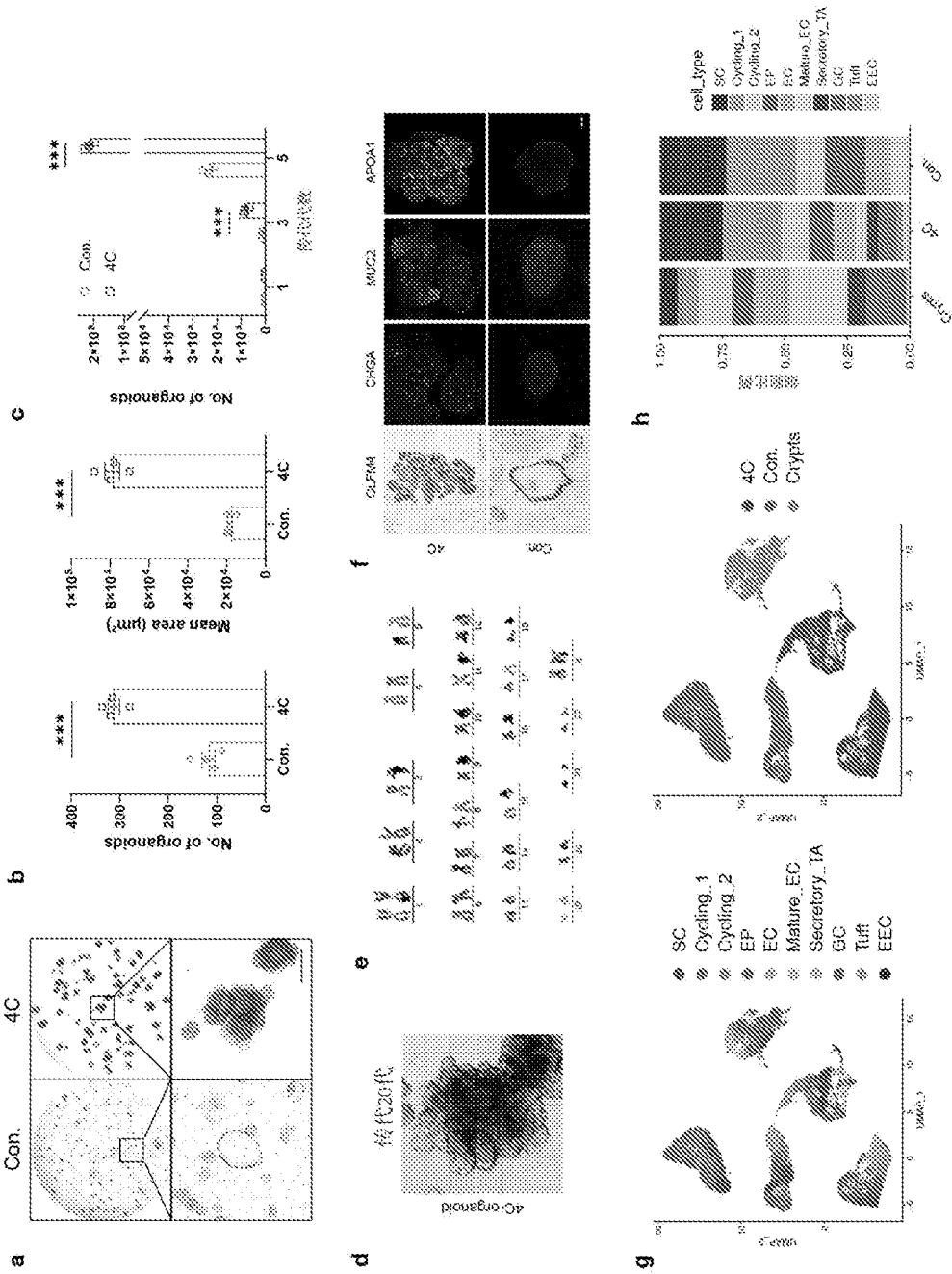
[权利要求 22] 权利要求21所述的方法获得的人具有增生性肠道隐窝组织特征的肠道类器官和/或“中间可塑性状态”细胞。

[权利要求 23] 权利要求22所述的人具有增生性肠道隐窝组织特征的肠道类器官, 其特征在于, 显著下调部分分化谱系基因, 如CHGA、CHGB、MUC2、AQP8、LYPD8中的一种或多种。

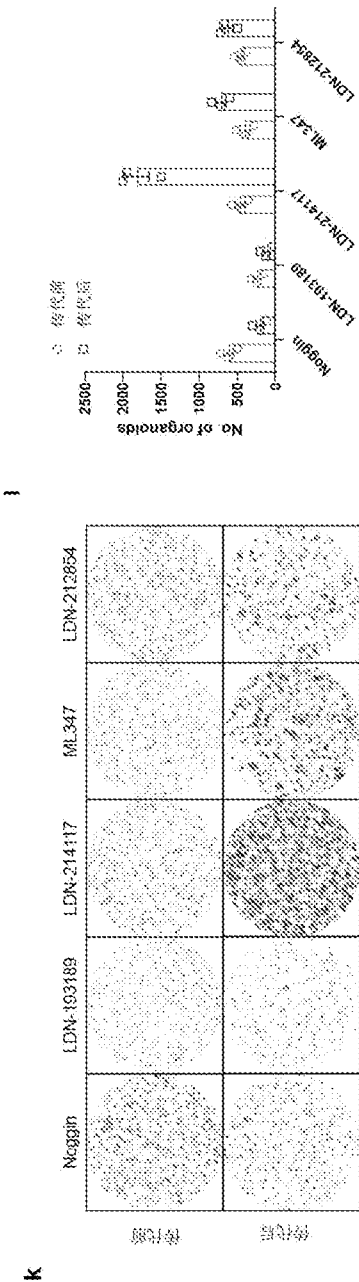
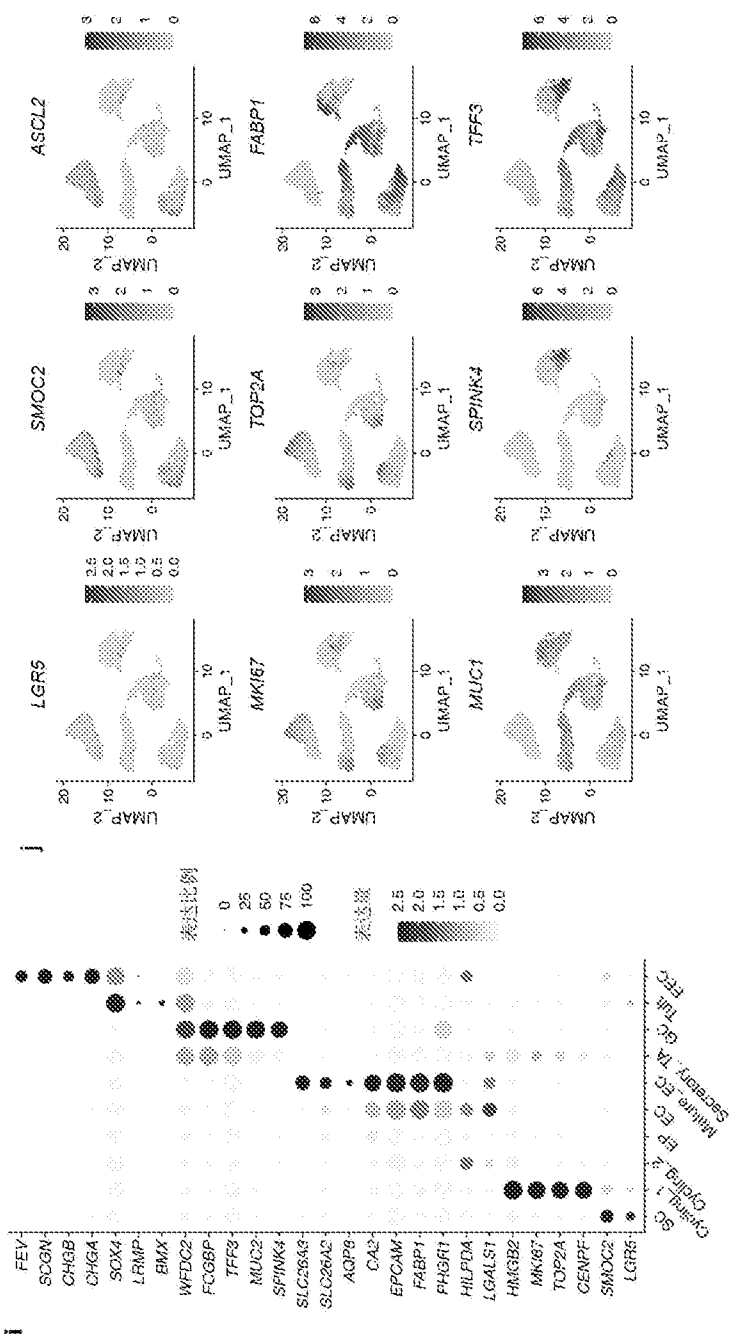
[权利要求 24] 权利要求22所述的人具有增生性肠道隐窝组织特征的肠道类器官, 其特征在于可以长期维持“中间可塑性状态”细胞。

[权利要求 25] 权利要求22所述的人具有增生性肠道隐窝组织特征的肠道类器官，其用于体外研究肿瘤起始发生，用于筛选高效抑制或杀伤肿瘤细胞的治疗化合物，或用作研究肿瘤发生的体外模型。

[图 1]

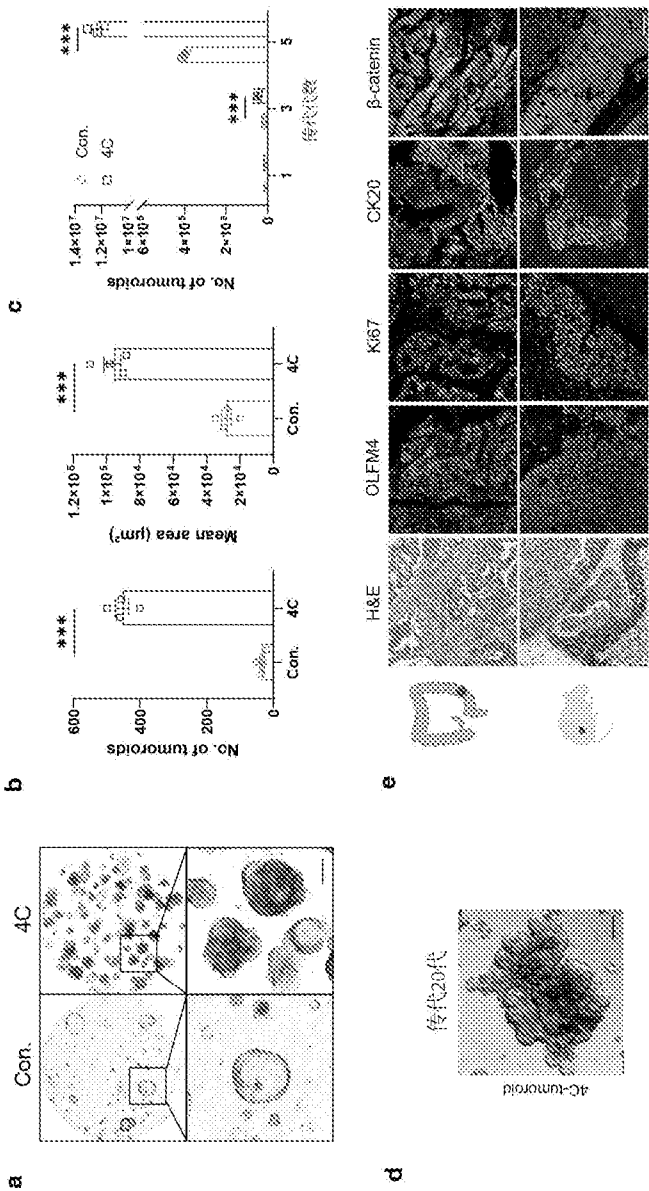


[图 1(续)]



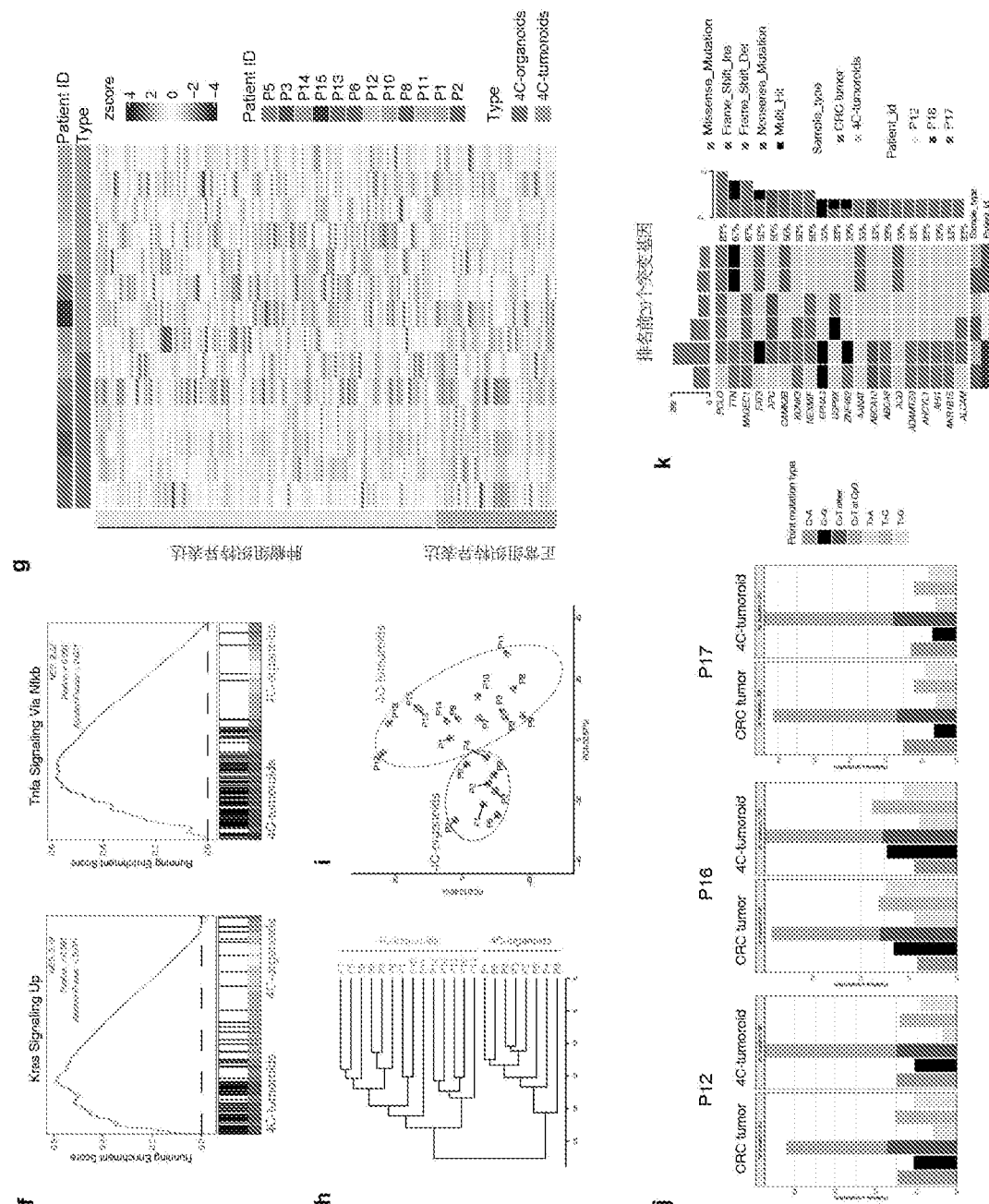
细则 26,
24. 04. 2023

[图 2]

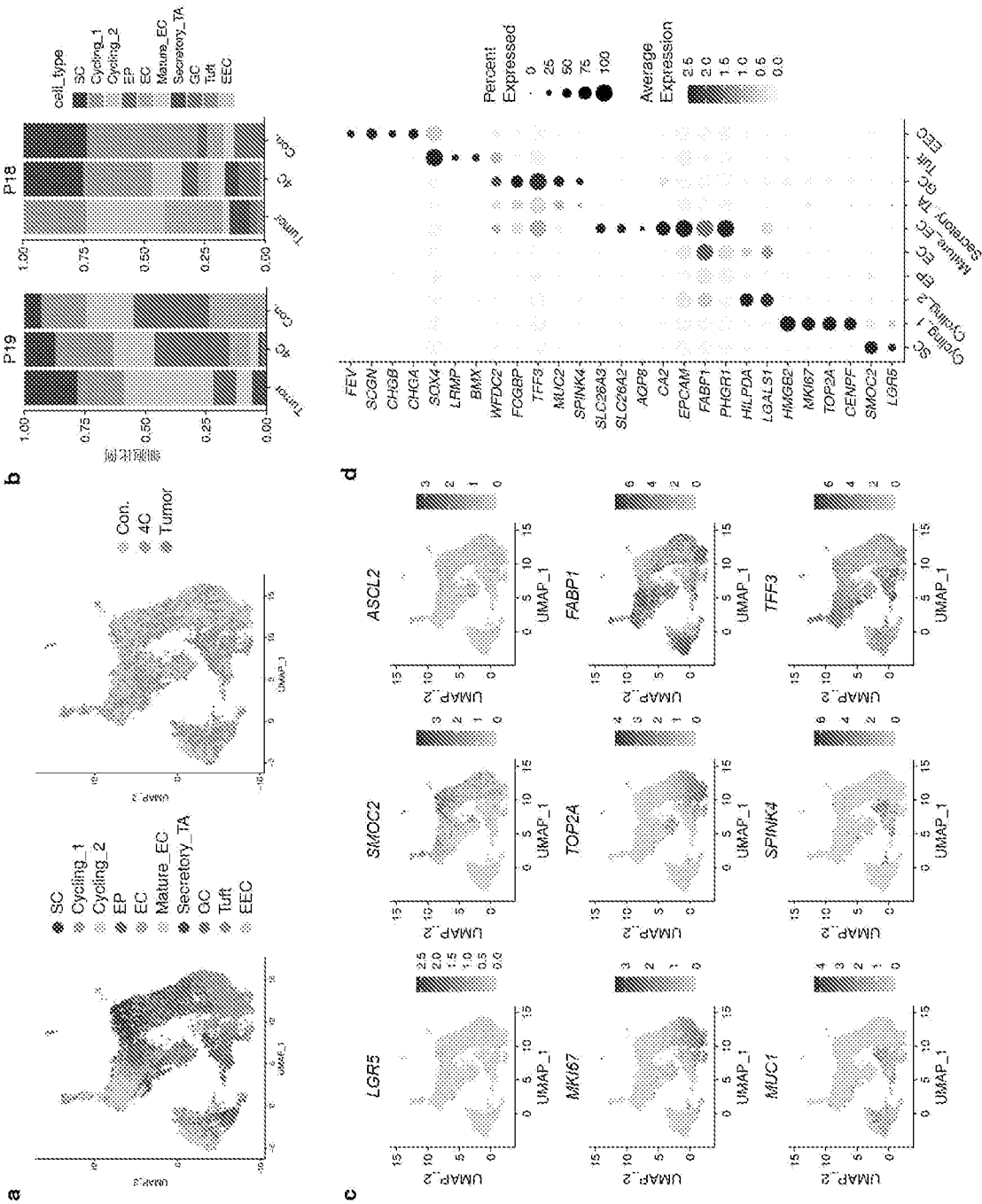


[图 2(续)]

细则 26,
24. 04. 2023

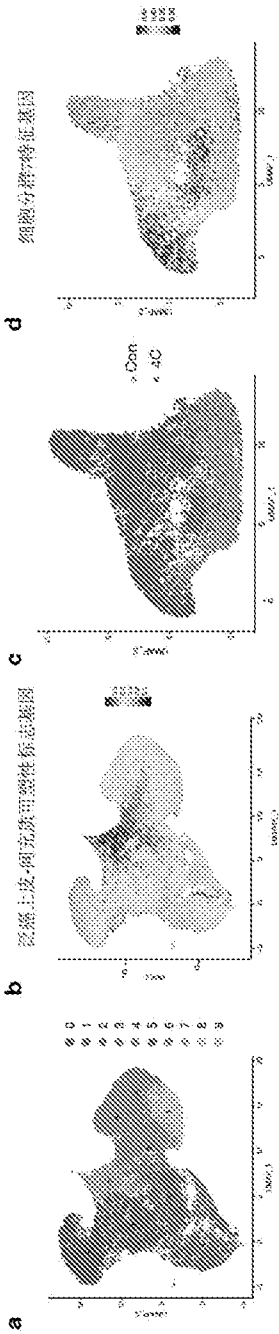


[图 3]

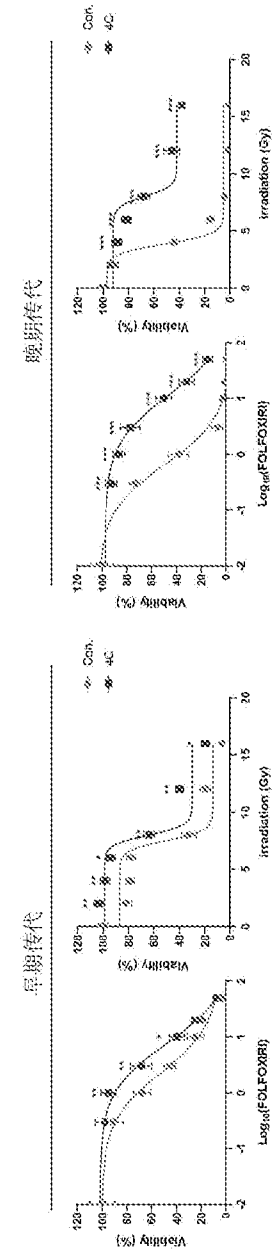


细则 26,
24. 04. 2023

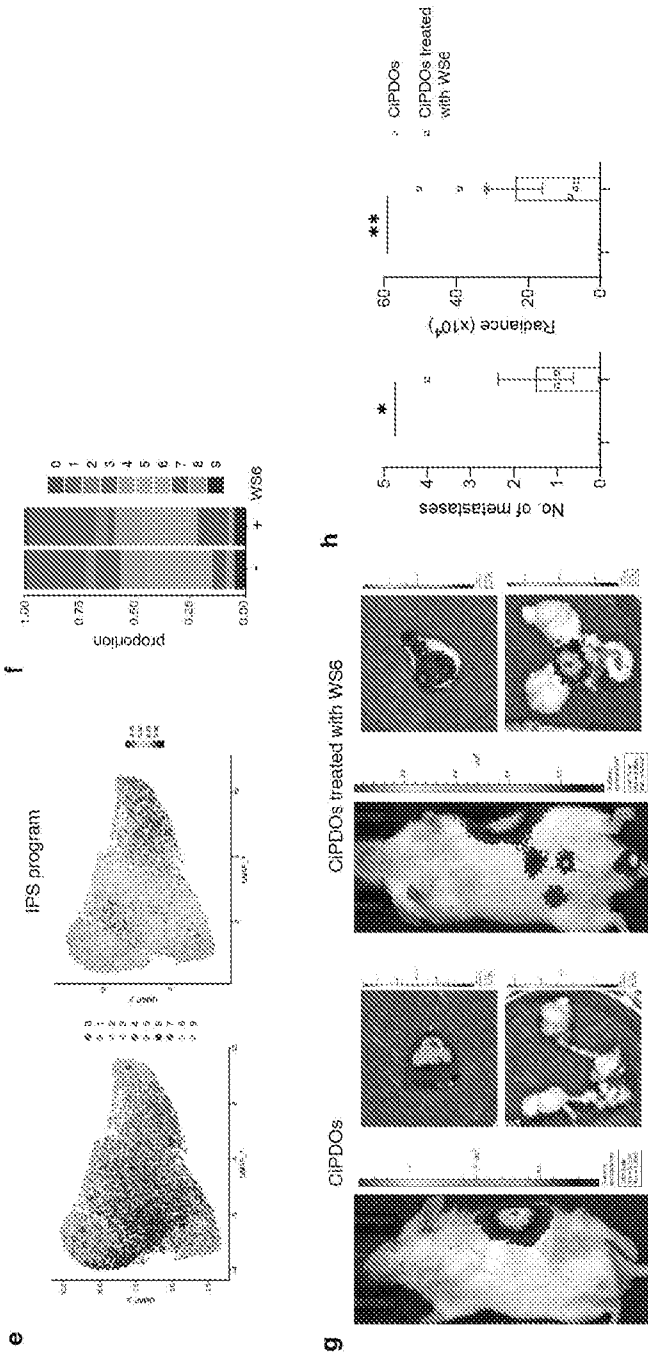
[图 4]



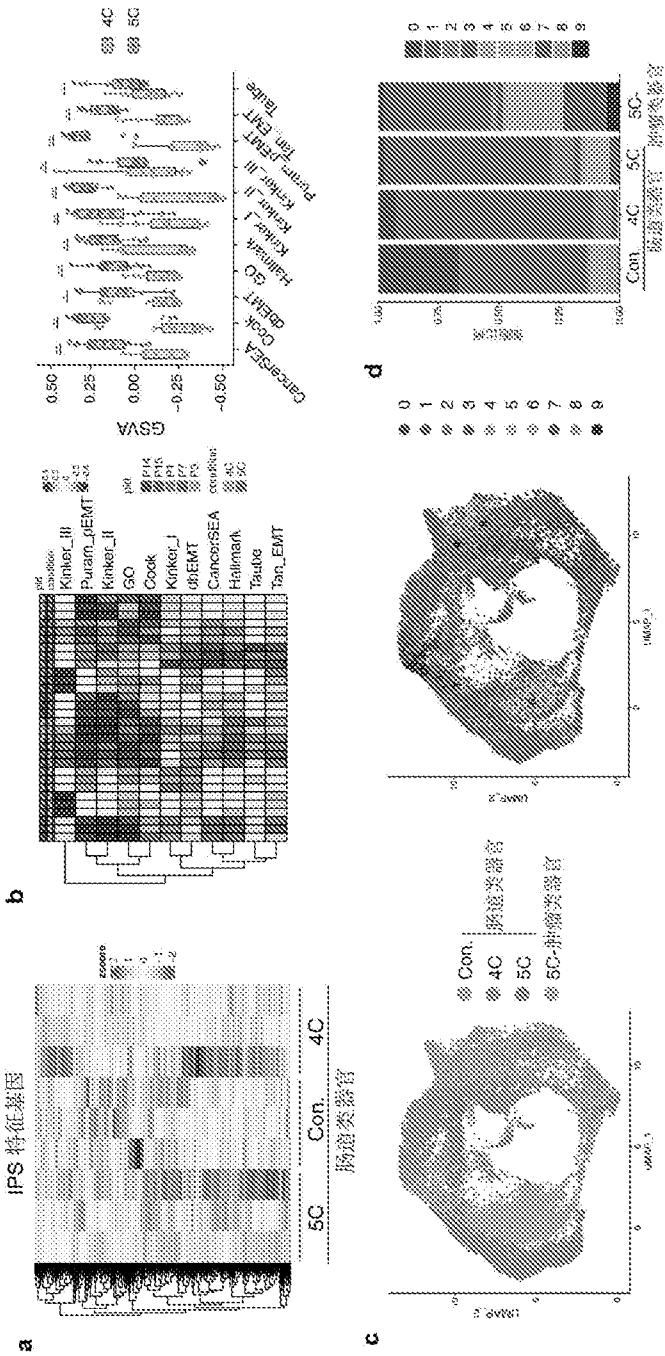
[图 4(续)]



[图 5(续)]

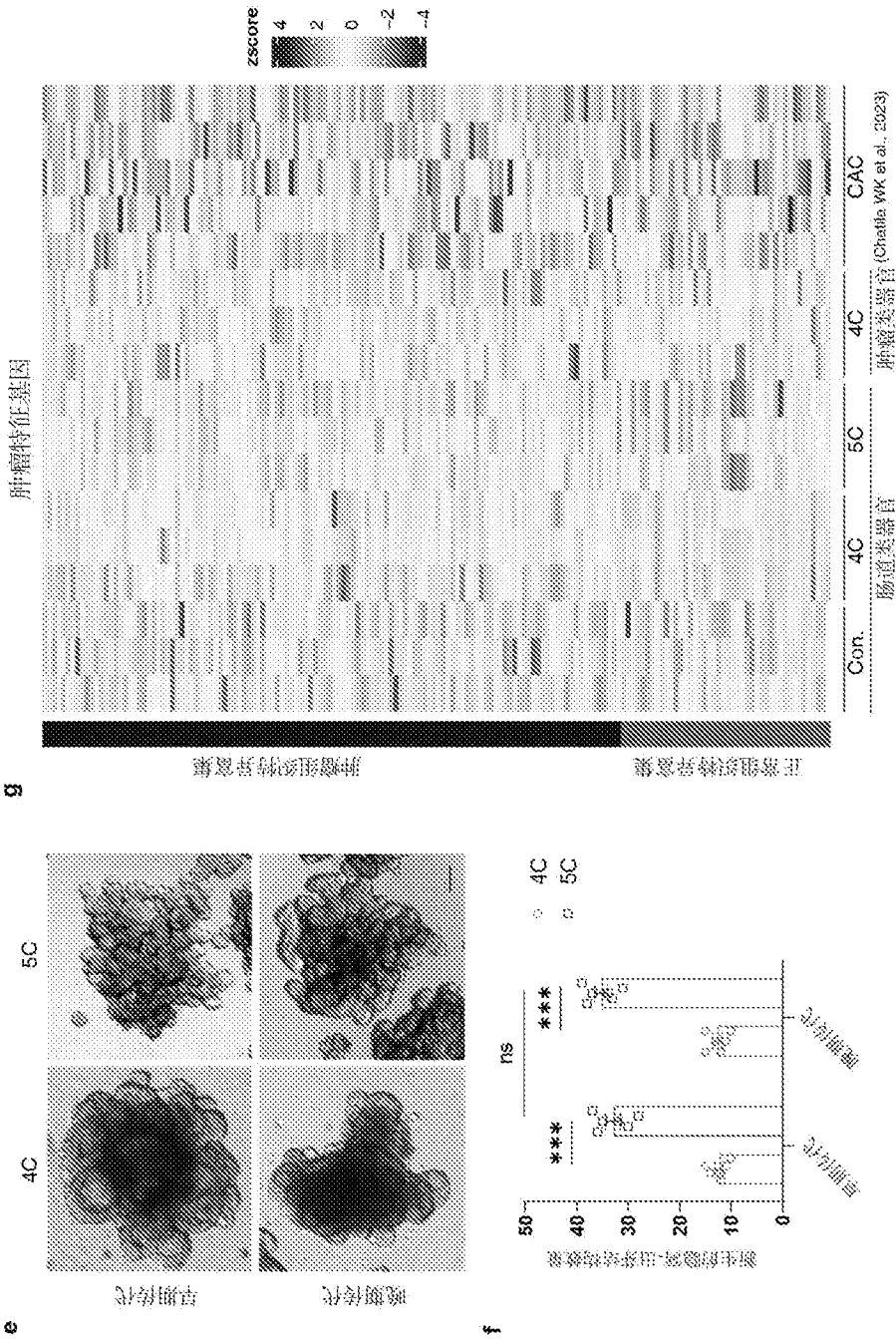


[图 6]

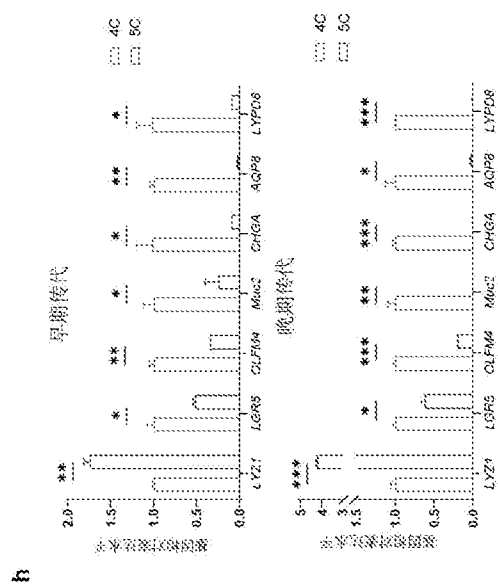


细则 26,
24. 04. 2023

[图 6(续)]



[图 6(续)]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/082192

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12N 5/071(2010.01)i; C12N 5/09(2010.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC																	
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC:C12N Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CNABS, WPABSC, VEN, CNTXT, ENTXT, CNKI, 百度学术, BAIDU SCHOLAR, PubMed, ISI-WEB OF SCIENCE: 类器官, organoid, ALK, LDN, Wnt, CHIR, EGF, FGF, p38, SB202190, EBP1, IκB, WS3, WS6, 肠, colorectum, colon, rectum, intestinal, gut																	
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category*</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>CN 114085803 A (PEKING UNIVERSITY) 25 February 2022 (2022-02-25) see description, paragraphs [0003]-[0038]</td> <td>1-5, 7-13</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 114181903 A (ZHEJIANG HONRAYMED TECHNOLOGY CO., LTD.) 15 March 2022 (2022-03-15) see description, paragraphs [0009]-[0037]</td> <td>1-25</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 2019367882 A1 (CHILDREN'S HOSPITAL MEDICAL CENTER) 05 December 2019 (2019-12-05) see description, paragraphs [0003] and [0032]-[0041]</td> <td>1-25</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>孙霞 等人 (SUN, Xia et al.). "肠道类器官的构建及应用 (Establishment and Application of Gut Organoids)" <i>结直肠肛门外科 (Journal of Colorectal & Anal Surgery)</i>, Vol. 26, No. 3, 28 June 2020 (2020-06-28), see pages 251-255</td> <td>1-25</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X	CN 114085803 A (PEKING UNIVERSITY) 25 February 2022 (2022-02-25) see description, paragraphs [0003]-[0038]	1-5, 7-13	A	CN 114181903 A (ZHEJIANG HONRAYMED TECHNOLOGY CO., LTD.) 15 March 2022 (2022-03-15) see description, paragraphs [0009]-[0037]	1-25	A	US 2019367882 A1 (CHILDREN'S HOSPITAL MEDICAL CENTER) 05 December 2019 (2019-12-05) see description, paragraphs [0003] and [0032]-[0041]	1-25	A	孙霞 等人 (SUN, Xia et al.). "肠道类器官的构建及应用 (Establishment and Application of Gut Organoids)" <i>结直肠肛门外科 (Journal of Colorectal & Anal Surgery)</i> , Vol. 26, No. 3, 28 June 2020 (2020-06-28), see pages 251-255	1-25
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.															
X	CN 114085803 A (PEKING UNIVERSITY) 25 February 2022 (2022-02-25) see description, paragraphs [0003]-[0038]	1-5, 7-13															
A	CN 114181903 A (ZHEJIANG HONRAYMED TECHNOLOGY CO., LTD.) 15 March 2022 (2022-03-15) see description, paragraphs [0009]-[0037]	1-25															
A	US 2019367882 A1 (CHILDREN'S HOSPITAL MEDICAL CENTER) 05 December 2019 (2019-12-05) see description, paragraphs [0003] and [0032]-[0041]	1-25															
A	孙霞 等人 (SUN, Xia et al.). "肠道类器官的构建及应用 (Establishment and Application of Gut Organoids)" <i>结直肠肛门外科 (Journal of Colorectal & Anal Surgery)</i> , Vol. 26, No. 3, 28 June 2020 (2020-06-28), see pages 251-255	1-25															
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.																	
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family																	
Date of the actual completion of the international search 06 December 2023		Date of mailing of the international search report 16 December 2023															
Name and mailing address of the ISA/CN China National Intellectual Property Administration (ISA/CN) China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088		Authorized officer Telephone No.															

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/082192

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Shoichi Date et al. "Mini-gut organoids: reconstitution of the stem cell niche" <i>Annual review of cell and developmental biology</i> , Vol. 2015, No. 31, 02 October 2015 (2015-10-02), see pages 269-284	1-25

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/082192

Box No. I **Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☒ forming part of the international application as filed.
 - b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),
☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2023/082192

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	114085803	A	25 February 2022	None			
CN	114181903	A	15 March 2022	None			
US	2019367882	A1	05 December 2019	NZ	753873	A	27 January 2023
				WO	2018106628	A1	14 June 2018
				US	11767515	B2	26 September 2023
				AU	2021286289	A1	06 January 2022
				CA	3045145	A1	14 June 2018
				SG	10202105768	WA	29 June 2021
				JP	2022115925	A	09 August 2022
				AU	2017373767	A1	13 June 2019
				AU	2017373767	B2	16 September 2021
				KR	20190088527	A	26 July 2019
				KR	102558606	B1	26 July 2023
				EP	3548507	A1	09 October 2019
				EP	3548507	A4	15 July 2020
				IL	267109	A	29 August 2019
				JP	2020501534	A	23 January 2020
				JP	7068305	B2	16 May 2022
				KR	20230110839	A	25 July 2023

第I栏

核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列,国际检索是基于下列序列表进行的:

- a. ☒ 作为国际申请的一部分提交的:
- b. ☐ 为国际检索的目的在国际申请日之后提交(细则13之三.1(a)),
☐ 附有说明序列表不超出所提交国际申请公开范围的声明。

2. ☐ 本报告是在没有收到符合WIPO ST.26标准的序列表的情况下,考虑了国际申请中披露的任何核苷酸和/或氨基酸序列,在可进行有意义检索的范围内做出的。

3. 补充意见:

A. 主题的分类 C12N 5/071(2010.01)i; C12N 5/09(2010.01)i 按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类		
B. 检索领域 检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号) IPC:C12N 包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献 在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用)) 数据库: CNABS,WPABSC,VEN,CNTEXT,ENTXT,CNKI,百度学术,PubMed,ISI-WEB OF SCIENCE; 检索词: 类器官,organoid,ALK,LDN,Wnt,CHIR,EGF,FGF,p38,SB202190,EBP1,IκB,WS3,WS6,肠,colorectum,colon,rectum,intestinal,gut		
C. 相关文件		
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	CN 114085803 A (北京大学) 2022年2月25日 (2022 - 02 - 25) 参见说明书第[0003]-[0038]段	1-5, 7-13
A	CN 114181903 A (浙江弘瑞医疗科技有限公司) 2022年3月15日 (2022 - 03 - 15) 参见说明书第[0009]-[0037]段	1-25
A	US 2019367882 A1 (CHILDRENS HOSPITAL MED CT) 2019年12月5日 (2019 - 12 - 05) 参见说明书第[0003]、[0032]-[0041]段	1-25
A	孙霞 等人. "肠道类器官的构建及应用" 结直肠肛门外科, 第26卷, 第3期, 2020年6月28日 (2020 - 06 - 28), 参见第251-255页	1-25
A	Shoichi Date 等人. "Mini-gut organoids: reconstitution of the stem cell niche" Annual review of cell and developmental biology, 第2015卷, 第31期, 2015年10月2日 (2015 - 10 - 02), 参见第269-284页	1-25
☐ 其余文件在C栏的续页中列出。 ☒ 见同族专利附件。		
* 引用文件的具体类型: "A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 "D" 申请人在国际申请中引证的文件 "E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 "L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) "O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 "P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 "T" 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 "X" 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 "Y" 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 "&" 同族专利的文件		
国际检索实际完成的日期 2023年12月6日	国际检索报告邮寄日期 2023年12月16日	
ISA/CN的名称和邮寄地址 中国国家知识产权局 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088	授权官员 徐益君 电话号码 (+86) 010-62411083	

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2023/082192

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	114085803	A	2022年2月25日	无			
CN	114181903	A	2022年3月15日	无			
US	2019367882	A1	2019年12月5日	NZ	753873	A	2023年1月27日
				WO	2018106628	A1	2018年6月14日
				US	11767515	B2	2023年9月26日
				AU	2021286289	A1	2022年1月6日
				CA	3045145	A1	2018年6月14日
				SG	10202105768	WA	2021年6月29日
				JP	2022115925	A	2022年8月9日
				AU	2017373767	A1	2019年6月13日
				AU	2017373767	B2	2021年9月16日
				KR	20190088527	A	2019年7月26日
				KR	102558606	B1	2023年7月26日
				EP	3548507	A1	2019年10月9日
				EP	3548507	A4	2020年7月15日
				IL	267109	A	2019年8月29日
				JP	2020501534	A	2020年1月23日
				JP	7068305	B2	2022年5月16日
				KR	20230110839	A	2023年7月25日