(19)国家知识产权局

(12)实用新型专利

(10)授权公告号 CN 218755788 U
(45)授权公告日 2023.03.28

(21)申请号 202120671205.8

(22)申请日 2021.04.01

(30)优先权数据
16/838,010 2020.04.01 US
63/120,719 2020.12.02 US
17/118,586 2020.12.10 US
17/178,210 2021.02.17 US

(73)专利权人 希里斯公司
地址 美国北卡罗来纳州
专利权人 杜克大学

(72)发明人 沈西凌 丹尼尔·得鲁巴
大卫·徐 杰弗里·莫赫曼
王朝晖

(74)专利代理机构 北京市金杜律师事务所 11256
专利代理师 陈文平 徐志明

(51)Int.Cl.
C12M 3/00(2006.01)
C12M 1/38(2006.01)
C12M 1/36(2006.01)
C12M 1/34(2006.01)
B01L 3/00(2006.01)
C12Q 1/02(2006.01)

(ESM)同样的发明创造已同日申请发明专利

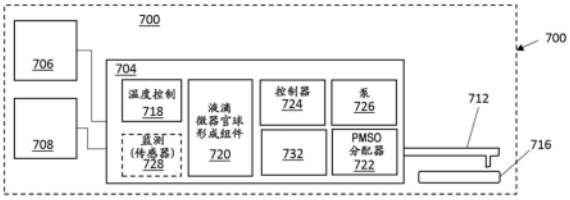
权利要求书2页 说明书34页 附图10页

(54)实用新型名称

一种用于形成器官球的设备

(57)摘要

一种用于形成器官球的设备，包括从单一患者组织样品(例如从肿瘤样品)形成成熟的微器官球(包括患者来源的微器官球)的文库。本文还描述了使用这些患者来源的微器官球筛选患者的方法和系统，包括个性化治疗。



CN 218755788 U

1.一种用于形成器官球的设备,该设备包括:

微流体组件,其包括:

用于容纳未聚合混合物的容纳室;

用于接收解离的组织样品的端口;

用于接收不混溶流体的端口;

与所述容纳室、所述用于接收所述解离的组织样品的端口和所述用于接收所述不混溶流体的端口中的每一个连通的多个微流体通道;

接收来自所述用于容纳所述未聚合混合物的容纳室、所述用于接收所述解离的组织样品的端口和所述用于接收所述不混溶流体的端口中的每一个的流体输入的液滴形成组件,以及从所述液滴形成组件延伸的聚合通道;

与所述容纳室和一个或多个所述微流体通道偶联的压力源;

一个或多个压力和/或流量传感器,其用于检测所述多个微流体通道内的压力和/或流量;和

温度调节器;

控制器,其控制所述压力源以调节所述多个微流体通道内和所述液滴形成组件内的流体的流量;其中所述控制器控制所述微流体组件的温度,使得所述微流体组件的全部或一部分的温度为20℃或更低,并且所述聚合通道的温度高于20℃;和

与所述聚合通道偶联的分配器,其用于从所述液滴形成组件分配器官球。

2.根据权利要求1所述的设备,其特征在于进一步包括所述容纳室和所述微流体通道之间的带阀端口。

3.根据权利要求1所述的设备,其特征在于进一步包括配置为接收不混溶流体的不混溶流体室,其中所述控制器对所述不混溶流体室加压。

4.根据权利要求1所述的设备,其特征在于进一步包括配置为接收所述解离的组织样品的组织室,其中所述组织室通过阀与所述用于接收所述解离的组织样品的端口偶联。

5.根据权利要求1所述的设备,其特征在于所述一个或多个压力和/或流量传感器包括光学传感器。

6.根据权利要求1所述的设备,其特征在于所述一个或多个压力和/或流量传感器包括机电传感器。

7.根据权利要求1所述的设备,其特征在于进一步包括至少部分地包围所述微流体组件的外壳。

8.根据权利要求1所述的设备,其特征在于所述控制器在所述微流体组件内保持恒定的流体流。

9.根据权利要求1所述的设备,其特征在于所述多个微流体通道和所述液滴形成组件具有100μm或更大的直径以防止被解离的细胞堵塞。

10.根据权利要求1所述的设备,其特征在于所述解离的组织样品通过所述设备所经过的路径的总长度小于10cm。

11.一种用于形成器官球的设备,该设备包括:

外壳;

至少部分地位于所述外壳内的微流体组件,该微流体组件包括:

用于容纳未聚合基质混合物的未聚合混合物容纳室；

用于容纳解离的组织样品的组织样品容纳室；

用于容纳不混溶流体的不混溶流体容纳室；

与所述未聚合混合物容纳室、所述组织样品容纳室和所述不混溶流体容纳通道连通的多个微流体通道；

接收来自所述未聚合混合物容纳室、所述组织样品容纳室和所述不混溶流体容纳通道中的每一个的流体输入的液滴形成组件；其中所述液滴形成组件包括从所述液滴形成组件延伸的聚合通道；

与所述容纳室和一个或多个所述微流体通道偶联的压力源；

一个或多个压力和/或流量传感器，其用于检测所述多个微流体通道内的压力和/或流量；和

温度调节器；

控制器，其控制所述压力源以调节所述容纳室和所述多个微流体通道的压力，从而控制所述液滴形成组件内的流量；其中所述控制器控制所述微流体组件的温度，使得所述微流体组件的全部或一部分的温度为20℃或更低，并且使得所述聚合通道的温度高于20℃；和

与所述聚合通道偶联的分配器，其用于分配在所述液滴形成组件内形成的器官球。

12.根据权利要求11所述的设备，其特征在于进一步包括所述未聚合混合物容纳室和所述微流体通道之间的带阀端口，其中所述控制器对所述未聚合混合物容纳室加压。

13.根据权利要求11所述的设备，其特征在于进一步包括配置为接收不混溶流体的所述不混溶流体容纳室之间的带阀端口，其中所述控制器对所述不混溶流体容纳室加压。

14.根据权利要求11所述的设备，其特征在于进一步包括所述组织样品容纳室和所述液滴形成组件之间的带阀端口，其中所述控制器对所述组织样品容纳室加压。

15.根据权利要求11所述的设备，其特征在于所述控制器在所述微流体组件内保持恒定的流体流。

16.根据权利要求11所述的设备，其特征在于所述组织样品容纳室和所述液滴形成组件的所述聚合通道之间所述组织样品的整个流体通路具有100μm或更大的直径以防止被解离的细胞堵塞。

17.根据权利要求11所述的设备，其特征在于解离的组织样品通过所述设备所经过的总路径长度小于10cm。

一种用于形成器官球的设备

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本专利申请要求2021年2月17日提交的美国专利申请第 17/178,210号(标题“PRECISION DRUG SCREENING FOR PERSONALIZED CANCER THERAPY”)的优先权。

[0003] 本专利申请还要求2020年12月10日提交的美国专利申请第 17/118,586号(标题“PRECISION DRUG SCREENING FOR PERSONALIZED CANCER THERAPY”)的优先权。

[0004] 本申请还要求2020年4月1日提交的美国专利申请第16/838,010 号(标题“METHODS AND APPARATUSES FOR PATIENT-DERIVED MICRO-ORGANOSPHERES”)的优先权。

[0005] 美国专利申请第17/118,586号也要求2020年12月2日提交的美国临时专利申请第63/120,719号(标题“METHODS AND APPARATUSES FOR PATIENT-DERIVED MICROORGANOSPHERES”)的优先权。

[0006] 通过引用并入

[0007] 本说明书中提及的所有公开出版物和专利申请在此全部引入作为参考,达到如同每个单独的公开出版物或专利申请被明确地和单独地指明引入作为参考的程度。

技术领域

[0008] 本文所述的方法、设备和物质组合物涉及患者来源的微器官球 (Patient-Derived Micro-Organospheres)(PMOSs)、用于形成PMOSs的方法和设备以及使用PMOSs的方法和设备。具体而言,本文描述了用于识别可有效治疗特定患者的一种或多种药物配方的方法和设备。

背景技术

[0009] 模型细胞和组织系统可用于生物学和医学研究。最常见的做法是从组织得到永生化细胞系,并在二维(2D)条件下(例如,在皮氏培养皿或孔板中)培养它们。然而,尽管对基础研究非常有用,但2D细胞系与个体患者对治疗的反应并不密切相关。特别地,三维细胞培养模型被证明在发育生物学、疾病病理学、再生医学、药物毒性和疗效测试以及个性化医学方面特别有用。例如,类球体(spheroids)和类器官 (organoids)是已经过研究的三维细胞聚集体。然而,类器官和类球体均具有降低其效能的限制。

[0010] 多细胞肿瘤类球体最早描述于70年代早期,且通过在非粘附条件下培养癌细胞系获得。类球体通常作为超低附着板中自由浮动的细胞聚集体由癌细胞系形成。已经证明类球体比2D细胞培养物保持更多的干细胞相关性质。

[0011] 类器官是体外衍生的细胞聚集体,其包括可分化为主要细胞谱系的细胞的干细胞群体。类器官通常具有大于1毫米的直径,并通过传代进行培养。类器官培养物生长和扩增通常比2D细胞培养物慢。为了从临床样品产生类器官,需要以足够数量的活细胞(例如,数百至数千个)开始,因此从少量样品(例如活组织检查)中得到类器官通常具有挑战性,并且即使成功,也需要相当长的时间来扩增培养物以用于如药物测试的应用。另外,类器官大小、形状和细胞数量存在很大变异性。为了生长和表达所需的细胞类型,类器官可能需要复

杂的生长因子混合物和培养条件。

[0012] 肿瘤类球体或类器官对于快速和可靠的筛选都不是最佳的,尤其是对于个性化医学,例如进行药物反应的离体测试。例如,除了在相对利益和风险之间取得平衡以获得最有利的结果外,肿瘤学的实践持续面临着将正确的治疗方案与正确的患者相匹配的巨大挑战。患者来源的癌症模型(PDMC)可包括使用类器官(包括患者来源的类器官)以促进更个性化的治疗靶标的识别和开发。然而,尽管回顾性研究表明从切除或活组织检查的患者肿瘤获得的类器官与患者对治疗的反应相关,但使用类器官指导治疗方面存在重大限制。如上所述,从肿瘤样品得到和扩增类器官(尤其是患者来源的类器官)用于药物敏感性试验需要数月时间,这降低了临床适用性,因为患者不能等那么久才接受治疗。另外,目前无法在临床上可行的时间范围内从芯组织活检样本获得对超过数十种化合物进行药物筛选所需的类器官数量,而芯组织活检样本通常是患有转移或无法手术的癌症的患者唯一可得的组织形式。从活检样品得到类器官的显著失败率也阻止了其作为可靠的诊断分析的使用。此外,类器官的大小(以及潜在的反应)可能存在高度的可变性,尤其是具有较长培养时间且因此具有多次传代的类器官。

[0013] 由于其与患者结果的较好相关性,PDMC还被用于替代2D细胞系作为药物发现的高通量筛选平台,如RNAi、CRISPR和药物小分子筛选。然而,与细胞系相比,这些PDMC模型(包括类球体和类器官)扩增和操作通常要慢得多,使得高通量应用具有挑战性且成本高昂。扩增这些模型以扩大细胞数量所需的较长时间也往往使得在塑料中(in plastics)生长最快的克隆占据主导并超过其他克隆,从而使模型更加均质并丧失原始的组织组成和克隆多样性。此外,其相对较大且不均匀的尺寸和有限的扩散性使得其对许多基于自动荧光和成像的读出分析具有挑战性。

[0014] 因此,需要用于从切除或活组织检查样品生成患者来源的组织模型(例如,肿瘤模型和/或非肿瘤组织模型)的方法、组合物和设备。特别地,提供可以实现从单一活组织检查样品(例如18号芯组织活检) 获得大量具有可预测和临床相关的性质的患者来源的组织模型(这可在例如获得活组织检查样品后7-10天内完成)的方法和设备将是有用的。这将允许进行稳健和可靠的测试,并最小化指导患者特异性治疗的延误。此外,对于高通量筛选应用,生成可以高度平行的方式快速扩展的患者来源的模型也是有用的,从而生成具有更小且更均匀的尺寸、更好的每单元细胞数量的控制性以及更好的扩散性(例如,通过提高表面-体积比率)的单元。

实用新型内容

[0015] 本文描述了患者来源的微器官球(PMOSs)、制备PMOSs的设备和方法以及使用PMOSs的设备和方法。本文还描述了使用这些患者来源的微器官球筛查患者的方法和系统,包括个性化治疗方法。

[0016] 总体上,本文描述了形成和生长患者来源的微器官球的方法和设备,所述微器官球包含源自患者的细胞,例如从小的患者活检样品(例如,用于快速诊断以指导治疗)、从切除的患者组织(包括切除的原发性肿瘤或功能障碍器官的部分)(例如,用于高通量筛选)中提取的细胞和/或从已经建立的PDMCs(包括患者来源的异种移植物(PDX)和类器官)(例如,用于生成微器官球以用于高通量筛选)提取的细胞。

[0017] 这些PMOSs可由正常的原代细胞(例如正常的器官组织)或肿瘤组织形成。例如,在一些变型中,这些方法和设备可以从癌性肿瘤活检组织形成PMOSs,使得能够使用所检查的特定肿瘤组织选择定制的治疗。令人惊讶的是,这些方法和设备允许在从患者移除活检样品后的几小时内从单一组织活检样品形成数百、数千或甚至数万(例如, 500、750、1000、2000、5000、10,000或更多)的PMOSs。来自患者活检样品的解离的原代细胞可与流体基质材料(例如基体基底膜基质 (例如,MATRIGEL))组合以形成微器官球。所产生的多个患者来源的微器官球可具有预定的尺寸范围(例如,在例如10μm至700μm之间以及其中的任何子范围中的直径)以及初始的原代细胞数量(例如,在 1至1000之间,尤其是更少的细胞数量,例如在1至200之间)。细胞数量和/或直径可被控制在例如+/-5%、10%、15%、20%、25%、30%等内。当按照本文所述形成时,这些PMOSs具有异常高的存活率(> 75%、>80%、>85%、>90%、>95%),并且在非常短的时间内(包括形成后的前1-10天内,例如,1天内、2天内、3天内、4天内、5天内、6天内、7天内、8天内、9天内、10天内等)对于使用和测试是稳定的。这允许对潜在大量的患者特异性和生物学相关的PMOSs进行快速测试,从而节省研发和部署患者治疗(例如癌症治疗方案)的关键时间。本文所述的PMOSs快速形成3D细胞结构,该结构复制并对应于从其进行活组织检查的组织环境,例如三维(3D)肿瘤微环境。本文所述的PMOSs也可称为“液滴(droplets)”。每个PMOSs可包括,例如,作为流体基质材料的一部分的生长因子和结构蛋白(例如,胶原蛋白、层粘连蛋白、巢蛋白等),其可以模拟原始组织(例如肿瘤)环境。实际上可以使用任何原代细胞组织,包括实际上任何肿瘤组织。

[0018] 例如,迄今为止,所有测试的肿瘤类型和部位均已成功产生 PMOSs(例如,当前成功率为100%,n=32,包括原发部位或转移部位 (包括肝、网膜和隔膜)的结肠癌、食道癌、皮肤癌(黑素瘤)、子宫癌、骨癌(肉瘤)、肾癌、卵巢癌、肺癌和乳腺癌)。用于成功产生微器官球的组织类型可以从其他位置转移。在一些变型中,本文所述的PMOSs 可从细针抽吸物(FNA)或循环肿瘤细胞(CTC)生长,例如从液体活检样品。增殖和生长通常仅在少至3-4天内看到,并且PMOSs可以维持和传代数月,或者它们可以冷冻保存和/或立即用于分析(例如,在前 7-10天内)。

[0019] 特别地,本文描述了形成患者来源的微器官球的方法。通常,这些方法包括将解离的原代组织细胞(包括但不限于癌症/异常组织、正常组织等)与液体基质材料组合以形成未聚合材料,然后使该未聚合材料聚合以形成直径通常小于约1000μm(例如,小于约900μm、小于约800μm、小于约700μm、小于约600μm,且特别是小于约500μm) 的微器官球,其中分布有解离的原代组织细胞。如上所述,解离细胞的数量可在预定范围内(例如,约1至约500个细胞、约1至200个细胞、约1至150个细胞、约100个细胞、约1至75个细胞、约1 至50个细胞、约1至30个细胞、约1至20个细胞、约1至10个细胞、约5至15个细胞、约20至30个细胞、约30至50个细胞、约 40至60个细胞、约50至70个细胞、约60至80个细胞、约70至 90个细胞、约80至100个细胞、约90至110个细胞等,包括约1 个细胞、约10个细胞、约20个细胞、约30个细胞、约40个细胞、约50个细胞、约60个细胞、约70个细胞等)。这些方法中的任何一种可如本文所述进行配置以产生具有可重复尺寸(例如,具有窄尺寸分布)的微器官球。

[0020] 解离的细胞可以是新进行活检的,并且可以以任何合适的方式进行解离,包括机械和/或化学解离(例如,通过使用一种或多种酶如胶原酶、胰蛋白酶等进行的酶解聚)。解离的细胞可以任选择地进行处理、选择和/或修饰。例如,可以对细胞进行分选或选择以识

别和/或分离具有一个或多个特征(例如,大小、形态等)的细胞。细胞可被标记(例如,用一个或多个标志物),其可用于帮助选择。在一些变型中,细胞可以通过已知的细胞分选技术进行分选,包括但不限于微流体细胞分选、荧光激活细胞分选、磁性激活细胞分选等。在一些实例中, PMOSs可通过非细胞物体(例如磁珠或条形码样颗粒)进行分选。可用于分选的非细胞物体(例如,磁珠、荧光标记颗粒等)可作为本文所述任何方法的部分并入PMOSs中。或者,细胞可以不经分选而使用。

[0021] 在一些变型中,解离的细胞可以通过用一种或多种试剂处理而进行修饰。例如,细胞可以进行遗传修饰。在一些变型中,可以使用 CRISPR-Cas9或其他基因编辑技术对细胞进行修饰。在一些变型中,细胞可以通过任何合适的方法(例如,电穿孔、细胞挤压、纳米颗粒注射、磁转染、化学转染、病毒转染等)进行转染,包括用质粒、RNA、 siRNA等的转染。或者,细胞可以不经修饰而使用。

[0022] 一种或多种另外的材料可与解离的细胞和流体(例如,液体)基质材料组合以形成未聚合混合物。例如,未聚合混合物可包括另外的细胞或组织类型,包括支持细胞。另外的细胞或组织可以源自不同的活检样品(例如,来自不同解离组织的原代细胞)和/或培养的细胞。另外的细胞可以是例如免疫细胞、基质细胞、内皮细胞等。另外的材料可包括培养基(例如,生长培养基、冷冻培养基等)、生长因子、支持网络分子(例如,胶原蛋白、糖蛋白、细胞外基质等),等等。在一些变型中,另外的材料可包括药物组合物。在一些变型中,未聚合混合物仅包括解离的组织样品(例如,原代细胞)和流体基质材料。

[0023] 该方法可从单一组织活检样品快速形成多个患者来源的微器官球,使得从每个活检样品形成多于约500个患者来源的微器官球(例如,大于约600个、大于约700个、大于约800个、大于约900个、大于约1000个、大于约2000个、大于约2500个、大于约3000个、大于约4000个、大于约5000个、大于约6000个、大于约7000个、大于约8000个、大于约9000个、大于约10000个、大于约11000个、大于约12000个等)。活检样品可以是标准尺寸的活检样品,例如 18G(例如,14G、16G、18G等)芯组织活检样品。例如,通过活检移除并用于形成多个患者来源的微器官球的组织的体积可以是约1/32 至1/8英寸直径和约3/4至约1/4英寸长的小圆柱体(用活检针获取),如约1/16英寸直径和1/2英寸长的圆柱体。活检样品可以通过针吸活检获取,例如通过芯针活检。在一些变型中,活检样品可以通过细针抽吸获取。可使用的其他活检类型包括刮除活检、穿孔活检、切开活检、切除活检等。典型地,来自单一患者活检样品的材料可用于生成多个(例如,大于约2000、大于约5000、大于约7500、大于约10,000个等)如上所述的患者来源的微器官球。多个患者来源的微器官球可使用可被配置为产生如本文所述的这种大量高度规则(尺寸、细胞数量等)的微器官球的设备(如本文所述)形成。在一些变型中,这些方法和设备可以快速生成多个微器官球(例如,大于约1个微器官球/分钟、大于约1个微器官球/10秒、大于约1个微器官球/5秒、大于约1个微器官球/2秒、大于约1个微器官球/秒、大于约2个微器官球/秒、大于约3个微器官球/秒、大于约4个微器官球/秒,大于约5个微器官球/秒、大于约10个微器官球/秒、大于50个微器官球/秒、大于100个微器官球/秒、大于125个微器官球/秒等。

[0024] 例如,在一些变型中,这些方法可以通过组合未聚合混合物和与未聚合材料不混溶的材料(例如液体材料)来进行。该方法和设备可通过至少部分地控制未聚合混合物(和/或解离的组织和流体基质)和与未聚合混合物不混溶的材料(例如,疏水材料、油等)中一种

或多种的流动来控制微器官球的尺寸和/或细胞密度。例如，在一些变型中，这些方法可以使用微流体设备来进行。在一些变型中，多个微器官球可以平行地形成(例如，2个平行地、3个平行地、4个平行地等)。因此，相同的设备可包括多个平行通道，其可与相同的未聚合材料源，或相同的解离原代组织源和/或流体基质源偶联。

[0025] 未聚合材料可以通过多种不同的方式聚合以形成患者来源的微器官球。在一些变型中，该方法可包括通过改变温度(例如，将温度升高至阈值以上，例如高于约20℃、高于约25℃、高于约30℃、高于约35℃等)来使微器官球聚合。

[0026] 一旦聚合，可使得患者来源的微器官球生长，例如通过培养，和 /或可在培养前或培养后进行分析和/或可在培养前或培养后冷冻保存。患者来源的微器官球可培养任何适当的时间长度，但特别是可培养1天至10天(例如，1天至9天、1天至8天、1天至7天、1天至 6天、3天至9天、3天至8天、3天至7天等)。在一些变型中，患者来源的微器官球可在六次传代前冷冻保存或分析，这可保持患者来源的微器官球内细胞的异质性；限制传代次数可以防止分裂较快的细胞超出分裂较慢的细胞过多。

[0027] 一般地，由于相同的患者活检样品可提供大量的(例如，大于 2,000、大于3,000、大于4,000、大于5,000、大于6,000、大于7,000、大于8,000、大于9,000、大于10,000等)细胞，一些患者来源的微器官球可以冷冻保存(例如，超过一半)，而一些进行培养和/或分析。如本文将更详细描述的，冷冻保存的患者来源的微器官球随后可被库存和使用(例如，分析、传代等)。

[0028] 因此，本文描述了方法，包括形成多个患者来源的微器官球的方法。例如，形成多个患者来源的微器官球的方法可包括：将解离的组织样品和流体基质材料组合以形成未聚合混合物；形成未聚合混合物的多个液滴；和将液滴聚合以形成多个患者来源的微器官球，每个微器官球的直径在50至500μm之间，其中分布有1至200个解离的细胞。

[0029] 一种例如形成多个患者来源的微器官球的方法可包括将解离的组织样品和流体基质材料组合以形成未聚合混合物；由未聚合混合物的连续流形成多个液滴，其中液滴的尺寸变异小于25％；以及通过加热使液滴聚合以形成多个患者来源的微器官球，其各自具有分布在每个患者来源的微器官球内的1至200个解离的细胞。

[0030] 在一些变型中，本文所述的用于形成多个患者来源的微器官球的方法可包括：将解离的组织样品和流体基质材料组合以形成未聚合混合物；通过将未聚合混合物的流与一个或多个与未聚合混合物不混溶的流体的流汇聚形成多个液滴，液滴的尺寸变异小于25％；使液滴聚合以形成多个直径在50至500μm之间的患者来源的微器官球，其中分布有1至200个解离的细胞；以及从不混溶的流体分离该多个患者来源的微器官球。

[0031] 这些方法中的任何一种可包括在形成液滴之前对解离的组织样品内的细胞进行修饰。

[0032] 形成多个液滴可包括形成未聚合混合物的多个液滴，其具有尺寸变异小于约25％的均一大小(例如，小于约20％的尺寸变异、小于约 15％的尺寸变异、小于约10％的尺寸变异、小于约8％的尺寸变异、小于约5％的尺寸变异等)。尺寸变异也可以描述为尺寸变异的窄分布。例如，尺寸分布可包括具有低标准偏差(例如，15％或更小的标准偏差、 12％或更小的标准偏差、10％或更小的标准偏差、8％或更小的标准偏差、6％或更小的标准偏差、5％或更小的标准偏差等)的患者来源的微器官球尺寸分布(例如，微器官球直径vs形成的微器

官球的数量)。

[0033] 这些方法中的任何一种也可以包括铺接或分布患者来源的微器官球。例如,在一些变型中,该方法可包括在分析前将来自各种来源的患者来源的微器官球组合到容器中。例如,微器官球可以放置在多孔板中。因此,这些方法中的任何一种可包括在分析患者来源的微器官球之前将患者来源的微器官球分配到多孔板中。每个孔可包括一个或多个(或在一些变型中,相等量的)患者来源的微器官球。在一些变型中,将患者来源的微器官球施用到容器中可包括将器官球放置到多个通过至少部分可渗透的膜分隔的室中,以允许上清液物质在室之间循环。这可能允许患者来源的微器官球共有相同的上清液。

[0034] 在这些方法的任何一种中,可对患者来源的微器官球进行分析。分析通常可包括将单个患者来源的微器官球暴露于条件(例如药物组合物)或用其处理,以确定药物组合物是否对患者来源的微器官球的细胞具有影响(以及在某些情况下,具有何种影响)。分析可包括将患者来源的微器官球的子集(单独或成组)暴露于一种或多种浓度的药物组合物,并允许患者来源的微器官球保持暴露预定时间段(分钟、小时、天等),和/或暴露并移除药物组合物,然后培养患者来源的微器官球预定的时间。此后,可检查患者来源的微器官球以确定任何影响,特别包括对患者来源的微器官球中细胞的毒性,或患者来源的微器官球中细胞的形态和/或生长的变化。在一些变型中,分析可包括标记(例如,通过免疫组织化学)患者来源的微器官球内的活细胞或固定细胞。可以手动或自动地分析(例如,检查)细胞。例如,可以使用自动阅读设备检查细胞以确定任何毒性(细胞死亡)。在一些变型中,分析多个患者来源的微器官球可包括对患者来源的微器官球的上清液、环境和微环境中的一个或多个针对分泌因子和其他影响进行取样。在这些变型的任何一种中,可在分析后回收患者来源的微器官球用于进一步测定、扩增或保存(例如冷冻保存、固定等)供后续检查。

[0035] 如所述的,实际上可以使用任何测定法。例如,基因组、转录组、蛋白质组或宏基因组标志物(如甲基化)可使用本文所述的PMOSs进行分析。因此,本文所述的这些组合物和方法的任一种可用于鉴定或检查一种或多种标志物和生物/生理途径,包括例如外来体,其可有助于鉴定用于患者治疗的药物和/或疗法。

[0036] 可以使用任何合适的组织样品。在一些变型中,组织样品可包括来自转移肿瘤的活检样品。例如,组织样品可包括临床肿瘤样品;该临床肿瘤样品可包含癌细胞和基质细胞。在一些变型中,组织样品包含肿瘤细胞和以下一种或多种:间充质细胞、内皮细胞和免疫细胞。

[0037] 本文所述的任何方法可包括最初以任何适当的浓度将来自组织活检样品的解离细胞均匀地,或在一些变型中不均匀地,分布在整个流体基质材料中。例如,在一些变型中,本文所述的方法可包括将解离的组织样品和流体基质材料组合,使得解离的组织细胞分布在流体基质材料内达到小于1×10^{7}细胞/ml(例如,小于9×10^{6}细胞/ml、7×10^{6}细胞/ml、5×10^{6}细胞/ml、3×10^{6}细胞/ml、1×10^{6}细胞/ml、9×10^{5}细胞 /ml、7×10^{5}细胞/ml、5×10^{5}细胞/ml等)的密度。

[0038] 通常,形成液滴可包括由未聚合混合物的连续流形成液滴。例如,形成液滴可包括将一个或多个与未聚合混合物不混溶的流体的汇聚流施加到未聚合混合物的流中。这些流可以在微流体装置中合并,例如,具有多个汇聚通道的装置,未聚合的混合物和不混溶流体在该汇聚通道中相互作用以形成具有精确控制的体积的液滴。在一些变型中,液滴在过量

的不混溶材料中形成(例如,夹断),并且液滴可以同时和/或随后聚合以形成患者来源的微器官球。例如,流在其中汇聚的区域可被配置为在液滴形成后使未聚合混合物聚合,例如通过加热,和/或下游区域可被配置为在液滴形成和被不混溶的材料包围后使未聚合混合物聚合。在一些变型中,不混溶材料被加热(或者可选地被冷却)至促进未聚合材料聚合的温度,从而形成患者来源的微器官球。例如,聚合可包括将液滴加热至高于35℃。

[0039] 因此,在任何这些方法中,形成液滴可包括在与未聚合混合物不混溶的流体中形成液滴。此外,这些方法中的任何一种可包括将不混溶的流体与患者来源的微器官球分离。例如,这些方法中的任何一种可包括从患者来源的微器官球移除不混溶的流体。通常,不混溶流体可包括液体(例如油、聚合物等),尤其包括疏水材料或与未聚合(例如,水性)材料不混溶的其他材料。

[0040] 流体基质材料可以是合成或非合成的未聚合基底膜材料。在一些变型中,未聚合的基底材料可包含聚合水凝胶。在一些变型中,流体基质材料可包括MATRIGEL。因此,将解离的组织样品与流体基质材料组合可包括将解离的组织样品与基底膜基质组合。

[0041] 组织样品可在从患者移除组织样品后六小时内或更早(例如,约5 小时内、约4小时内、约3小时内、约2小时内、约1小时内等)与流体基质材料组合。

[0042] 本文还描述了分析或保存患者来源的微器官球的方法。例如,一种方法可以包括:将解离的组织样品和流体基质材料组合以形成未聚合混合物;形成未聚合混合物的多个液滴,液滴具有小于25%的尺寸变异;使液滴聚合以形成多个直径在50至700μm之间的患者来源的微器官球,其中分布有1至1000个解离的细胞;以及分析或冷冻保存多个患者来源的微器官球。

[0043] 在一些变型中,一种方法可以包括:将解离的组织样品和流体基质材料组合以形成未聚合的混合物;形成未聚合混合物的多个液滴;使液滴聚合以形成多个患者来源的微器官球,每个微器官球的直径在 50至500μm之间,其中分布有1至200个解离的细胞;以及在15 天内冷冻保存或分析多个患者来源的微器官球,其中微类器官被分析以确定一种或多种药剂对患者来源的微器官球内细胞的作用。

[0044] 例如,一种方法可以包括:将解离的组织样品和流体基质材料组合以形成未聚合混合物;通过将未聚合混合物的流与一个或多个与未聚合混合物不混溶的流体的流汇聚形成多个液滴,液滴的尺寸变异小于25%;通过加热使液滴聚合以形成患者来源的微器官球,每个微器官球的直径在50至500μm之间,其中分布有1至200个解离的细胞;以及在六次传代前对患者来源的微器官球进行分析或冷冻保存,从而维持患者来源的微器官球内细胞的异质性,进一步其中分析包括进行测定以确定一种或多种药剂对患者来源的微器官球内细胞的作用。

[0045] 在这些方法的任何一种中,多个患者来源的微器官球可在六次传代前冷冻保存或分析,从而维持患者来源的微器官球内细胞的异质性。这些方法中的任何一种可进一步包括在形成液滴之前对解离的组织样品中的细胞进行修饰。

[0046] 形成液滴可包括形成多个均匀尺寸的未聚合混合物的液滴,其尺寸变异小于约25%(例如,小于约20%、小于约15%、小于约10%、小于约7%、小于约5%等)。

[0047] 如上所述,这些方法中的任何一种可包括培养患者来源的微器官球适当的时间长度(例如,在分析前培养患者来源的微器官球2-14天)。例如,这些方法可包括在培养前从患

者来源的微器官球去除不混溶的流体。在一些变型中，培养患者来源的微器官球包括悬浮培养患者来源的微器官球。

[0048] 在本文所述的任何方法中，患者来源的微器官球可一起、整批培养。在一些变型中，例如，当形成文库时，可以一起培养根据大小和 /或细胞数量分选的患者来源的微器官球。患者来源的微器官球可以悬浮培养或分层培养(例如，在盘、室、管等内)。

[0049] 一般地，分析患者来源的微器官球可包括在分析或冷冻保存患者来源的微器官球之前和/或之后对患者来源的微器官球中的细胞进行基因组、转录组、表观基因组和/或代谢分析。这些方法中的任何一种可包括通过将患者来源的微器官球暴露于药物(例如药物组合物)来分析患者来源的微器官球。

[0050] 在这些方法的任何一种中，分析可包括人工和/或自动地目视测定一种或多种药剂对患者来源的微器官球中的细胞的作用。这些方法的任何一种可包括标志或标记患者来源的微器官球中的细胞以可视化。例如，分析可包括荧光测定一种或多种药剂对细胞的作用。

[0051] 本文所述的患者来源的微器官球本身是新颖的，并且可以被表征为物质组合物。例如，物质组合物可包含多个冷冻保存的患者来源的微器官球，其中每个患者来源的微器官球具有直径在50μm至500μm 之间的球形形状，并包含聚合的基础材料，以及分布在基础材料内的约1至1000个解离的原代细胞，该细胞传代少于6次，从而维持患者来源的微器官球内细胞的异质性。

[0052] 本文还描述了包含多个冷冻保存的患者来源的微器官球的物质组合物，其中每个患者来源的微器官球具有直径在50μm至500μm 之间的球形形状，其中患者来源的微器官球具有小于25％的尺寸变异，并且其中每个患者来源的微器官球包含聚合的基础材料，以及分布在基础材料内的约1至500个解离的原代细胞，其传代少于六次，从而维持患者来源的微器官球内细胞的异质性。

[0053] 原代细胞可以是原代肿瘤细胞。例如，解离的原代细胞可能已经遗传或生化修饰。多个冷冻保存的患者来源的微器官球可以具有均匀的尺寸，尺寸变异小于25％。在一些变型中，多个冷冻保存的患者来源的微器官球可包括来自各种不同来源的患者来源的微器官球。在任何这些微器官球中，每个微器官球中的大部分细胞可包含作为非干细胞的细胞。在一些变型中，原代细胞包括转移肿瘤细胞。原代细胞可包括癌细胞和基质细胞。在一些变型中，原代细胞包括肿瘤细胞和以下一种或多种:间充质细胞、内皮细胞和免疫细胞。

[0054] 原代细胞可以以小于例如5×10^7个细胞/ml、1×10^7个细胞/ml、 9×10^6个细胞/ml、7×10^6个细胞/ml、5×10^6个细胞/ml、1×10^6个细胞/ml、 9×10^5个细胞/ml、7×10^5个细胞/ml、5×10^5个细胞/ml、1×10^5个细胞/ml 等的密度分布在聚合的基础材料内。

[0055] 一般地，聚合的基础材料可包括基底膜基质(例如，MATRIGEL)。在一些变型中，聚合的基础材料包括合成材料。

[0056] 微类器官的直径可在50μm至1000μm之间，或更优选在50μm 至700μm之间，或更优选在50μm至500μm之间，或在50μm至 400μm之间，或在50μm至300μm之间，或在50μm至250μm之间等(例如，小于约500μm、小于约400μm、小于约300μm、小于约 250μm、小于约200μm等)。

[0057] 如所述的，本文所述的患者来源的微器官球可最初在每个患者来源的微器官球中包括任何适当数量的原代组织细胞，例如少于约200 个原代细胞，或更优选少于约150个原

代细胞，或更优选少于约100 个原代细胞，或更优选少于约75个原代细胞，或少于约50个细胞，或少于约30个细胞，或少于约25个细胞，或少于约20个细胞或少于约10个细胞，或少于约5个细胞等。在一些变型中，每个患者来源的微器官球包括约1-500个细胞、约1-400个细胞、约1-300个细胞、约1-200个细胞、约1-150个细胞、约1-100个细胞、约1-75个细胞、约1-50个细胞、约1-30个细胞、约1-25个细胞、约1-20个细胞等。

[0058] 本文还描述了用于形成患者来源的微器官球的设备，以及操作这些设备以形成患者来源的微器官球的方法。例如，本文描述了操作患者来源的微器官球形成设备的方法，包括：在第一端口中接收未聚合混合物，该未聚合混合物包含解离的组织样品的冷冻混合物和第一流体基质材料；在第二端口中接收与未聚合混合物不混溶的第二流体；将未聚合混合物的流与一个或多个第二流体的流组合以形成未聚合混合物的液滴，其具有变化小于25％的均匀尺寸；以及使未聚合混合物的液滴聚合以形成多个患者来源的微器官球。

[0059] 一种操作患者来源的微器官球形成设备的方法可包括：在第一端口中接收未聚合混合物，该未聚合混合物包含解离的组织样品的冷冻混合物和第一流体基质材料；在第二端口中接收与未聚合混合物不混溶的第二流体；将第一速率的未聚合混合物的流与第二速率的一个或多个第二流体的流组合以形成未聚合混合物的液滴，其具有变化小于 25％的均匀尺寸，其中液滴的直径在50μm至500μm之间；以及使未聚合混合物的液滴聚合以形成多个患者来源的微器官球。

[0060] 这些方法的任何一种可包括偶联与第一端口流体连通的包含未聚合混合物的第一储器。例如，该方法可包括将解离的组织样品和第一流体基质材料组合以形成未聚合混合物。在一些变型中，该方法包括将未聚合混合物添加到与第一端口流体连通的第一储器中。这些方法可包括偶联与第二端口流体连通的包含第二流体的第二储器。这些方法中的任何一种可包括将第二流体添加到与第二端口流体连通的第二储器中。在一些变型中，接收第二流体包括接收油。

[0061] 一般地，这些方法可包括将第二流体(例如，不混溶流体)与多个患者来源的微器官球分离。该流体可手动或自动地分离。例如，第二 (不混溶的)流体可以通过洗涤、过滤或任何其他合适的方法移除。

[0062] 使所述的流组合可包括以第一流速驱动未聚合混合物的流跨过以第二流速移动的一个或多个第二流体的流。在一些变型中，第一流速大于第二流速。流速和/或材料的量(例如，未聚合混合物可以与第二流体相比更少的量存在)中的任一或两者使得未聚合混合物被包封在精确控制的液滴中，如本文所述，其然后可以在例如第二流体中聚合。

[0063] 在一些变型中，使所述流组合包括驱动未聚合混合物的流跨过第二流体的一个或多个流也汇聚到其中的接合点。使液滴聚合可包括将液滴加热至高于未聚合材料聚合的温度(例如，高于约25℃、高于约 30℃、高于约35℃等)。

[0064] 这些方法的任何一种可包括对多个患者来源的微器官球进行等分。例如，等分到多孔盘中。

[0065] 本文还描述了使用这些患者来源的微器官球治疗患者的方法以及对其进行分析的方法。例如，一种方法可以包括：接收来自肿瘤的患者活检样品；在获取活检样品的2周内，通过以下方式确定肿瘤对药物制剂有反应：从患者活检样品形成多个直径在50至500μm之间的微器官球，其中在聚合的基础材料中分布1至200个解离的肿瘤细胞，并且在解离的

肿瘤细胞经历超过5次传代之前，将至少一些患者来源的微器官球暴露于药物制剂；以及测量药物制剂对该至少一些微器官球内的细胞的作用，以基于所确定的作用确定药物是否治疗肿瘤。

[0066] 在一些变型中，这些方法可包括通过在患者已经用药物制剂治疗后接受第二患者活检样品和从第二患者活检样品形成第二多个患者来源的微器官球，将第二多个患者来源的微器官球中的至少一些暴露于药物制剂，和测量药物制剂对该至少一些第二多个微器官球内的细胞的作用来确定在一次或多次药物施用后肿瘤仍对药物制剂有反应。

[0067] 确定肿瘤对药物制剂有反应可包括将至少一些患者来源的微器官球暴露于多种药物制剂，并对于每种药物制剂报告测量的作用。在一些变型中，确定进一步包括在分析患者来源的微器官球之前将微器官球分配到多孔板中。

[0068] 这些方法的任何一种可包括对患者进行活检以收集患者活检样品(或以其他方式从患者或患者来源的组织或细胞的样品中获取组织样品)和/或用药物制剂治疗患者，或协助医生治疗患者(例如，告知医生哪些药物制剂有效)。一般地，接收活检样品和报告之间的时间可以少于约21天(例如，少于约15天、少于约14天、少于约13天、少于约12天、少于约11天、少于约10天、少于约9天、少于约8 天、少于约7天等)。

[0069] 一般地，所描述的方法和设备配置为实现高包封效率，在处理过程中具有最少的样品/细胞损失。因此，如本文所述，可以从单一切除或活检的肿瘤样品有效地形成大量患者来源的微器官球。这些方法和系统可以克服与其他系统相关的问题，在所述其他系统中小的临床样品在处理过程中完全损失，而较大的临床样品无法达到足以建立类器官的密度。

[0070] 特别地，这些方法和设备可提供微流体系统，其从患者处接收解离的肿瘤样品(例如，单一肿瘤，尽管在一些实例中可提供多个肿瘤样品)并控制系统内的粘度和/或流速。路径长度和直径以及弯曲度(例如曲线)可被控制以防止解离细胞的堵塞和/或损害。

[0071] 例如，这些方法和设备可通过在微流体系统(其在一些实例中可被配置为可移除的盒)的通道内保持恒定或近乎恒定的压力来控制压力、流速(流量)或者压力和流速。该盒可以是一次性使用或可重复使用的。因此，流体(例如，解离细胞溶液和未聚合的基质材料)可以以恒定或接近恒定的压力泵送通过微流体系统。一般地，材料通过微流体系统的流可以是层流，特别是解离的细胞的流。可通过将流速保持在预定范围内(例如，0.01ml/min至100ml/min、0.01ml/min至50 ml/min、0.01ml/min至20ml/min、0.01ml/min至10ml/min、0.01 ml/min至5ml/min、0.05ml/min至100ml/min、0.05ml/min至50 ml/min、0.05ml/min至10ml/min、0.05ml/min至5ml/min、0.1ml/min 至100ml/min、0.1ml/min至50ml/min、0.1ml/min至10ml/min、0.1 ml/min至5ml/min、1ml/min至100ml/min、1ml/min至50ml/min、 1ml/min至20ml/min、1ml/min至10ml/min、1ml/min至5ml/min、 5ml/min至100ml/min、5ml/min至50ml/min、5ml/min至10ml/min 等)来维持层流。

[0072] 微流体系统内从解离细胞的输入到未聚合基质(和解离细胞)的液滴在其中形成的区域的路径长度可以小于例如10cm、小于9cm、小于8cm、小于7cm、小于6cm、小于5cm、小于4cm、小于3cm、小于2cm、小于1cm等。

[0073] 解离的细胞在其中通过的一个或多个通道的直径可配置为防止堵塞。例如，通道的直径可以大于80μm、大于100μm、大于120μm、大于150μm、大于200μm、大于250μm、大于300μ

m、大于400μm、大于450μm、大于500μm等(例如,80-500μm、100-500μm、120-500 μm、150-500μm、200-500μm等)。

[0074] 解离的细胞可在端口或室、容器等处加入微流体系统,该端口或室、容器通过短或非常短的管道(例如,小于20cm、小于15cm、小于10cm、小于7.5cm、小于5cm等)与微流体系统的输入流体偶联以最小化"死"区域。

[0075] 一般地,微流体系统的通道的几何形状可进行配置以避免堵塞。例如,一个或多个通道可以具有大于1mm(大于2mm、大于3mm、大于5mm、大于10mm、大于15mm、大于20mm、大于25mm、大于30mm、大于40mm、大于50mm等)的曲率半径。路径内所有或基本上所有角可以是平滑的、弯曲的或倒圆的(radiused)。

[0076] 微流体系统可包括一个或多个气泡去除室(例如,透气但不透液的膜和/或用于去除气泡的真空端口等)。

[0077] 一般地,微流体系统可以控制一个或多个通道内材料的温度(且因此控制粘度)。如所述的,承载解离的细胞和未聚合基质的通道可被冷冻并保持(在+/-1℃内或更好)至20℃或更低的温度(例如,18℃或更低、15℃或更低、12℃或更低、10℃或更低、7℃或更低、5℃或更低、4℃或更低、1-20℃、1-15℃、1-12℃、1-10℃、1-5℃、1-4℃等)。例如,该系统可包括集成的珀耳帖元件用于在处理过程中保持材料的粘度。在一些实例中,微流体系统上的多个温度区域可以仅在包封成功后控制基质材料的聚合。

[0078] 例如,本文描述了用于个性化癌症治疗的精确药物筛选的方法,该方法包括:从患者肿瘤接收单一组织样品;解离活检组织样品以形成解离的组织样品;通过以下方式从解离的组织样品形成超过1000 个患者来源的微器官球:驱动解离的组织样品和未聚合的流体基质材料通过微流体设备的一个或多个通道,其中微流体设备控制通道内的压力、流速或者压力和流速,并将解离的组织样品和未聚合的流体基质材料的温度保持在20℃或更低的温度,其中解离的组织样品在层流下移动通过一个或多个通道,将解离的组织样品和未聚合的流体基质材料在微流体设备内组合以形成未聚合混合物的多个液滴;将未聚合混合物的液滴暴露于高于25℃的温度以使流体基质材料聚合并形成患者来源的微器官球,其中患者来源的微器官球各自具有50-500μm 的直径,其中分布有1-200个解离的细胞;培养患者来源的微器官球 2-14天以形成成熟的患者来源的微器官球,其具有复制进行活检或切除的肿瘤的结构的结构化细胞簇;和通过将一个或多个成熟的患者来源的微器官球暴露于每种药物治疗平行地分析多种药物治疗。

[0079] 在本文所述的任何方法中,可在任何适当的测定法中对患者来源的微器官球进行分析,包括但不限于:3D生存力分析、成像、测定基因和/或蛋白质表达(例如,DNA、RNA、蛋白质组学、外来体等)。可以对细胞、患者来源的微器官球、作为患者来源的微器官球的部分形成的细胞外基质和/或其中培养患者来源的微器官球的上清液等进行分析。

[0080] 本文所述的任何方法,包括精确药物筛选分析,可筛选以下一种或多种:化学疗法、靶向剂和免疫疗法。例如,用于个性化癌症治疗的精确药物筛选的方法可包括筛选包括一种或多种化学治疗、靶向剂和免疫治疗的药物治疗。化学疗法或化疗剂指用细胞生长抑制剂或细胞毒性剂(即化合物)进行治疗以减少或消除不需要的细胞(例如癌细胞)的生长或增殖。因此,如本文所用,化学疗法或化疗剂指用于治疗增殖性疾病(例如癌症)的细胞毒性或细胞生长抑制剂。如本文所用,免疫疗法或免疫治疗剂通常促进免疫反应,例如,该药

剂可以是免疫刺激剂或免疫抑制性药物的抑制剂(即抗免疫抑制剂)。因此,该术语包括免疫原性组合物和疫苗。免疫治疗剂还可包括检查点阻断剂或抑制剂、嵌合抗原受体(CARs)和过继性T细胞治疗。

[0081] 微流体设备可将微流体设备全部或一部分的温度保持在冷却的目标温度范围(例如,约20℃或更低,例如约18℃或更低,约17℃或更低,约16℃或更低,约15℃或更低,约14℃或更低,约13℃或更低,约12℃或更低,约11℃或更低,约10℃或更低、约9℃或更低、约8℃或更低、约7℃或更低、约6℃或更低、约5℃或更低、约1℃至约20℃、约2℃至约15℃、约2℃至约10℃等)。微流体设备可包括例如用于冷却的珀耳帖装置。微流体设备可以冷却微流体设备的全部或一部分。例如,微流体设备可被配置为冷却输入样品、管道和/ 或微流体设备芯片,使得输入材料(例如组织样品)保持冷却。未聚合的流体基质材料也可以保持冷却。微流体设备可包括导热材料(例如,铝等),其可将冷却从冷却源(例如,珀耳帖)分配至任何或所有这些区域。微流体设备可包括一个或多个热传感器(例如,热敏电阻等)用于感测这些区域中的温度,并且可以包括控制反馈以使用传感器输入来调节温度。

[0082] 组织样品可以是活检的样品,包括切除的,和/或可以是细针抽吸物,和/或循环肿瘤细胞组织样品。组织样品可被急性获取(例如,在实施该方法(例如,精确药物筛选方法,包括形成患者来源的微器官球)的几分钟或几小时内获取)。例如,组织样品可以是“新鲜的”,并且可以在形成患者来源的微器官球的约12小时内、约8小时内、4 小时内、约3小时内、约2小时内、约1小时内等从患者获取。组织样品可以冷藏(例如,在约0℃至约20℃、约1℃至15℃、低于约15℃、低于10℃等)。

[0083] 该方法可包括基于患者来源的微器官球的反应来表征药物治疗的反应。患者来源的微器官球的形成可进一步包括基于细胞数量和/ 或液滴尺寸对患者来源的微器官球进行分选。例如,形成患者来源的微器官球可包括基于细胞数量和/或液滴大小对患者来源的微器官球进行光学分选。分选可以在聚合之前或之后进行。分选可包括基于其分选特征指导流体流以将特定PDMOs沉积到特定仓(例如室)中。

[0084] 分析可包括测定超过5种不同药物治疗(超过10种、超过15种、超过20种、超过30种、超过35种、超过40种、超过50种、超过 75种、超过100种、超过150种、超过200种、超过250种、超过 300种、超过500种、超过1000种等)。如本文所用,药物治疗可包括不同条件(浓度、载体等)的单一药物,或不同的给药方案(例如,重复的剂量、给药持续时间等),和/或不同组合和/或条件和/或给药方案的多种药物。例如,不同的药物治疗可包括一种或多种药物的不同浓度、三种或更多种药物的不同组合、两种或更多种药物的不同比率、一种或多种药物的不同载体和/或一种或多种药物的不同给药时间。

[0085] 形成超过1000个患者来源的微器官球包括形成超过5000个患者来源的微器官球(超过10,000个等),如上所述。

[0086] 微流体系统可以在形成液滴之前保持解离的组织样品和未聚合的流体基质材料的粘度。

[0087] 微流体系统一般可配置为防止一个或多个通道内解离组织样品的堵塞。例如,微流体系统可配置为通过具有100um或更大的通道直径来防止堵塞。微流体系统可被配置为在一个或多个通道内保持大致恒定的压力和/或流速。

[0088] 将未聚合混合物的液滴暴露于高于25℃的温度可包括将液滴暴露于30℃或更高

的温度(例如31℃或更高、32℃或更高、33℃或更高、 34℃或更高、35℃或更高、36℃或更高等)。

[0089] 将未聚合混合物的液滴暴露于高于25℃的温度可包括使液滴流入微流体设备的保持在高于25℃的温度下的区域a。在一些实例中,液滴可被输送出微流体设备用于在加热室中聚合。

[0090] 如所述的,微流体设备可以在一个或多个通道内保持恒定的流速。

[0091] 本文所述方法可包括测量每种药物治疗对患者来源的微器官内细胞的作用,以基于所测量的作用确定药物治疗是否治疗肿瘤。该方法可包括通过在患者接受药物治疗后接收第二患者肿瘤组织和从第二患者肿瘤组织形成第二多个患者来源的微器官球,使至少一些第二多个患者来源的微器官球暴露于药物治疗,并测量药物治疗对该至少一些第二多个患者来源的微器官球内的细胞的作用来确定在一次或多次药物施用后肿瘤仍对药物治疗有反应。

[0092] 如上所述,这些方法中任何一种可用于测试单一药物治疗,包括重复测试。

[0093] 该方法可包括用来自所述多种药物治疗中的药物治疗对患者进行治疗。

[0094] 在接收肿瘤组织样品到表征反应之间的时间可以少于21天(少于 20天、少于19天、少于18天、少于17天、少于16天、少于15天等)。

[0095] 患者肿瘤组织可包括来自转移肿瘤的活检样品。一般地,本文使用的肿瘤组织可以是上皮腺癌组织(如通过本文提供的所有实施例所示的)。

[0096] 一般地,这些方法可包括形成多个微类器官,包括形成尺寸和/ 或细胞数量变异小于25%的微类器官(例如,变异小于22%、变异小于20%、变异小于18%、变异小于15%、变异小于10%、变异小于 6%等)。较低的尺寸和/或细胞数量变异可能特别有助于使不同药物治疗之间的反应标准化。另外,可以使用或比较多种。分析多种药物治疗的步骤可包括测定具有相似大小和细胞数量的患者来源的微器官球。

[0097] 一般地,患者来源的微器官球可以复制其来源的组织的组织结构,例如,它们可以形成出芽的细胞簇和/或中空的细胞结构,从而复制对其进行活检或切除的肿瘤的结构。

[0098] 例如,用于个性化癌症治疗的精确药物筛选的方法,该方法可包括:从患者肿瘤接收单一活检或切除的组织样品;解离活检组织样品以形成解离的组织样品;通过以下方式从解离的组织样品形成多个患者来源的微器官球:驱动解离的组织样品和未聚合的流体基质材料通过微流体设备的一个或多个通道,其中微流体设备控制通道内的压力、流速或者压力和流速并将解离的组织样品和未聚合的流体基质材料的温度保持在20℃或更低的温度,其中解离的组织样品在层流下移动通过一个或多个通道,将解离的组织样品和未聚合的流体基质材料在微流体设备内组合以形成未聚合混合物的多个液滴;将未聚合混合物的液滴暴露于高于25℃的温度以使流体基质材料聚合并形成患者来源的微器官球,其中患者来源的微器官球各自具有50至500μm的直径,其中分布有1至200个解离的细胞,其中患者来源的微器官球根据大小、细胞数量或者大小和细胞数量两者进行分选;培养患者来源的微器官球2-14天以形成成熟的患者来源的微器官球,该微器官球具有复制被活检或切除的肿瘤的结构的结构化细胞簇;以及通过将每种药物治疗暴露于一个或多个成熟的患者来源的微器官球来测试药物治疗。

[0099] 如所述的,本文描述了用于形成器官球的设备。这些设备可配置为用于本文所述

的任何方法。例如，设备可包括：微流体组件，其包括：用于容纳未聚合混合物的容纳室；用于接收解离的组织样品的端口；用于接收不混溶流体的端口；多个微流体通道，其与容纳室、用于接收解离的组织样品的端口和用于接收不混溶流体的端口中的每一个连通；液滴形成组件，其接收来自用于容纳未聚合混合物的容纳室、用于接收解离的组织样品的端口和用于接收不混溶流体的端口中每一个的流体输入，以及从液滴形成组件延伸的聚合通道；与容纳室和一个或多个微流体通道偶联的压力源；一个或多个压力和/或流量传感器，用于检测多个微流体通道内的压力和/或流；和温度调节器；控制器，其控制压力源以调节多个微流体通道内和液滴形成组件内的流体流量；其中所述控制器控制微流体组件的温度，使得微流体组件的一部分的温度为20℃或更低，并且聚合通道的温度高于20℃；以及与聚合通道偶联以从液滴形成组件分配器官球的分配器。

[0100] 任何端口和室可为带阀的。例如，该设备可包括容纳室(例如未聚合混合物容纳室)和微流体通道之间的带阀端口。该设备可包括配置为接收不混溶流体的不混溶流体室，其中控制器对不混溶流体室加压。该设备可包括配置为接收解离的组织样品的组织室。组织室可以通过阀门与用于接收解离的组织样品的端口偶联。控制器可以控制 (使用温度调节器)组织室(组织样品容纳室)和/或未聚合混合物容纳室和/或不混溶流体容纳室的温度。温度调节器可包括一个或多个加热器、冷却器(例如，珀耳帖装置、压缩机、电阻加热器等)和/或用于控制温度的温度传感器(例如热敏电阻)。该设备可将组织样品容纳室和未聚合混合物容纳室，以及这些容纳室(或端口)和液滴形成组件之间，直至聚合通道的微流体路径冷却至20℃或更低。聚合通道可配置为被加热至高于未聚合混合物的基质的聚合温度。控制器可以控制(使用温度调节器)聚合通道的温度，使得其被加热至聚合温度或以上(例如 21-36℃、25-36℃等)。聚合通道可以与液滴形成组件的其他部分热隔离。例如，聚合通道可通过绝热材料和/或一个或多个气隙与液滴形成组件的其他区域分隔。聚合通道可以是远离液滴形成连接点延伸的细长线性通道，如本文所述。聚合通道可以比设备的其他微流体通道更宽。例如，聚合通道的宽度可为150μm或更大、200μm或更大、300 μm或更大、400μm或更大、500μm或更大、600μm或更大、700μm 或更大、800μm或更大、900μm或更大、1000μm或更大等。

[0101] 这些设备中的任何一个可包括至少部分地包围微流体组件的外壳。该设备还可以包括用于保持板(例如多孔板)的支架，例如板支架，器官球可以分配到该板中。分配器可以包括一个或多个传感器(例如光学传感器)用于在分配器官球时检测器官球(允许计数和/或质量控制)，并且可以包括用于定位分配尖端以分配到一个或多个孔中的机器人臂。

[0102] 一般地，这些设备配置为使用于形成器官球的解离细胞的存活和活力最大化。因此，可以如上所述控制温度，特别是解离的细胞的温度。在处理过程中冷却细胞可防止或限制细胞的损伤。另外，设备可配置为防止对解离的细胞的机械损伤并防止细胞的堵塞。例如，该设备可配置为在微流体组件内保持恒定的流体流。流体路径可以维持流体的层流，特别是围绕解离的细胞的流体。解离的细胞通过的通道(例如，从组织样品容纳室到液滴形成组件并在液滴形成组件内)可以基本上是平滑的，并且可以不包括急剧的弯曲(例如，大于60度、大于 55度、大于50度、大于45度等的弯曲)。通道可包括微流体通道；解离的细胞在被包封在基质材料中之前通过的所有通道可具有100 μm或更大的直径以防止被解离的细胞堵塞。解离的组织样品(细胞) 的路径可以保持为短的。例如，解离的组织样品通过设备经

过的路径的总长度可以小于10cm或更短(例如,9cm或更短、8cm或更短等)。

[0103] 例如,本文描述了用于形成器官球的设备,其包括:外壳;至少部分位于外壳内的微流体组件,该微流体组件包括:用于容纳未聚合基质混合物的未聚合混合物容纳室;用于容纳解离的组织样品的组织样品容纳室;用于容纳不混溶流体的不混溶流体容纳室;多个微流体通道,其与未聚合混合物容纳室、组织样品容纳室和不混溶流体容纳通道连通;液滴形成组件,其接收来自未聚合混合物容纳室、组织样品容纳室和不混溶流体容纳通道中每一个的流体输入;其中液滴形成组件包括从液滴形成组件延伸的聚合通道;与未聚合混合物容纳室、组织样品容纳室和不混溶流体容纳通道偶联的压力源;一个或多个压力和/或流量传感器,用于检测多个微流体通道内的压力和/或流;和温度调节器;控制器,其控制压力源以调节容纳室和多个微流体通道内的压力,从而控制液滴形成组件内的流;其中控制器控制微流体组件的温度,使得未聚合混合物容纳室、组织样品容纳室和微流体组件的一部分的温度为20℃或更低,并且使得聚合通道的温度高于20℃;以及与聚合通道偶联的分配器,用于分配在液滴形成组件内形成的器官球。如所述的,控制器可以对未聚合混合物容纳室和/或不混溶流体容纳室和/或组织样品容纳室进行加压。

附图说明

[0104] 本实用新型的新颖特征在随后的权利要求书中具体阐述。通过参考以下详细描述和附图将更好地理解本实用新型的特征和优点,该详细描述阐述了使用本实用新型原理的说明性实施方案,附图中:

[0105] 图1阐明了如本文所述的从原代组织(例如,活检)样品形成患者来源的微器官球的方法。

[0106] 图2A示意性地示出了用于形成本文所述的患者来源的微器官球的设备的一个实例,包括作为组件部分的微流体芯片。图2B是图2A 所示设备的微流体芯片部分的一个实例的透视图。图2C示意性地示出了用于形成患者来源的微器官球的设备(例如图2A所示的设备)的微流体组件的一部分。

[0107] 图3是示出从示例性活检样品形成的多个患者来源的微器官球的直径尺寸分布的图表。

[0108] 图4A-4E示出了分析多个患者来源的微器官球以确定对多种药物制剂的药物-响应曲线的方法的一个实例,在该实例中,所述微器官球由患者肿瘤活检样品形成。图示的程序从活检到结果花费不到两周(例如,大约一周)。

[0109] 图5示意性地示出了用于治疗患者的方法的示例,包括形成和使用多个患者来源的微器官球作为治疗过程的部分。

[0110] 图6示意性地示出了用于治疗患者的方法的实例,包括作为治疗过程的部分快速形成和分析多个患者来源的微器官球的多次重复。

[0111] 图7示意性地示出了用于形成如本文所述的多个患者来源的微器官球的设备的一部分的一种变型。

[0112] 图8示意性地示出了操作类似于图7所示的用于形成多个患者来源的微器官球的设备的方法。

[0113] 图9A-9B示出了使用本文所述的多个患者来源的微器官球来鉴定药物抗性的方法

的一个验证实例。图9A说明了传统(“2D”)肿瘤细胞分析方法的使用,其预测药物抗性。图9B示出了使用如本文所述的患者来源的微器官球方法的一个实例来分析药物抗性,其预测药物敏感性。

[0114] 图10A-10B示出了验证使用本文所述的患者来源的微器官球来鉴定药物抗性的另一个实例,显示了对奥沙利铂和伊立替康两者的预测药物反应,其与用这些药物治疗后的实际肿瘤反应一致。

[0115] 图11示出了使用如本文所述的患者来源的微器官球的药物筛选的一个实例,其中单一肿瘤活检样品可以极其快速地(例如,在不到两周的时间内)大量产生多个几乎相同的微器官球,并且可以针对大量药物制剂(例如,示出了27种)平行地进行快速测试。

[0116] 图12是比较传统类器官和从结肠直肠癌患者来源的类器官形成的微器官球对奥沙利铂的反应的图,显示了传统类器官和微器官球相当的反应。

[0117] 图13是比较传统类器官和从两种结肠直肠癌患者来源的异种移植物模型形成的微器官球对SN38(7-乙基-10-羟基-喜树碱)的反应的图,显示了相当的反应。

[0118] 图14是比较传统类器官和从结肠直肠癌患者来源的异种移植物模型形成的微器官球对5-FU(氟尿嘧啶)的反应的图,显示了相当的反应。

具体实施方式

[0119] 一般地,本文描述了患者来源的微器官球、用于形成它们的方法和设备以及用于使用它们例如测定组织(包括但不限于癌性组织)反应的方法和设备。

[0120] 本文所述的患者来源的微器官球通常是分布在基础材料内的由解离的原代细胞形成的球。这些患者来源的微器官球(“PMOSs”或“器官球”)可具有约50μm至约500μm(例如,约50μm至约400μm、约 50μm至约300μm、约50μm至约250μm等)的直径,并且最初可包含分布在基础材料内的约1至1000个解离的原代细胞(例如,约1至 750个、约1至500个、约1至400个、约1至300个、约1至200 个、约1至150个、约1至100个、约1至75个、约1至50个、约 1至40个、约1至30个、约1至20个等)。

[0121] 令人惊讶的是,尽管它们的尺寸小(通常在约50-250μm之间)且细胞密度低(例如,每个微器官球通常少于100个细胞),这些微器官球可以立即使用或培养非常短的时间段(例如,14天或更短、10天或更短、7天或更短、5天或更短等)并可允许微器官球内的细胞存活而同时保持其被提取的组织(包括肿瘤组织)的大部分(如果不是全部)特性。微器官球内细胞的存活率明显高,并且微器官球可通过多次传代培养数天(或数周),其中细胞将分裂、簇集并形成类似于亲本组织的结构。同样令人惊讶的是,在一些变型中,微器官球内来自解离的组织的细胞甚至在最小的微器官球内部形成形态结构;尽管在一些应用中,这些结构的存在对于这些微器官球的应用并非必要的(例如,它们可以在发生实质性结构重组织化之前使用),但在一些变型中,它们可能特别有用。

[0122] 本文所述的用于形成和使用微器官球的方法和设备可用于从单一活检样品产生许多(例如,超过10,000个)患者来源的微器官球。这些微器官球可用于筛选药物组合物,其可预测哪些治疗可有效应用于接受活检的患者。这可用于例如从健康的正常组织和/或癌性(例如肿瘤)组织筛选药物或其他化学组合物的毒性。特别地,患者来源的微器官球、用于形成它们的方法和设备以及用于测试它们的方法和设备可用于筛选以在接受药物治疗前

鉴别一种或多种可有效治疗患者(例如癌症患者)的药物组合物。例如,这可允许在癌症患者否则将接受可能对其无效的化学治疗几个月之前对其进行非常快速的筛查。

[0123] 因此,本文描述了使用单一患者特异性活检样品(或其他合适的组织/细胞来源)的高通量药物筛选方法(以及用于执行这些方法的设备)。本文描述了液滴形成的患者来源的微器官微球,其可由解离并悬浮在基底基质(例如,MATRIGEL)中的患者来源的肿瘤样品形成。微器官球可在微流体微孔阵列上图案化,孵育,和给药药物化合物。这种微型化分析最大限度地利用肿瘤样品,并使得能够以低得多的每样品成本从芯组织活检样品筛选更多的药物化合物。

[0124] 患者来源的癌症模型(PDMC)如细胞系、类器官和患者来源的异种移植物(PDXs)越来越多地被接受为"标准的"临床前模型以促进新治疗剂的鉴定和开发。例如,对源自癌症患者的细胞系和类器官的大规模药物筛选已被用于确定对大量潜在治疗剂的敏感性。PDXs还用于预测药物反应和鉴定新的药物组合。尽管正在通过探索这些各种不同的PDMC模型开发精准医疗策略,但其有效使用仍存在实质障碍。例如,患者来源的类器官(PDO)被认为在描绘患者肿瘤方面是最准确的,因为研究证明类器官的表型和基因型分型通常与原始患者肿瘤具有高度相似性。不幸的是,至少两个限制阻碍了使用PDO来指导治疗。首先,在类器官中开发和测试药物敏感性需要几个月的时间,这降低了临床适用性。其次,从临床相关的18号芯组织活检样品获得的类器官的数量不足以进行高通量药物筛选。理想地,应在7-10天内从单一芯组织活检样品进行分析。本文所述的微器官球及其制备和使用方法可解决这些临床限制。

[0125] 本文中阐述了本公开的主题的一个或多个实施方案的细节。在研究了本文中提供的信息后,对本文中描述的实施方案以及其他实施方案的修改对于本领域普通技术人员是显而易见的。本文中提供的信息,特别是所描述的示例性实施方案的具体细节,主要是为了清晰理解而提供的,而不应由此理解任何不必要的限制。如有冲突,应以本文的说明书(包括定义)为准。

[0126] 尽管本领域的普通技术人员相信本申请中使用的术语被很好地理解,但本文中给出的定义是为了便于解释本公开的主题。

[0127] 除非另有定义,本文中使用的所有技术和科学术语具有与本公开的主题所属领域的普通技术人员通常理解的相同的含义。尽管与本文所述类似或等同的任何方法、装置和材料可用于实施或测试本公开的主题,但现在描述代表性的方法、装置和材料。

[0128] 术语"未聚合混合物"在本文中用于指包含生物相关材料(包括解离的组织样品)和第一流体基质材料的组合物。流体基质材料通常是可聚合以形成用于分散于其中的解离组织(细胞)的支持物或支持网络的材料。一旦聚合,聚合的材料可形成水凝胶,并可由形成生物相容性介质(在细胞之外)的蛋白质形成或/和可包括形成生物相容性介质的蛋白质。根据本公开的主题使用的合适的生物相容性介质通常可由任何生物相容性材料形成,该材料在室温(例如25℃)下为凝胶、半固体或液体,如低粘度液体,并且可用作细胞、组织、蛋白质和其他感兴趣的生物材料的三维基质。可用于形成根据本公开主题的生物相容性介质的示例性材料包括但不限于包含胶原蛋白、纤维蛋白、脱乙酰壳多糖、MATRIGEL™(BD Biosciences,San Jose,Calif.)、聚乙二醇、葡聚糖(包括化学交联或可光交联的葡聚糖)等的聚合物和水凝胶,以及电纺的生物、合成或生物合成共混物。在一些实施方案中,生物

相容性介质由水凝胶组成。

[0129] 术语“水凝胶”在本文中用于指包含聚合物链的三维网络的双组分或多组分凝胶，其中水用作分散介质并填充聚合物链之间的空间。根据本公开的主题使用的水凝胶通常考虑将用于形成微器官球的参数，以及所选择的水凝胶对将被置于该结构中的生物悬浮液中合并的生物材料(例如细胞)的行为和活性的影响基于该结构的预期用途选择用于特定应用。本公开主题的示例性水凝胶可由聚合物材料组成，包括但不限于：藻酸盐、胶原蛋白(包括I型和VI型胶原蛋白)、弹性蛋白、角蛋白、纤连蛋白、蛋白聚糖、糖蛋白、聚乳酸、聚乙二醇、聚己内酯、polycolide、聚二氧六环酮、聚丙烯酸酯、聚氨酯、聚砜、肽序列、蛋白质和衍生物、寡肽、明胶、弹性蛋白、纤维蛋白、层粘连蛋白、聚甲基丙烯酸酯、聚乙酸酯、聚酯、聚酰胺、聚碳酸酯、聚酸酐、聚氨基酸、碳水化合物、多糖和改性多糖，及其衍生物和共聚物，以及无机材料，例如玻璃如生物活性玻璃、陶瓷、二氧化硅、氧化铝、方解石、羟基磷灰石、磷酸钙、骨以及上述所有的组合。

[0130] 进一步关于用于产生本文所述微器官球的水凝胶，在一些实施方案中，水凝胶由选自琼脂糖、藻酸盐、I型胶原蛋白、聚氧乙烯-聚氧丙烯嵌段共聚物(例如Pluronic®F127(BASF Corporation,Mount Olive,N.J.))、硅氧烷、多糖、聚乙二醇和聚氨酯的材料组成。在一些实施方案中，水凝胶由藻酸盐组成。

[0131] 本文所述的微器官球也可包括生物相关材料。短语“生物相关材料”可描述能够被包括在本文定义的生物相容性介质中并随后与生物系统相互作用和/或影响生物系统的材料。例如，在一些实施方式中，生物相关材料是磁珠(即，本身为磁性的或包含对磁场有响应的材料 (例如铁颗粒)的珠)，其可作为未聚合材料的部分组合以产生可用于所述方法和组合物(例如，用于分离和纯化微器官球)的微器官球。作为另一实例，在其他实施方式中，除解离的组织样品(例如活检样品)材料外，生物相关材料可包括另外的细胞。在未聚合混合物中，解离的组织样品和另外的生物相关材料在均匀的混合物中或作为分配的混合物(例如，仅在微器官球的一半或其他部分上，包括仅在形成的微器官球的核心或外部区域中)。在一些变型中，未聚合材料内的另外的生物相关材料可与处于悬浮液中的解离组织样品一起悬浮，例如在形成微器官球的液滴聚合之前。

[0132] 在一些变型中，可与解离的组织样品(例如活检样品)材料一起包括的生物相关材料可包含多种细胞类型，包括前脂肪细胞、间充质干细胞(MSCs)、内皮祖细胞、T细胞、B细胞、肥大细胞和脂肪组织巨噬细胞，以及在基质血管部分内发现的小血管或微血管片段。

[0133] 一般地，关于包括在本文所述的微器官球中的解离的组织样品 (例如活检样品)材料，这些组织可以是来自患者的任何合适的组织，通常通过活检获得。尽管可以使用非活检组织，但通常，这些组织(以及所得的解离细胞)可以是从如上所述的患者活检样品(例如通过针活检样品)获取的原代细胞。组织可以来自健康组织活检样品或来自癌性(例如肿瘤)细胞活检样品。基于该微器官球的预期用途，解离的细胞可被整合到本公开的主题的微器官球中。例如，相关组织(例如，解离的活检样品组织)通常可包括该组织或器官(或肿瘤等)中常见的细胞。就此而言，可整合到本公开主题的微器官球中的示例性相关细胞包括神经元、心肌细胞、肌细胞、软骨细胞、胰腺腺泡细胞、朗格汉斯氏岛、骨细胞、肝细胞、枯否细胞、成纤维细胞、成肌细胞、卫星细胞、内皮细胞、脂肪细胞、前脂肪细胞、胆道上皮细胞等。这些类型的组织可通过本领域已知的常规技术解离。合适的活检组织可来源于：骨髓、皮

肤、软骨、肌腱、骨、肌肉(包括心肌)、血管、角膜、神经、脑、胃肠、肾、肝、胰腺(包括胰岛细胞)、肺、垂体、甲状腺、肾上腺、淋巴、唾液腺、卵巢、睾丸、宫颈、膀胱、子宫内膜、前列腺、外阴和食管组织。可以使用正常或患病(例如,癌性)组织。在一些变型中,组织可能源自肿瘤组织,包括源自任何这些正常组织的肿瘤。

[0134] 一旦形成,微器官球可以冷冻保存和/或培养。培养的微器官球可以保持在悬浮液中,为静态的(例如,在孔、小瓶等中)或在运动中(例如,转动或搅动)。可以使用已知的培养技术培养微器官球。示例性技术可特别地在Freshney,Culture of Animal Cells,A Manual of Basic Techniques,4th ed.,Wiley Liss,John Wiley&Sons,2000;Basic Cell Culture:A Practical Approach,Davis,ed.,Oxford University Press,2002; Animal Cell Culture:A Practical Approach,Masters,ed.,2000;及美国专利No.5,516,681和5,559,022中找到。

[0135] 在一些变型中,微器官球通过在不混溶材料如流体疏水材料(例如,油)中形成解离组织材料和流体基质材料的未聚合混合物(例如,在一些变型中,冷冻的混合物)的液滴而形成。例如,微器官球可通过将未聚合材料的流与一个或多个不混溶材料的流组合以形成液滴而形成。液滴中存在的细胞的密度可通过未聚合材料中的解离材料 (例如,细胞)的稀释来确定。微器官球的尺寸可能与所形成液滴的大小相关。一般地,微器官球是具有稳定几何形状的球形结构。

[0136] 除非另有说明,本公开的主题的实施可采用本领域技术范围内的细胞生物学、细胞培养、分子生物学、转基因生物学、微生物学、重组DNA和免疫学的常规技术。这些技术在文献中有充分解释。参见例如Molecular Cloning A Laboratory Manual(1989),2nd Ed.,ed. Sambrook,Fritsch and Maniatis,eds.,Cold Spring Harbor Laboratory Press,16和17章;美国专利No.4,683,195;DNA Cloning,I和II卷, Glover,ed.,1985; Oligonucleotide Synthesis,M.J.Gait,ed.,1984; Nucleic Acid Hybridization, D.Hames&S.J.Higgins,eds.,1984; Transcription and Translation,B.D.Hames&S.J.Higgins,eds.,1984; Culture Of Animal Cells,R.I.Freshney,Alan R.Liss,Inc.,1987;Immobilized Cells And Enzymes,IRL Press,1986;Perbal(1984),A Practical Guide To Molecular Cloning;参见Methods In Enzymology (Academic Press,Inc.,N.Y.);Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells,J.H.Miller和M.P.Calos,eds.,Cold Spring Harbor Laboratory, 1987;Methods In Enzymology,154和155卷,Wu et al.,eds.,Academic Press Inc.,N.Y.;Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology(Mayer和Walker,eds.,Academic Press,London,1987; Handbook Of Experimental Immunology,I-IV卷,D.M.Weir和C.C. Blackwell,eds.,1986。

[0137] 如本文所用,药物组合物可包括任何药物、药物稀释物、药物制剂、包括多种药物(例如多种活性成分)的组合物、药物配方、药物形式、药物浓度、联合疗法等。在一些变型中,药物制剂指包含药物和一种或多种非活性成分的混合物的制剂。

[0138] 本文使用的术语“传代”可指微器官球内细胞的平均倍增数。尽管传统的传代次数是指细胞从一个培养容器转移或分培养至另一个培养容器,但微器官球内的细胞可稳定地保留在相同的微器官球内,并可继续生长和分裂。因此,本文所用的传代次数通常指从微器官球内来自活检组织的解离的细胞经历的平均倍增数。群体倍增数是细胞群体自分离后

(例如,自新分离的活检组织形成微器官球后)经历的大约倍增数。一般地,本文所述的微器官球可相对于微器官球内一些或全部细胞的生长(例如倍增)培养较短的时间(例如,少于10次传代、少于9次传代、少于8次传代、少于7次传代、少于6次传代、少于5 次传代、少于4次传代、少于3次传代等)。

[0139] 在培养过程中,微器官球中来自解离的活检组织的细胞可以在微器官球内聚集、簇集或组装。细胞的聚集体可以是高度组织化的,且可以形成限定的形态或可以是簇集或粘附在一起的细胞团。组织化可以反映起源组织。尽管在一些变型中,微器官球可包含单一细胞类型 (同型的),但更典型地,这些微器官球可包含多于一种细胞类型(异型的)。

[0140] 如所述的,用于形成患者来源的微器官球的(例如,活检样品)组织(例如,解离的组织)可以源自正常或健康的生物组织,或者源自患有疾病或病态的生物组织,例如源自肿瘤的组织或流体。微器官球中使用的组织可包括免疫系统的细胞,例如T淋巴细胞、B淋巴细胞、多形核白细胞、巨噬细胞和树状细胞。细胞可以是干细胞、祖细胞或体细胞。组织可以是哺乳动物细胞(例如人细胞)或来自动物(例如小鼠、大鼠、兔等)的细胞。

[0141] 一般地,这些组织(和所得的细胞)通常可以从活检样品获取以形成微器官球。因此,组织可以源自活检样品、外科手术样本、抽吸、引流或含细胞流体中的任何一种。合适的含细胞流体包括血液、淋巴液、皮脂液、尿、脑脊液或腹膜液中的任何一种。例如,在具有种植性转移的患者中,可以从腹膜液分离卵巢癌或结肠癌细胞。类似地,在患有子宫颈癌的患者中,子宫颈癌细胞可以从子宫颈获取,例如通过大面积切除转化区或通过芯组织活检。典型地,这些微器官球包含存在于起源的组织或流体中的多种细胞类型。细胞可以直接从受试者获得,而无需中间分培养步骤,或者它们可以首先经历中间培养步骤以产生原代培养物。用于从生物组织和/或含细胞的流体收获细胞的方法在本领域中是众所周知的。例如,用于从生物组织获得细胞的技术包括R.Mahesparan(Extracellular matrix-induced cell migration from glioblastoma biopsy specimens in vitro.Acta Neuropathol (1999) 97:231-239)描述的技术。

[0142] 通常,在形成微器官球之前,细胞首先解离或相互分离。细胞的解离可通过本领域已知的任何常规方法完成。优选地,细胞通过机械和/或化学方式处理,例如通过用酶处理。“机械处理”包括破坏相关细胞之间连接的含义,例如,使用手术刀或剪子或者使用如均质机的仪器。“酶处理”包括用一种或多种酶处理细胞以破坏相关细胞之间的连接的含义,包括例如胶原酶、分散酶、DNAse和/或透明质酸酶的任何一种。一种或多种酶可在不同的反应条件下使用,例如在37℃水浴中或室温下孵育。

[0143] 解离的组织可被处理以去除死亡和/或濒死的细胞和/或细胞碎片。可以通过本领域技术人员已知的任何常规方式(例如使用珠和/或抗体方法)去除这类死亡和/或濒死细胞。例如,已知在凋亡或死亡细胞中磷脂酰丝氨酸从质膜内叶重新分布到质膜外叶。膜联蛋白V-生物素结合,然后将生物素结合到链霉亲和素磁珠上的使用能够将凋亡细胞与活细胞分离。类似地,细胞碎片的去除可通过本领域的任何合适技术实现,包括例如过滤。

[0144] 在与流体基质材料组合之前,解离的细胞可悬浮在载体材料中,和/或流体基质材料可称为载体材料。在一些变型中,载体材料可以是具有在聚合和形成微器官球之前延迟细胞在细胞悬浮液中沉淀的粘度水平的材料。载体材料可具有足够的粘度以允许解离的活检样品组织细胞保持悬浮在悬浮液中直至聚合。本领域技术人员可以通过监测各种不同粘

度下的沉降速率并选择以达到将细胞悬液装载到形成微器官球的设备中到通过聚合包括细胞的未聚合材料的液滴形成微器官球之间的预期时间延迟的沉降速率来优化实现这一目的所需的粘度。在一些变型中，即使在使用较低粘度材料的情况下，未聚合的材料也可以通过设备流动或搅拌，以保持细胞处于悬浮中和/或根据需要分布。

[0145] 如上所述，在一些变型中，未聚合的混合物(包括解离的组织样品和流体基质材料)可包括一种或多种组分，例如生物相关材料。例如，可包含的生物相关材料可包括以下任何一种：细胞外基质蛋白(例如纤连蛋白)、药物(例如小分子)、肽或抗体(例如，用于调节细胞存活、增殖或分化中的任何一种)；和/或特定细胞功能的抑制剂。这些生物相关材料可用于，例如，通过减少细胞死亡和/或激活细胞生长/ 复制来提高细胞的存活力，或以其他方式模拟体内环境。生物相关材料可包括或可模拟以下组分的一种或多种：血清、白细胞介素、趋化因子、生长因子、葡萄糖、生理盐、氨基酸和激素。例如，生物相关材料可以补充流体基质材料中的一种或多种试剂。在一些变型中，流体基质材料是合成凝胶(水凝胶)，并且可以通过一种或多种生物相关材料补充。在一些变型中，流体基质为天然凝胶。因此，凝胶可由一种或多种细胞外基质组分组成，例如胶原蛋白、纤维蛋白原、层粘连蛋白、纤连蛋白、玻连蛋白、透明质酸、纤维蛋白、藻酸盐、琼脂糖和脱乙酰壳多糖中的任何一种。例如，MATRIGEL包含对细胞存活力、增殖、发育和迁移重要的生物活性聚合物。例如，基质材料可以是包含1型胶原蛋白的凝胶，例如从大鼠尾获得的1型胶原蛋白。该凝胶可以是纯的1型胶原蛋白凝胶，或可以是除其他组分(例如其他细胞外基质蛋白)外还含有1型胶原蛋白的凝胶。合成凝胶可指自然界中天然不存在的凝胶。合成凝胶的实例包括源自聚乙二醇(PEG)、聚甲基丙烯酸羟乙酯(PHEMA)、聚乙烯醇(PVA)、聚氧化乙烯(PEO) 中的任何一种的凝胶。

[0146] 患者来源的微器官球

[0147] 患者来源的微器官球的实例中细胞来源于结肠直肠癌(CRC)组织。例如，形成的每个微器官球具有单个细胞。微器官球的尺寸全部大致相同，例如，直径约300μm。在培养3天后的同时形成的微器官球细胞大小已经扩大，在一些情况下，倍增和/或生长。到培养7 天，细胞已倍增多次，显示细胞簇或细胞团。

[0148] 类似的结果分别显示了由每个微器官球五个细胞或每个微器官球二十个细胞形成的微器官球。微器官球在形成后立即显示，和培养五天，其中近乎相同的微器官球(例如，具有相同的直径)各自含每个微器官球10个细胞。微器官球在形成后立即显示，在第0天仍被不混溶流体(在这种情况中为油)包围。将微器官球从不混溶流体移除并洗涤，且培养五天。2天后的微器官球、3天后的微器官球及4天和5 天后的微器官球显示，微器官球内来自活检样品的解离的组织(细胞) 在几乎所有微器官球内为存活的并以相当的速率生长。如将在此更详细描述的，这些微器官球可由甚至单一的平均大小的活检样品大量形成，并可产生数百或数千个(例如，500、750、1000、2000、5000、 10,000个或更多)包含显著量活细胞的微器官球，从而允许平行进行多个快速分析。

[0149] 如本文所述从小鼠肝脏的解离活检样品形成的微器官球的实例中，小鼠肝细胞从正常(例如，未患病)小鼠肝获得。例如，显示了分布在聚合的流体基质材料(在本实例中，为MATRIGEL)内的小鼠肝细胞。每个微器官球包括聚合的基质材料，其形成具有例如约300μm直径的球，其中分散设定数量的肝细胞。显示了在活检、解离和形成微器官球后一天的微器官球。然后将这些微器官球培养10天，在此期间，细胞(肝细胞)保持存活并生长，在许多情

况下倍增多次以形成结构。

[0150] 微器官球通常可以在微器官球内以固定或已知的细胞数量和/或浓度(细胞/ml或细胞/mm^3)包括解离(例如活检)的组织(例如,细胞)。如上所述,该基质材料可以是天然聚合物,例如以下一种或多种:藻酸盐、琼脂糖、透明质酸、胶原蛋白、明胶、纤维蛋白、弹性蛋白;或合成聚合物,例如以下一种或多种:聚乙二醇(PEG)和聚丙烯酰胺。有机和无机合成聚合物均可使用。

[0151] 在一些变型中,最初包含在微器官球中的细胞数量可以在1个细胞到几百个细胞之间选择。特别是,在一些分析(例如药物毒性分析) 中,包含约1-75个或约1-50个(例如较低细胞数量)可能是有益的。每个微器官球的细胞数量可由用户设定或选择。在一些变型中,如下所述,设备将包括一个或多个控制以设定来自原代组织的细胞包括在每个微器官球中的数量。可以基于用户预定如何使用微器官球来选择或设置细胞数量。例如,细胞数量非常少的微器官球(例如,每个微器官球1个细胞,每个微器官球1-5个细胞等)可能特别适合于研究克隆多样性(例如,肿瘤异质性)。由于每个微器官球从单一细胞生长,我们可以观察到哪些克隆具有抗药性,并且可以对这些特定的微器官球进行检查(例如通过基因组测序)以确定与特定克隆相关的基因组 (突变)多样性。每个微器官球的低至中等细胞数量(例如,约3-30个细胞、5-30个细胞、5-25个细胞、5-20个细胞、10-25个细胞等)可能对于快速药物测试特别有用,包括毒性测试,因为这些微器官球通常快速生长。每个微器官球的较大细胞数量(例如,约20-100个细胞,例如30-100个细胞、40-100个细胞、大于50个细胞等)可能特别适合于在每个微器官球中模拟组织组成,因为微器官球可包含不同的谱系,可能包括上皮(或癌症等)和间充质(或基质、免疫、血管等)细胞。

[0152] 微器官球可形成任何合适的尺寸,其可与待包含的细胞数量相匹配。例如,尺寸可小至约20μm,直径可达500μm(例如平均50或100 μm,例如约100-200μm等)。在一些变型中,尺寸约为300μm,其中每个微器官球中包含约10-50个细胞(例如,约10-30个细胞)。细胞的数量和尺寸可以变化和/或可以控制。在一些变型中,微器官球的细胞数量和/或尺寸可以通过形成微器官球的设备上的一个或多个控制来设置。例如,可以通过调整解离的组织样品(例如来自活检样品的细胞)的流速和/或浓度来调节微器官球的尺寸和/或微器官球内的细胞密度。

[0153] 即使在培养后,本文所述的微器官球仍允许存活和健康的细胞通过微器官球的整个体积。微器官球的尺寸和/或微器官球中包含的细胞数量可基于微器官球的预期或预定使用方式进行选择。例如,在其中将使用微器官球用于检查活检样品材料的细胞之间的关系的变型中,微器官球可以形成为具有多个细胞,并且可以长时间培养(例如,达到一周或更长时间)。

[0154] 本文所述的患者来源的微器官球可以通过将解离的组织样品(例如活检样品)与可以受控的方式聚合以形成微器官球的流体基质组合而制成。图1示出了形成患者来源的微器官球的一种方法。任选地,该方法可包括从患者获取样品,例如从患者组织获取活检样品601。如上所述,可以获取活检样品,例如使用活检样品针或穿孔机。例如,可以用14号、16号、18号等的针获取活检样品,其插入患者组织中以取出活检样品。在将组织从患者体内取出后,可对组织进行机械和 /或化学处理以使材料解离。如所述的,解离的细胞可立即用于形成患者来源的微器官球;在一些变型中,所有或部分细胞可被修饰,例如通过对细胞进行

遗传修饰603，例如通过转染、电穿孔等。

[0155] 来自活检样品材料的解离组织样品可以与流体(例如，液体)基质材料组合以形成未聚合混合物605。这种未聚合混合物可以保持在未聚合的状态，使得来自解离组织的细胞可以保持悬浮在混合物内。在一些变型中，通过将细胞保持冷冻，例如在低于室温(例如1-25℃)下，细胞可能仍保持悬浮和未聚合。

[0156] 然后，未聚合混合物可以例如作为液滴分配到不混溶的材料(例如油)中，其方式使得控制液滴尺寸的形成且因此控制形成的患者来源的微器官球的尺寸607。例如，可以通过将未聚合材料的流与一个或多个(例如，两个汇聚的)不混溶材料(例如，油)的流组合来形成尺寸均匀的液滴，使得这两种流的流速和/或压力可以决定未聚合材料的液滴在与不混溶材料交叉时如何形成。液滴可以聚合609以在不混溶的材料中形成患者来源的微器官球。在一些变型中，不混溶材料可被加热或升温至导致未聚合混合物(例如，未聚合材料中的流体基质材料)聚合的温度。一旦形成，患者来源的微器官球可从不混溶流体分离，例如，可洗涤PMOSs以去除不混溶流体611，并将其置于培养基中以允许患者来源的微器官球内的细胞生长。患者来源的微器官球可培养任何所需的时间，或可冷冻保存和/或立即进行分析。在一些变型中，患者来源的微器官球可培养一段短时间(例如，1-3天、1-4天、1-5天、1-6天、1-7天、1-8天、1-9天、1-10天、1-11天、1-14天等)。这可以允许源自解离的活检组织的细胞生长和/或分裂(例如，加倍)达五或六次传代。培养后，可对细胞进行冷冻保存615和/或分析617。本文还描述了可使用的分析的实例。

[0157] 在本文所述的这些方法和设备的任何一种中，微器官球可在聚合后从不混溶流体(例如，油)回收。例如，在一些变型中，微器官球可以通过破乳化和/或去乳化来回收，例如，通过形成乳化液滴并在液滴形成后回收微器官球以去除任何油(和其他污染物)。这可以允许细胞在聚合的液滴(微器官球)内生长而不受不混溶流体的抑制。

[0158] 尽管本文所述的方法和设备举例说明了通过将未聚合混合物流化到一个或多个不混溶流体(例如油或其他疏水材料)的流中来形成多个液滴并因此形成多个微器官球的方法，但在一些变型中，液滴可通过可允许液滴的尺寸如本文所述受到控制的其他方法形成。例如，在一些变型中，液滴可以通过打印(例如，通过将液滴打印到表面上)形成。这可以减少或消除对另外的乳化/去乳化回收步骤的需求。例如，液滴可以打印到表面上，例如平面或成型表面，并聚合。在任何这些变型中，液滴可以使用压力、声音、电荷等进行分配。在一些变型中，液滴可使用适应于将少量未聚合的混合物释放到表面上、空气中和/ 或液体介质(包括不混溶流体)中的自动分配器(例如移液装置)形成。

[0159] 用于形成患者来源的微器官球的方法可以是自动化的，或使用一个或多个设备进行。特别地，形成患者来源的微器官球的方法可以通过允许选择和/或控制患者来源的微器官球的尺寸(以及因此控制细胞数量的密度)的设备来执行。例如，图2A示出了用于形成所述的患者来源的微器官球的设备700的一个示例。

[0160] 在图2A中，该设备通常包括用于输入解离组织样品和流体基质材料(已经组合)的未聚合混合物的输入装置，或者可以单独地接收解离的组织样品(例如在保存溶液中)和流体基质材料。在一些变型中，该设备包括用于容纳未聚合混合物的容纳室706，和/或用于容纳解离的组织(例如活检)样品和容纳流体基质材料的容纳室(未示出)。这些容纳室中的任何一个或全部可以被加压以控制和/或加速流体流出容纳室和流入装置中。设备可以接收

未聚合混合物，或可以接收多个组分并使其混合。在一些变型中，该设备可以控制未聚合混合物中细胞的浓度，并且可以稀释该混合物(例如，通过添加另外的流体基质材料以达到期望的密度)。例如，该设备可以包括用于读取未聚合混合物中细胞的密度(例如光密度)的传感器(例如光学阅读器)(未示出)。传感器还可偶联至控制器724，其可自动或半自动地(例如，通过向用户指示)控制未聚合混合物中细胞的稀释。该设备还可包括用于接收未聚合混合物的端口。该端口可包括阀或可与阀偶联，并且阀可由控制器724(或单独的控制器)控制。用于容纳未聚合混合物的室和/或

[0161] 设备700可包括用于容纳和/或接收不混溶流体的室708和/或端口。在一些变型中，不混溶流体可以被容纳在加压室中，使得可以控制流速。任何加压室可由控制器724控制，其可使用一个或多个泵726 来控制压力，且因此控制通过设备的流量。系统中可包括一个或多个压力和/或流量传感器以监测通过该装置的流。

[0162] 在图2A中，整个设备700可以被包围在外壳702中，或者设备 704的一部分可以被包围在外壳中。在一些变型中，外壳可包括在装置上的一个或多个开口或接入部分，例如用于添加不混溶流体和/或未聚合混合物。

[0163] 如所述的，这些设备700中的任何一种还可以包括一个或多个传感器728用于监测制造过程的全部或关键部分。在一些变型中，传感器可以包括光学传感器、机械传感器、电压和/或电阻(或电容或电感) 传感器、力传感器等。这些传感器可用于监测组件的持续运行，包括患者来源的微器官球的形成。设备700还可包括一个或多个热/温度调节器718用于控制不混溶流体和/或未聚合的混合物(和/或流体基质材料)中任一或两者的温度。

[0164] 这些设备中的任何一种还可包括一个或多个可被监测(例如，使用一个或多个传感器)的液滴形成组件720，如以下图2C所示。液滴微器官球形成组件可包括分配器(例如，PMOS分配器)722(或可与其偶联)。分配器可以分配到例如多孔板716中。

[0165] 一般地，液滴微器官球形成组件720可包括一个或多个微流体芯片730或结构，其形成和控制未聚合混合物的流并形成实际的液滴。图2B示出了用于形成患者来源的微器官球的微流体芯片730的一个实例。在图2B中，芯片730包括一对用于形成微器官球的平行结构。图2C示出了用于形成PMOS的微流体芯片的液滴形成区域，包括未聚合通道出口741，其开放(在本例中为直角)通道出口741和不混溶流体出口743，743’“+”字型接合区或交叉区域737。在一些变型中，来自不混溶流体通道的输入可以相对于与未聚合材料的角度(和交叉点)成一定角度。在图2C中，如同本说明书中显示尺寸的所有附图一样，所示尺寸仅是示例性的，而非旨在是限制性的，除非另有说明。

[0166] 在图2A中，微流体芯片730包括不混溶流体进入芯片中(例如，从图2A所示的入口端口或储存室)的入口(输入端口)733。进入芯片的第二入口端口735可被配置为接收未聚合材料并将其沿半扭曲路径传输至接合区域。类似地，如上所述，不混溶流体的入口端口可以牢固地与不混溶流体室或入口的出口偶联。

[0167] 用于未聚合材料进入芯片中的入口端口735可通过将入口275连接至接合区域的输送路径741偶联(如图2C所示)。类似地，用于不混溶流体的入口733可与连接到达到接合区域737的两条(或更多条) 连接路径743，743’。离开接合区域737的通道可将形成的微器官球(在不混溶流体中)沿通道传递至出口731，出口731可连接至分配器(未示出)用于从微器官球分配至一个或多个室中，例如用于培养和/或分析。

[0168] 在图2B和2C所示的实例中，形成的液滴(其一旦聚合可变成微器官球)可在从设备(未示出)分配之前，沿长的温度受控的微流体环境传输。例如，在显示为透明的通道区域(例如，图2B中的元件739) 的一个实例，其包含多个微器官球，每个微器官球包含预定数量的细胞，其中聚合后不久的患者来源的微器官球在从设备等分之前悬浮在包含不混溶流体(例如油)的通道内。

[0169] 在另一实例中，接合区域如上所述成型，使得承载未聚合混合物的通道与一个或多个(例如两个)承载与未聚合混合物不混溶的流体 (例如油)的通道交叉。在未聚合混合物被加压而以第一速率流出第一通道时，交叉通道中不混溶流体流动允许预定量的未聚合混合物在被夹断以形成液滴之前通过，液滴传送到出口通道中。因此，在一些变型中，切碎(例如，解离)的临床(例如，活检或切除的)组织样品(例如，直径小于1毫米)可与温度敏感凝胶(即，4℃下，MATRIGEL)混合以形成未聚合混合物。该未聚合混合物可被置于微流体装置中，其可产生体积和材料组成均一的液滴(例如，油包水液滴)。同时，解离的肿瘤细胞可被分配到这些液滴中。未聚合材料中的凝胶可在加热时(例如在37℃下)固化，并可形成最终的患者来源的微器官球。在一些变型中，该方法可用于从组织(例如活检样品材料)产生超过10,000个(例如，超过20,000、超过30,000、超过40,000、超过50,000、超过60,000、超过70,000、超过80,000、超过90,000、超过100,000个)均匀液滴(患者来源的微器官球)。这些患者来源的微器官球与传统的3D细胞培养技术相容。

[0170] 在上述示例性微流体芯片中，接合区显示为T形或X形接合区，其中微流体器件的流聚焦形成可控尺寸的微器官球。在一些变型中，液滴可通过机器人微移液到例如不混溶流体中和/或固体或凝胶基质上形成，而非通过微流体芯片。或者，在一些变型中，未聚合材料的液滴可以通过微毛细生成以必要的尺寸和重现性形成。可替代地用于从未聚合材料形成指定尺寸范围和可再现性的微器官球的技术的其他实例可包括胶体操作，例如通过外力，例如声学、磁力、惯性、电润湿或重力。

[0171] 在如上所述形成的油中的患者来源的微器官球的实例中，源自单一活检样品的这些患者来源的微器官球内的细胞是存活的，如通过活体染料染色看到的。例如，具有肿瘤细胞的微器官球可被洗涤以去除不混溶的材料(例如油)。这种不混溶的材料可以在形成微器官球后相对快速地去除，以防止对微器官球内的细胞造成伤害。

[0172] 在这些实例中，凝胶液滴从油相回收并重新悬浮，例如，通过 PFO(全氟辛醇)和离心重新悬浮到PBS中。这可以将不混溶流体与微器官球分离。因此，这些微器官球，包括基于肿瘤的微器官球，可以成功生长。这是一项重要的改进，因为必须对活的和生长中的原代肿瘤细胞进行药物筛选以预测患者结果，这些原代肿瘤细胞保留患者肿瘤的特性。如下文所述，这些微器官球的高数量和均一性使得筛选成为可能和可靠。

[0173] 在本文所述的任何微流体芯片或装置中，通道可以被涂覆。例如，微流体装置的通道可以涂覆有疏水材料。

[0174] 一般地，本文所述的微器官球的直径高度均匀，并且可能具有非常低的尺寸(例如直径)差异。这例如在图3中示出，其显示了液滴直径尺寸的一个实例的分布。

[0175] 如所述的，如本文所述形成由解离的组织活检样品和流体基质材料在聚合后形成的多个患者来源的微器官球；这些微器官球用台盼蓝 (箭头)染色，表明它们是活的。以这种方式作为液滴形成的微器官球可能包含生长因子和基质以模拟其所产生的组织的生物

环境。患者样品(例如,活检样品)可在获取组织后的几小时内形成为微器官球(包括数百、数千或数万个微器官球)。微器官球可具有每个微器官球少至1 个或4-6个细胞(例如,肿瘤取样时的癌细胞),或多达数百个细胞。这些方法被证明适用于迄今为止测试的几乎所有类型的癌症和非癌症组织(n=20),包括结肠、食管、黑色素瘤、子宫、肉瘤、肾、肝、卵巢、肺、横隔膜、网膜、纵膈肺和乳腺癌组织。微器官球可培养任何所需的时间,且通常在少至3-4天内显示出增殖和生长。它们可能维持和传代数月。如下文更详细描述的,它们可用于在获取组织(例如活检样品)后少至4-6天内筛查数千种药物组合物。

[0176] 本文所述的微器官球可在形成后的任何时间点进行库存,例如通过冷冻保存它们。肿瘤微器官球可从许多不同患者收集,并可单独或共同使用用于筛选多种药物制剂以确定毒性和/或功效。非肿瘤细胞 (健康组织)可平行地进行活检、库存和/或筛查。因此,这些方法和设备可以允许高通量筛选。在一些变型中,可以形成微器官球并允许其传代两次(例如两次倍增),并冷冻保存。如所述的,正常、健康组织可用于形成这些相同的微器官球以产生数百、数千或数万个微器官球,其可用于分析药物效应、药物反应、生物标志物、蛋白质组信号、基因组信号等。

[0177] 特别重要的是,这些微器官球以具有生物意义的方式存活,从而使其提供临床和生理相关数据,特别是关于药物反应。特别地,本文所述的微器官球允许组织提取/活检样品来源的细胞异常良好地生长,并提供更具代表性的数据,尤其是与类器官或类球体相比。不受特定理论的约束,这可能是因为细胞在微器官球中可能具有更受约束的细胞密度,从而允许细胞在共享信号的同时不彼此抑制的情况下通信。微器官球还具有非常大的表面-体积比,更容易允许生长因子和其他信号的传输以渗透到微器官球中(例如,微器官球较少受到扩散限制)。

[0178] 分析

[0179] 本文所述的患者来源的微器官球可用于多种不同的分析,且尤其可用于确定药物制剂对正常和/或异常(例如癌性)组织的影响,包括毒性。例如,药物筛选可包括将微器官球应用于多孔(例如96孔)板的所有或部分孔中。可选地,可以使用定制板(例如,10,000微孔阵列可以由100×100个孔形成)。微器官球(例如,凝胶液滴)可被应用到多个微孔阵列中,或在一些变型中应用到多个微孔阵列上,并与培养基一起孵育。微器官球可在3-5天的过程中培养。在一些变型中,在第5 天,孔(例如微型反应器)可随后给予药物化合物,例如基于一组FDA 批准的抗癌药,以检查该药物组的作用。例如,提及的药物可基于 National Cancer Institute(Division of Cancer Treatment and Diagnosis (11))筛选,其由147种药剂组成,旨在实现癌症研究、药物发现和联合药物研究。在第7天,可以通过标准荧光显微术对微器官球进行成像,并根据药物反应进行分级。

[0180] 图4A-4E示出了该分析技术的一个实例。

[0181] 在本实例中,筛选分析可以是自动化的。这可以实现可重复的和自动化的工作流程,其可使筛选的药物数量从几个增加到数百个。图 4A-4E示出了该工作流程的一个示例。在图4A中,获取肿瘤活检样品,并如上所述形成多个(例如>10,000个)微器官球(在图4A中,示出了形成微器官球的接合区域)。之后,可以回收和洗涤微器官球(例如,以去除微器官球在其中形成的不混溶(例如,油)材料)。微器官球然后可以被铺接到一个或多个微孔板中。如图4C所示,微器官球可培养一代或多代(例如,一次或多次传代)。这显示发生在第0天至

第 3、4或5天。此后，如图4D所示，可以对微器官球进行筛选，例如通过将药物应用到重复孔的子集。之后，如图4E所示，在第7天，可以对微器官球中的细胞进行成像和/或自动或人工评分，以鉴定药物作用(例如，药物筛选和生长谱分析)。

[0182] 图4A-4E中所示的工作流程可使集成设装置能够用于生长、给药和/或审查微器官球。在一个示例性装置中，新活检或切除的患者肿瘤样品可被解离并与试剂一起接种到凝胶中以形成微器官球(如上所述)。形成的微器官球的一部分可以冷冻保存。其余的可以回收并孵育直至接种到用于药物测试或筛选的微孔板中，如刚刚所述的。生长和生存力分析可在微器官球上进行，其可进行成像和跟踪。可测量其对如IC-50的药物处理的反应、细胞毒性和生长曲线以确定针对患者肿瘤的有效治疗剂。

[0183] 本文描述的方法和设备具有许多优点，包括可再现性。样品制备过程可通过微流体样品分配实现自动化，这可减少对专业人员进行诊断测试和手动移液的需求。这在临床环境中可能特别有帮助。此外，这可以实现信号液滴之间的均一性，从而提高分析灵敏度。另外，这些分析可以最小化生成微器官球所需的时间。基于初步数据，这些方法可能能够在不到约15分钟的时间内生成超过100,000个 MATRIGEL-肿瘤液滴(微器官球)的文库。这些方法也是高度可扩展的，并且可以被多路复用以平行地运行多个患者活检样品。

[0184] 最后，这些方法是灵活的，并且与其他技术相容。作为研究工具，基于液滴的微流体装置通常与广泛的水凝胶材料(例如琼脂糖、藻酸盐、PEG和透明质酸)相容。因此，起始凝胶组合物可以容易地被改性以伴随和促进微器官球的生长。此外，可以通过改变我们的微流体装置的尺寸来调整液滴尺寸。总之，这允许凝胶材料组合物和微型反应器的尺寸进行大的选择。

[0185] 此处描述的微型化分析(例如使用微器官球)可以充分利用患者肿瘤活检，使得能够筛选更多的药物化合物。例如，600μl的肿瘤样品可被分配到约143,000个体积为约4nL的个体微反应器中。通过充分利用组织样品，可以检查多个实验重复，从而提高统计能力。这些技术可允许研究肿瘤内异质性、药物扰动和鉴定罕见的细胞事件，如药物抗性。微器官球通常可与下游分析相容，包括单细胞RNA转录组分析和表观遗传谱分析。另外，通过最大化组织(例如活检)样品效率，如通过微器官球提供的，一部分微器官球可被库存(例如，通过冷冻保存用于生物库存)用于未来的新药分析和/或确认分析，包括基因筛查。

[0186] 例如，图5和图6示出了使用本文所述方法和设备(包括微器官球)的治疗方法的示例。对于精准和个性化医疗，这些方法和设备可用作适当药物选择的临床指标以改善临床结果和药物反应。作为一个实施方案，诊断患有转移癌的患者进行活检以用于组织病理学检查和由本文所述活检样品形成的多个微器官球的筛选。在7～10天内，可从活检样品进行筛选以确定最有效的标准护理治疗，使得患者可在14 天左右开始治疗。

[0187] 这方面的一个实例在图5中示出。在该实例中，肿瘤可在第0天 (例如通过CT扫描)识别1801，并在第5天获取活检样品1805，且在同一天可形成数百、数千或数万个微器官球并培养1-5天和筛选1805 以识别可使用的一种或多种药物组合物。这一相同步骤(形成微器官球和筛选)可用于在整个疾病进展的多个临床决策时间点指导精准医疗。在该实例中，使用所识别的一种或多种药物组合物的治疗可在第 14天开始1809，并且患者可随后在治疗的过程中(例如，约第90天的后续CT扫描)进行监测以确认肿瘤对治疗有反应1811。如果是这样，治疗可以继续1813，并且监测正在进行的进展1815。

[0188] 如所述的，在治疗的过程期间，可以在整个治疗中的多个时间点重复使用微器官球进行分析。这在图6中示出。例如，当患者首次被诊断可切除的原发性肿瘤1907时，该技术(例如，微器官球的产生和筛选1905)可用于确定最有效的新辅助治疗1921。因此，可以获取活检样品，并且可以形成数百、数千或数万个微器官球和使用一组潜在的药物组合物进行筛选。一旦原发性肿瘤被切除1923，该技术1905’可指示是否以及何种辅助治疗应该被选择1925。如果原发性肿瘤手术移除后发生复发或转移1927，可使用相同的技术(例如，从新鲜活检样品生成和筛选微器官球1905”、1905””、1905””)来指导标准护理治疗，包括一线1929、二线1931和三线1933疗法。如果患者最终变得对所有标准护理治疗具有耐受性或抗性，则可执行该技术1905””’以识别用于治疗顽固性肿瘤的标签外药物(off-label drug)1935。该技术也可用作伴随诊断以鉴别用于特定治疗的患者。最后，该技术可用于衍生和保存患者来源的微器官球以建立基于器官球的活癌症库用于筛查、基因组分型、新药发现、药物测试和临床试验设计。

[0189] 因为这些技术以及大量微器官球的生成可以相对低侵入性地完成(例如通过切除或活检)，以从筛选合理地提供快速的结果，所以这些方法可以容易地适应于标准护理。例如，来自组织(例如，活检样品)输入的细胞材料的体积非常小，并且可以解离到例如10μL至5ml 的体积中。

[0190] 一般地，使用本文所述的微器官球进行筛查可以是自动或手动进行的。可以使用实际上任何筛选技术，包括通过以下一种或多种的成像：共焦显微术、荧光显微术、液体透镜、全息摄影术、声呐、明场和暗场成像、激光、平面激光片，包括基于图像的分析方法的高通量实施方案(例如，使用计算机视觉和/或监督或无监督型，例如，CNN)。下游筛选可包括对培养基取样和/或在来自微器官球的细胞上进行遗传或蛋白质筛选(例如，scRNA-seq、ATAC-seq、蛋白质组学等)。

[0191] 实施例

[0192] 图7和8示出了如本文所述的用于形成多个微器官球的设备的另一实例。在图7中，该设备可包括多个微器官球形成的接合区，在其中不混溶材料(例如油)2002可被添加到装置中的储器和/或端口2004。类似地，未聚合材料2006(在本实例中，包括解离的活检样品细胞和流体基质材料)可被添加到设备中的储器或端口2008。在一些变型中，可以通过第三组端口2010添加第二或另外的材料(例如，生物活性剂)。这些组分可在接合区处(类似于上述的)组合，从而形成不混溶材料中的液滴，其可聚合成微器官球。在图7中，示出了具有相应输入和输出的三个(或更多个)平行接合区。

[0193] 图8示出了使用图7所示的设备形成微器官球的方法。在该变型中，所得微器官球包括目标(例如肿瘤)活检样品细胞及一种或多种另外的生物活性剂两者，其组合以形成微器官球。例如，第一通道2103 可包括未聚合材料(包括解离的活检样品细胞和基质材料)，第二通道2107包括另外的活性生物材料，并且承载不混溶材料(例如油)的一对交叉通道2109,2109’在接合处汇聚以形成尺寸受控的液滴，该液滴聚合以形成微器官球2107。

[0194] 在该实施例中，另外的活性生物材料可以是例如冷冻介质(例如，帮助库存微器官球)，和/或具有另外的细胞(例如，免疫细胞、基质细胞、内皮细胞等)、另外的支持性网络分子(例如，ECM、胶原蛋白、酶、糖蛋白、仿生支架等)、另外的生长因子和/或药物化合物的共培养物。

[0195] 实施例2:筛选结果

[0196] 如上所述,患者来源的微器官球及其用于筛选药物组合物的方法可用于准确预测患者肿瘤对一种或多种药物治疗的反应。在一些情况下,在传统的培养药物筛选无法准确预测药物反应的情况中,使用微器官球可能提供准确的结果。例如,在图9A-9B中,微器官球(而非细胞系)能够与患者反应相关联。在图9A中,检查了给予药物(例如奥沙利铂)的传统细胞系;该药物线未显示任何效果,预测肿瘤在检查的所有剂量范围内对该药物具有抗性。

[0197] 为了进行比较,从患者活检样品产生多个微器官球,如图9B所示。在本实施例中,患者来源的微器官球显示肿瘤微器官球中的细胞存活率显著降低,预测了药物敏感性。事实上,当用药物治疗时,肿瘤对治疗有反应。

[0198] 实施例3:微器官球与患者反应之间的相关性

[0199] 在一组相似的实验中,从活检材料生成微器官球(图10A),并使用所得微器官球进行药物效果筛选。图10B显示了第一药物(奥沙利铂)对这些微器官球的作用,显示了微器官球在药物存在下的百分存活率没有变化,从而预测药物抗性。类似地,用第二药物伊立替康处理显示缺乏对微器官球的作用,预测了药物抗性。患者同时接受奥沙利铂和伊立替康治疗,且治疗6个月后未显示反应。因此,微器官球与患者对标准护理药物的反应高度相关。在这种情况下,患者经历了六个月的副作用和毒性,而这些副作用和毒性可以通过微器官球的预测反应避免,其表明(在活检后7-10天内)肿瘤对这些药物无反应。

[0200] 实施例4:多药物筛选

[0201] 图11示出了可以使用如本文所述的患者来源的多个微器官球筛选的一组药物(例如化学治疗剂)的实例。在本实施例中,通过对多(27) 种药物中的每一种进行多个重复给药使用患者来源的微器官球进行药物筛选。使用单一肿瘤活检样品非常快速地(例如,在不到两周内) 大量生成多个微器官球,并针对该组药物制剂(例如,显示了27种制剂)对这些微器官球进行测试。该测试平行地进行,并且可以自动定量(例如,通过光学检测和定量)。在本实施例中,对该特定肿瘤显示最大毒性的药物为帕唑帕尼。

[0202] 可以平行地检查药物的组合以及不同药物浓度。由于从相同的肿瘤活检样品可以产生数百、数千或数万个微器官球,因此通过本文所述的方法和设备,这种分类的阵列测试变得可行。

[0203] 实施例5:活检样品制备

[0204] 材料:如上所述的用于形成微器官球的设备,包括液滴微流体芯片(200um);Bio-rad Droplet Generation Oil for EvaGreen(目录号 186-4006),每次运行3-5mL,全氟辛醇(PFO),Sigma,Novec HFE 7500 中的10%全氟辛醇(PFO),PBS,细胞培养基(即RPMI w/10%FBS和 1%PenStrep),70um或100um过滤器,50mL锥形管,培养皿。

[0205] 活检样品解离:使用活检样品(人/动物)产生来自患者的解离样品 (即单细胞组织)。对微流体芯片进行涂覆,并组装微流体芯片和支架。将微流体管道和配件连接至用于微器官球和废油的输出(例如,多孔板、15mL Eppendorf管等)。

[0206] 运行该装置以形成微器官球。从培养箱移除包含液滴的输出(例如,板、Eppendorf管等)(至少15分钟后)。从输出移除任何过量的油。液滴应具有浮力,因此油应位于小瓶底部。小心不要将液滴从试管中移除。将100uL的10%(v/v)PFO添加到输出。小心旋转并等待约1 分钟。不吸移或干扰样品。以300g离心60秒。移除上层液(过量的油/PFO)。不吸移或干

扰样品。尽可能多地移除PFO,因为这种化学物质可降低培养过程中的细胞生存力。加入1mL细胞培养基。不吸移或干扰样品。以300g离心60秒。去除上清液和任何过量的油/PFO。加入1mL细胞培养基。用1毫升吸液尖端小心地上下吸移样品(约30 次)。小心不要过度吸移或干扰液滴样品。使用1mL的吸液尖端,将液滴-介质溶液通过70um或100um过滤器(连接至50mL的锥形管)。一些液滴粘在输出(例如,15mL Eppendorf管)的内部。用2-3mL PBS 清洗每个管,并上下吸液。将清洗的PBS和液滴通过过滤器。重复该步骤两次,或直至试管看起来透明,且液滴转移至过滤器。使用1mL 吸液尖端,用约5mL的PBS小心洗涤含有液滴的过滤器。尝试并覆盖过滤器的整个表面区域。该洗涤步骤从样品去除任何过量的油和 PFO,并允许凝胶液滴最终回收到细胞培养基中。

[0207] 一旦适当排空(约1-2分钟),小心地将过滤器从50毫升锥形管移出。将过滤器上下翻转,用新鲜的细胞培养基清洗背面,并将溶液收集在新鲜的培养皿中。这使液滴从过滤器脱离,并将其置于细胞培养基中。推荐使用1mL吸液尖端,并使用约5mL培养基洗涤。

[0208] 在显微镜下检查液滴的质量。大部分/全部的油应被去除。如果回收率低,样品可以重新过滤。回收的微器官球的密度可通过血细胞计数器检查

[0209] 实施例6:肾组织微器官球

[0210] 在另一实施例中,微器官球可以由活检的肾组织形成。例如,所使用的仪器可包括:管旋转器或100μm和70μm细胞过滤器、15mL 锥形管、50mL锥形管、剃刀刀片、镊子和手术剪、皮氏培养皿(100x 15mm)或组织培养皿。试剂可包括:EBM-2培养基、胶原酶(5mg/mL 储备液)、Hank平衡盐溶液(HBSS)、氯化钙(10mM储备液)、磷酸盐缓冲液(1X PBS)、MATRIGEL、0.4%台盼蓝溶液和胰蛋白酶。

[0211] 肾组织始终在冷藏运输介质和在冰上储存。2mL酶消化溶液可置于15mL的锥形管中。加入600uL氯化钙(最终浓度:3mM)和加入200uL胶原酶(最终浓度:0.5毫克/毫升)。将肾样品转移至皮氏/ 培养皿中。用消毒的纸巾或剃刀刀片去除所有多余的或非肿瘤组织。向组织中加入1mL酶溶液。用无菌刀片将样品切碎成小块(<$2mm^2$)。用镊子或手固定住平板。将切碎的组织和酶溶液转移回具有酶溶液的 15mL管中。将管放入管旋转器或15mL管旋转器在37℃培养箱中放置30-60分钟。从培养箱中取出管。用至少6mL EBM-2(至少是酶消化溶液量的3倍)淬灭酶消化。吸液以进行混合。将100μm或70μm 的细胞过滤器放置在50mL锥形管上。转移样品通过过滤器。将溶液转移至新的15mL锥形管。以1500rpm离心样品5分钟。弃去上清液,留下细胞沉淀。将沉淀重悬浮在1mL EBM-2培养基中。将10μL 细胞混合物加入到一片石蜡膜上的10μL台盼蓝中,并转移至细胞计数板或血细胞计数器。计算细胞浓度(#/mL)。以1500rpm离心5分钟,并弃去上清液,留下沉淀。将细胞沉淀重悬于每$1.25x10^5$个细胞50uL的MATRIGEL中。在冰上进行。在预加热的24孔平底板中在孔的中心放置50uL穹丘(domes)的MATRIGEL细胞悬液。将平板转移至37°细胞培养箱中并孵育至少20分钟。确认穹丘聚合。将500μL 预热的EBM-2培养基轻轻加入到孔壁。在37℃培养箱中孵育。每2 天进行全培养基更换以扩增微器官球。

[0212] 实施例7:肝微器官球

[0213] 如所述的,微器官球可从正常(例如,非癌性)和/或异常组织形成。例如,由已经离位的小鼠肝组织形成的微器官球的一个实例中,该微器官球与流体基质材料组合以形成未聚合混合物,然后未聚合混合物的液滴聚合形成微器官球。在该实施例中,微器官球具有约

300μm 的直径。显示出形成每个液滴单个细胞的微器官球,或形成每液滴25 个细胞的微器官球。显示了形成后一天的微器官球;和培养10天后的微器官球。一些微器官球中的细胞分裂,从而形成呈现结构的簇;其他微器官球包括分裂较慢或未分裂的细胞。类似地,微器官球最初在每个微器官球中包含约25个细胞。在培养10天后,一些微器官球显示大量细胞生长,从而形成结构,而其他微器官球仅显示适度生长。在这两种情况下,已经发现微器官球内的细胞表现出其来源的原始组织(例如,肝细胞)特有的性质。

[0214] 在人肝组织上成功地进行相同的程序。在该实施例中,微器官球最初用约五十个细胞形成。到培养的第18天,一些微器官球显示细胞具有簇并形成结构,而另一些具有较小的结构或细胞未分裂。

[0215] 实施例8:培养细胞微器官球

[0216] 除了原代组织,例如,在形成微器官球之前立即或不久从患者移取的,微器官球可由培养的细胞或细胞形成,包括2D培养的细胞或 3D培养的细胞。

[0217] 在一些变型中,微器官球可由作为患者来源的异种移植物(PDX) 的部分生长的细胞系形成。例如,由培养的PDX240细胞形成微器官球。PDX240细胞是患者来源的异种移植物(PDX)肿瘤细胞系(基于患者来源编号240),其为在免疫缺陷小鼠中生长以形成体内肿瘤的人肿瘤(PDX)。将异种移植组织提取和解离,并用于形成如上所述的微器官球。在本实施例中,每个微器官球在其形成时包含单一细胞。显示培养一天后的微器官球,培养三天后的微器官球,培养五天和七天后的微器官球。随着培养时间的推移,至少一些微器官球显示出细胞分裂和形成结构。

[0218] 在类似的实验中,五个PDX240细胞最初包含在形成每个微器官球的每个液滴中。随着培养时间(例如,分别第1天、第3天、第5 天和第7天),细胞可以分裂并形成结构。

[0219] 实施例9:微器官球与传统类器官的比较

[0220] 由患者来源的异种移植物细胞(包括上述PDX240细胞和第二 PDX细胞系,PDX19187)形成类器官,并与使用相同细胞形成的微器官球进行比较。使用常规技术形成类器官,其中孔或皿中的大 MATRIGEL团块接种细胞并培养直至生长得到确认。微器官球从传统的类器官生成。

[0221] 然后用相同的药物(例如奥沙利铂或SN38)处理传统的(“大体积”) 类器官和微器官球,并在处理3天后测量细胞生存力。生成了图12 和13所示的药物反应曲线,并且显示了类似的反应曲线。例如,在图12中,PDO19187大体积类器官和微器官球的药物反应曲线对奥沙利铂浓度显示了类似的反应曲线,如PDX240大体积类器官和微器官球一样。在图13中,PDX19187和PDX240的药物反应曲线对于SN38 也显示了大体积类器官和微器官球两者的类似结果。图14显示了对于另一种抗癌药5-FU(氟尿嘧啶)的反应曲线,再次显示了PDZ-19187和PDX-240传统类器官和微器官球的类似药物反应曲线。

[0222] 因此,本文所述的微器官球,其可以更快和更可靠地形成并且与传统的类器官相比可以具有更高的总体存活率,可以提供与使用相同细胞形成的大体积类器官相当的药物反应。然而,如本文所述,微器官球可以更快速地使用,并且可以大得多的数量形成。

[0223] 实施例10:药物对微器官球的作用

[0224] 一般地,本文所述的微器官球可用于进行一种或多种分析,包括毒性分析。可以进行任何适当的分析,如通过分析悬浮在微器官球内的组织(例如细胞、组织结构)确定的结

果。本文所述的微器官球可通过光学、化学、电、遗传或本领域已知的任何其他方式进行测定或分析。

[0225] 光学(手动或自动的)检测可能特别有用,并且可包括光学地分析一种或多种药物制剂对在微器官球内的组织(包括细胞、细胞簇、细胞结构等)的作用。在一些变型中,如上所述,可以针对细胞死亡分析药物制剂(例如,测试的微器官球内组织的数量和/或大小)。在其他变型中,可以针对细胞生长对微器官球进行分析,包括大小、类型和 /或生长速率的降低。在一些变型中,可以针对形成的组织结构的变化对微器官球进行分析。

[0226] 例如,使用小鼠肝微器官球进行毒性测定的实例显示了一种药物制剂(在本实施例中为对乙酰氨基酚(10mM))对小鼠肝脏微器官球的作用。对照组中微器官球未处理,其显示了培养时生长的微器官球内的组织。由小鼠肝形成的一组类似的微器官球相反地用10mM对乙酰氨基酚处理。在对照组中,微器官球内的组织结构与处理组相比相对较大。对乙酰氨基酚的大部分微器官球中的组织较小,且含有许多死细胞。

[0227] 类似地,也使用人肝微器官球进行毒性分析。在对照组中观察到的典型人肝微器官球,包括其中形成的组织结构。处理组中用对乙酰氨基酚(10mM)处理人肝微器官球。与对照组相比,处理的微器官球中的组织显示出显著增加的非典型组织结构和碎片。

[0228] 任何这些检验(包括光学检验)可进行评分、评级、排序或以其他方式量化。例如,这两种分析的结果可被量化以指示大小差异、活/ 死细胞/组织的数量等。在一些变型中,评分可以是自动的。

[0229] 本文所述的任何方法(包括用户界面)可实施为软件、硬件或固件,并且可被描述为存储能够由处理器(例如计算机、平板电脑、智能手机等)执行的一组指令的非临时性计算机可读存储介质,该指令在由处理器执行时,使处理器控制执行任何步骤,包括但不限于:显示、与用户通信、分析、修改参数(包括定时、频率、强度等)、测定、警告等。

[0230] 当一个特征或元件在本文中被称为在另一个特征或元件“上”时,其可以直接在另一个特征或元件上,或者也可以存在中间特征和/或元件。相反,当一个特征或元件被称为“直接在”另一个特征或元素“上”时,不存在中间特征或元件。还应当理解,当一个特征或元件被称为“连接”、“附接”或“偶联”到另一个特征或元件时,其可以直接连接、附接或偶联到另一个特征或元件,或者可能存在中间特征或元件。相反,当一个特征或元素被称为“直接连接”、“直接附接”或“直接偶联”到另一个特征或元件时,不存在中间特征或元件。尽管相对于一个实施方案进行描述或显示,但是如此描述或显示的特征和元件可以适用于其他实施方案。本领域技术人员还将理解,提及“邻近”另一特征布置的结构或特征可具有与该邻近特征重叠或位于该邻近特征下方的部分。

[0231] 本文使用的术语仅用于描述特定实施方案的目的,并不旨在限制本发明。例如,本文使用的单数形式“一”、“一个”和“该”也意图包括复数形式,除非上下文另有明确说明。还应理解,术语“包括”和/或“包含”在本说明书中使用时,指定了所述特征、步骤、操作、元件和/或组分的存在,但不排除一个或多个其他特征、步骤、操作、元件、组分和/或其组合的存在或添加。本文使用的术语“和/或”包括一个或多个相关联的列举项目的任何和所有组合,并且可以缩写为“/”。

[0232] 空间上相对的术语,例如“下方”、“之下”、“较低”、“之上”、“上方”等,在此可为描述的方便使用以用于描述如附图所示的一个元件或特征与另一个元件或特征的关系。应当

理解，空间上相对的术语旨在涵盖除图中所描绘的定向之外，装置在使用或操作中的不同定向。例如，如果图中装置被倒置，则被描述为在其他元素或特征“之下”或“下方”的元件将被定向为在其他元件或特征“之上”。因此，示例性术语“下方”可以包括上方和下方的定向。该装置可以以其他方式定向(旋转90度或以其他定向)，并且在此使用的空间相对描述语被相应地解释。类似地，除非另有明确说明，术语“向上”、“向下”、“垂直”、“水平”等在此仅用于解释的目的。

[0233] 尽管术语“第一”和“第二”在本文中可用于描述各种特征/元件(包括步骤)，但这些特征/元件不应受限于这些术语，除非上下文另有说明。这些术语可用于区分一个特征/元件与另一个特征/元件。因此，下文讨论的第一特征/元件可被称为第二特征/元件，并且类似地，下文讨论的第二特征/元件可被称为第一特征/元件，而不脱离本发明的教导。

[0234] 在本说明书和随后的权利要求书中，除非上下文另有要求，否则词语“包含”以及诸如“包括”和“含有”的变型意味着各种组分可以共同用于方法和物品中(例如，组合物和设备，包括装置和方法)。例如，术语“包含”理解为暗示包含任何所述元件或步骤，但不排除任何其他元件或步骤。

[0235] 一般地，本文所述的任何设备和方法应被理解为包含性的，但是所有组分和/或步骤或其子集可以替代地是排他性的，并且可被表示为“由”或可选地“基本上由”各种组分、步骤、子组分或子步骤“组成”。

[0236] 如本说明书和权利要求书中所使用的，包括在实施例中所使用的，且除非另有明确规定，所有数字均可被理解为如同以词语“大约”或“近似”前置，即使该术语未明确出现。当描述幅度和/或位置时，可以使用短语“大约”或“近似”来表示所描述的值和/或位置在合理的预期值和/或位置范围内。例如，数值的值可以是规定值(或值范围)的+/- 0.1%、规定值(或值范围)的+/-1%、规定值(或值范围)的+/-2%、规定值(或值范围)的+/-5%、规定值(或值范围)的+/-10%等。除非上下文另有说明，本文中给出的任何数值也应被理解为包括大约或近似该值。例如，如果值“10”被公开，则“大约10”也被公开。本文所述的任何数值范围旨在包括其中包含的所有子范围。还应当理解，当公开一个值时，也公开了“小于或等于”该值、“大于或等于该值”以及该值之间的可能范围，如本领域技术人员适当理解的。例如，如果公开了值“X”，则还公开了“小于或等于X”以及“大于或等于X”(例如，其中X 是数值)。还应理解，在整个申请中，数据以多种不同的格式提供，并且该数据代表端点和起点以及数据点的任何组合的范围。例如，如果公开了特定数据点“10”和特定数据点“15”，则应理解大于、大于或等于、小于、小于或等于10和15以及在10和15之间被视为公开。还应当理解，还公开了两个特定单位之间的每个单位。例如，如果公开了10和15，则还公开了11、12、13和14。

[0237] 尽管上文描述了各种说明性实施方案，但是在不脱离权利要求所述的本发明范围的情况下，可以对各种实施方案进行多种改变中的任一种。例如，在替代实施方案中，执行其中各种描述的方法步骤的顺序通常可以改变，并且在其他替代实施方案中，可以一起省略一个或多个方法步骤。各种装置和系统实施方案的任选特征可以包括在一些实施方案中而不在其他实施方案中。因此，前述描述主要是出于示例性目的而提供的，且不应被解释为限制如权利要求中所示的本发明的范围。

[0238] 本文包括的实施例和阐述通过说明而非限制的方式示出其中可以实施本发明主题的具体实施方案。如所述的，可以由此利用和得出其他实施方案，使得可以在不脱离本公

开的范围的情况下进行结构和逻辑替换和改变。本发明主题的这类实施方案在本文中可单独或总体地通过术语“发明”指称，仅为了方便而非有意将本申请的范围主动限制于任何单一发明或发明概念(如果事实上公开了超过一个发明或发明概念)。因此，尽管在此已经示出和描述了特定实施方案，但是任何旨在实现相同目的的配置可替代所示的特定实施方案。本公开旨在涵盖各种实施方案的任何和所有适应或变化。在阅读上述说明后，上述实施方案的组合以及本文未具体描述的其他实施方案对于本领域技术人员而言将是明显的。

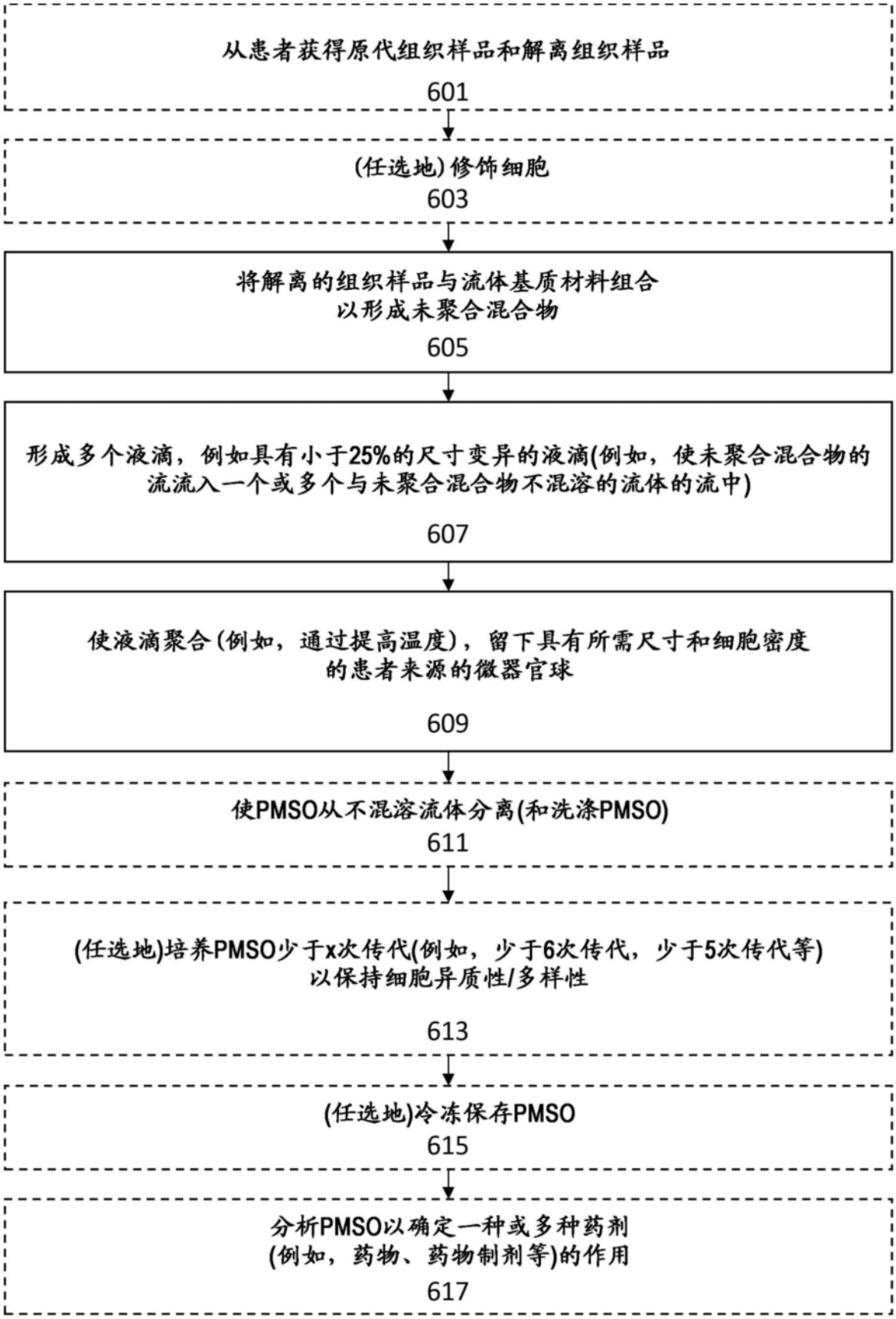

从患者获得原代组织样品和解离组织样品
601
(任选地)修饰细胞
603
将解离的组织样品与流体基质材料组合
以形成未聚合混合物
605
形成多个液滴，例如具有小于25%的尺寸变异的液滴(例如，使未聚合混合物的流流入一个或多个与未聚合混合物不混溶的流体的流中)
607
使液滴聚合(例如，通过提高温度)，留下具有所需尺寸和细胞密度的患者来源的微器官球
609
使PMSO从不混溶流体分离(和洗涤PMSO)
611
(任选地)培养PMSO少于x次传代(例如，少于6次传代，少于5次传代等)
以保持细胞异质性/多样性
613
(任选地)冷冻保存PMSO
615
分析PMSO以确定一种或多种药剂
(例如，药物、药物制剂等)的作用
617

图1

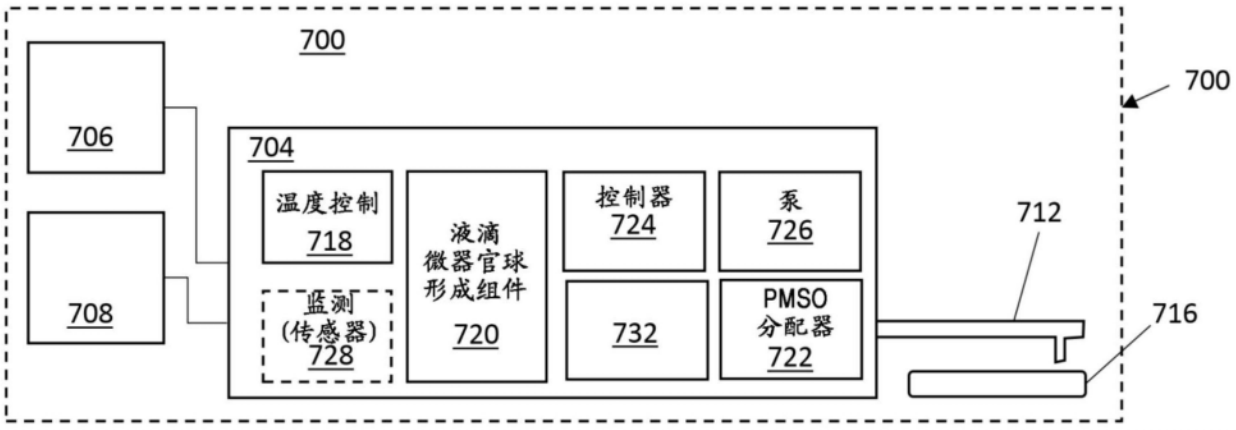

700
706
708
704
温度控制
718
监测
(传感器)
728
液滴
微器官球
形成组件
720
控制器
724
732
泵
726
PMSO
分配器
722
712
716
700

图2A

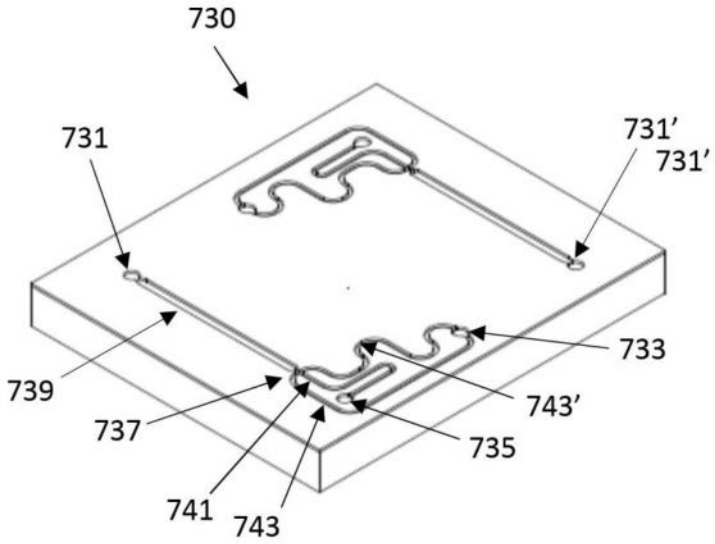

730
731
731′
731′
733
739
737
743′
735
741
743

图 2B

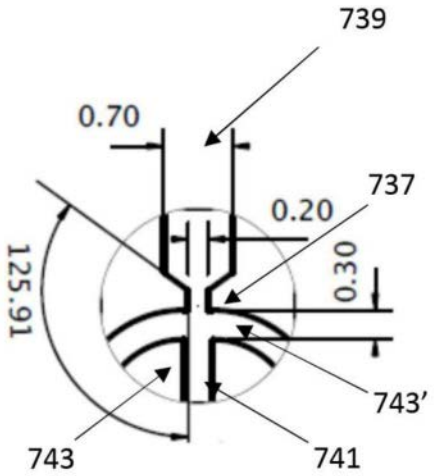

739
0.70
737
0.20
0.30
125.91
743′
743
741

图 2C

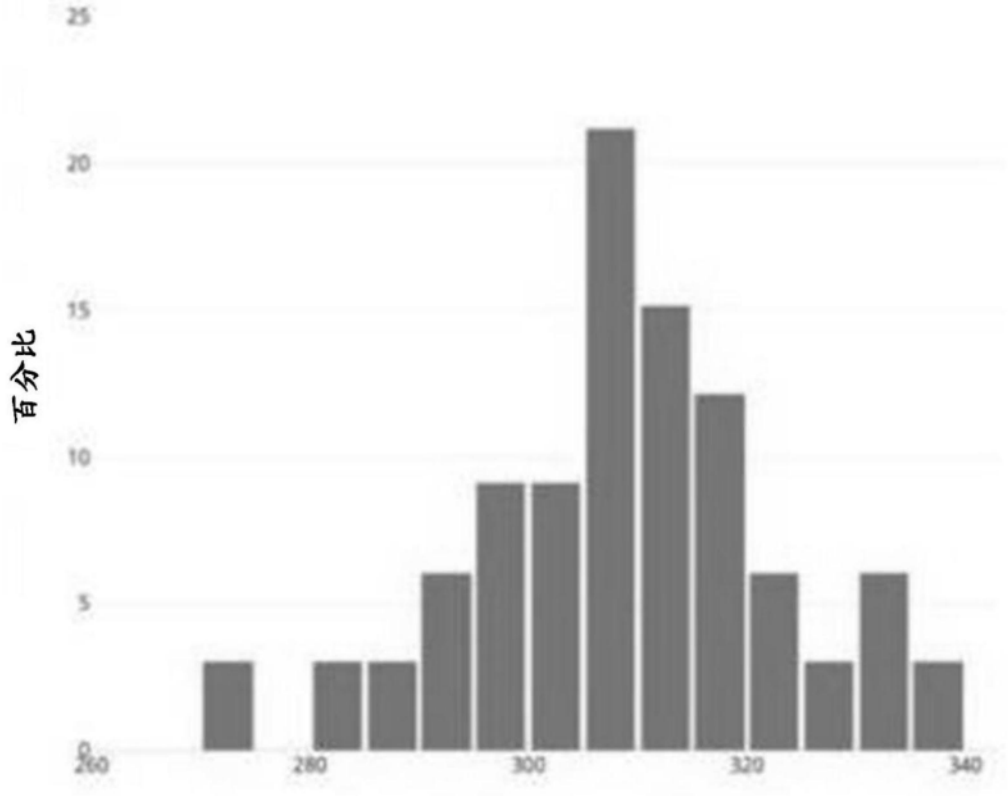


图3

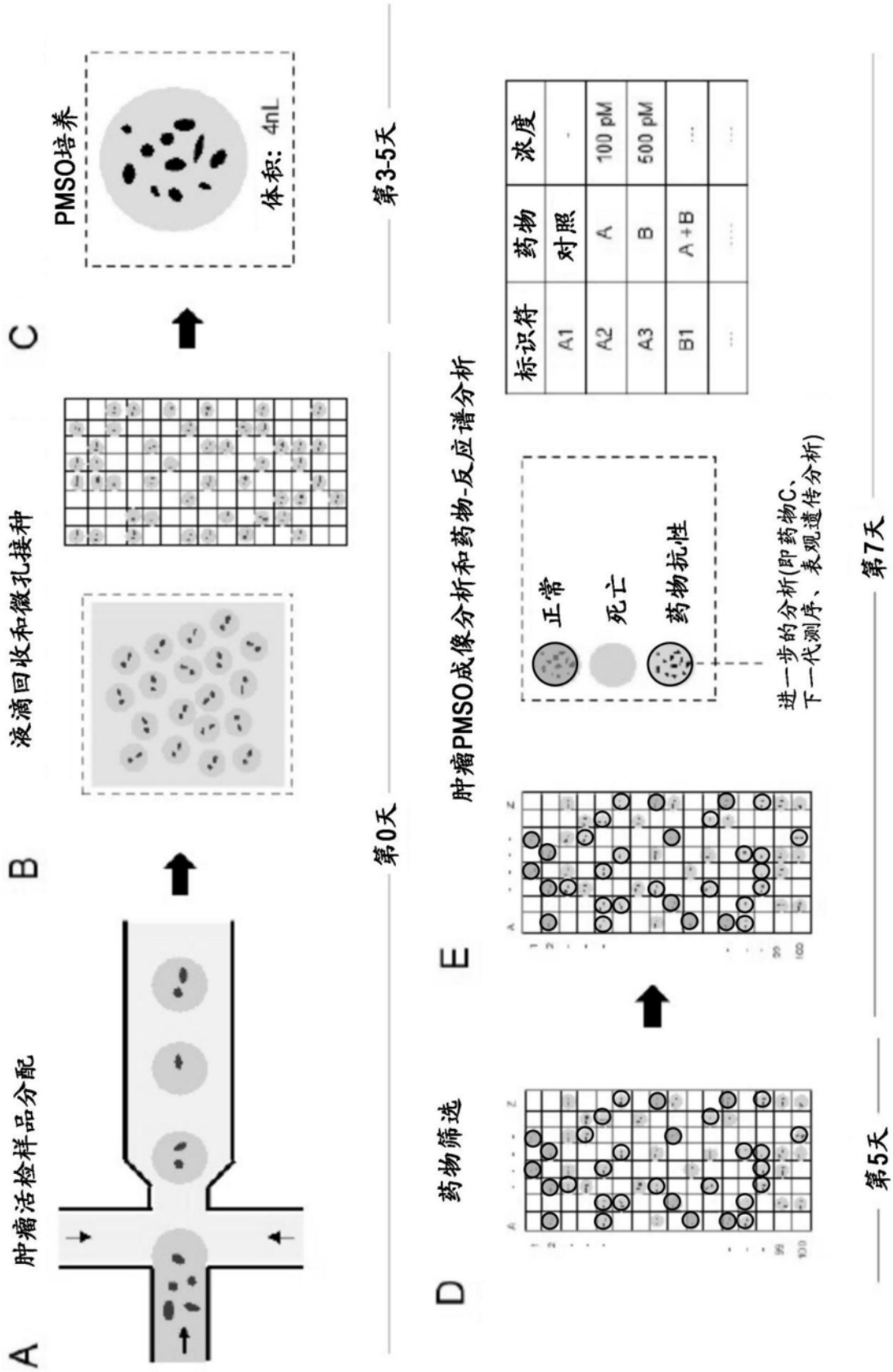

A
肿瘤活检样品分配
B
液滴回收和微孔接种
C
PMSO培养
体积：4nL
第0天
第3-5天
第5天
第7天
D
药物筛选
E
肿瘤PMSO成像分析和药物-反应谱分析
正常
死亡
药物抗性
进一步的分析(即药物C、
下一代测序、表观遗传分析)
标识符 药物 浓度
A1 对照 -
A2 A 100 pM
A3 B 500 pM
B1 A+B ...
... ...

图4A-4E

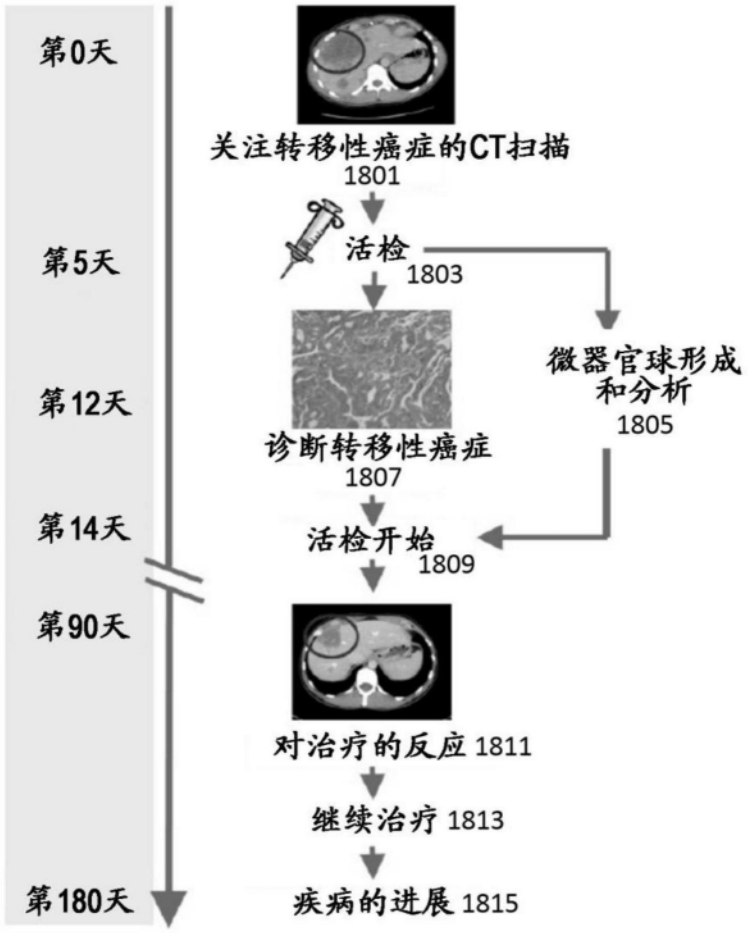

第0天
关注转移性癌症的CT扫描
1801
第5天
活检
1803
微器官球形成
和分析
1805
第12天
诊断转移性癌症
1807
第14天
活检开始
1809
第90天
对治疗的反应 1811
继续治疗 1813
第180天
疾病的进展 1815

图5

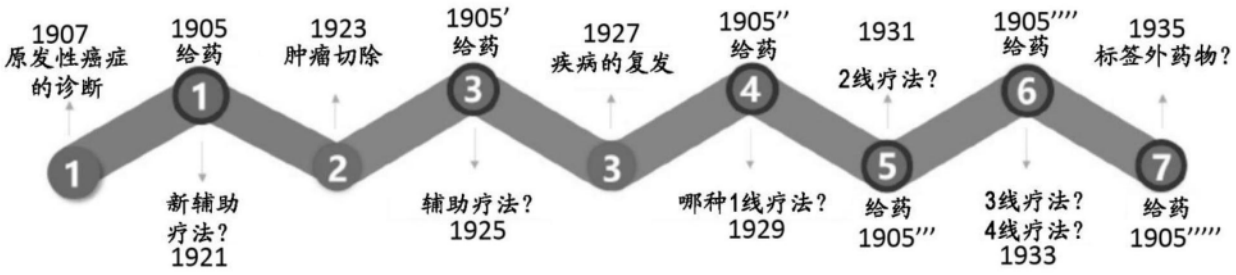

1907
原发性癌症
的诊断
1905
给药
新辅助
疗法?
1921
1923
肿瘤切除
1905′
给药
辅助疗法?
1925
1927
疾病的复发
1905″
给药
哪种1线疗法?
1929
1931
2线疗法?
给药
1905‴
1905⁗
给药
3线疗法?
4线疗法?
1933
1935
标签外药物?
给药
1905⁗′
1
2
3
4
5
6
7

图6

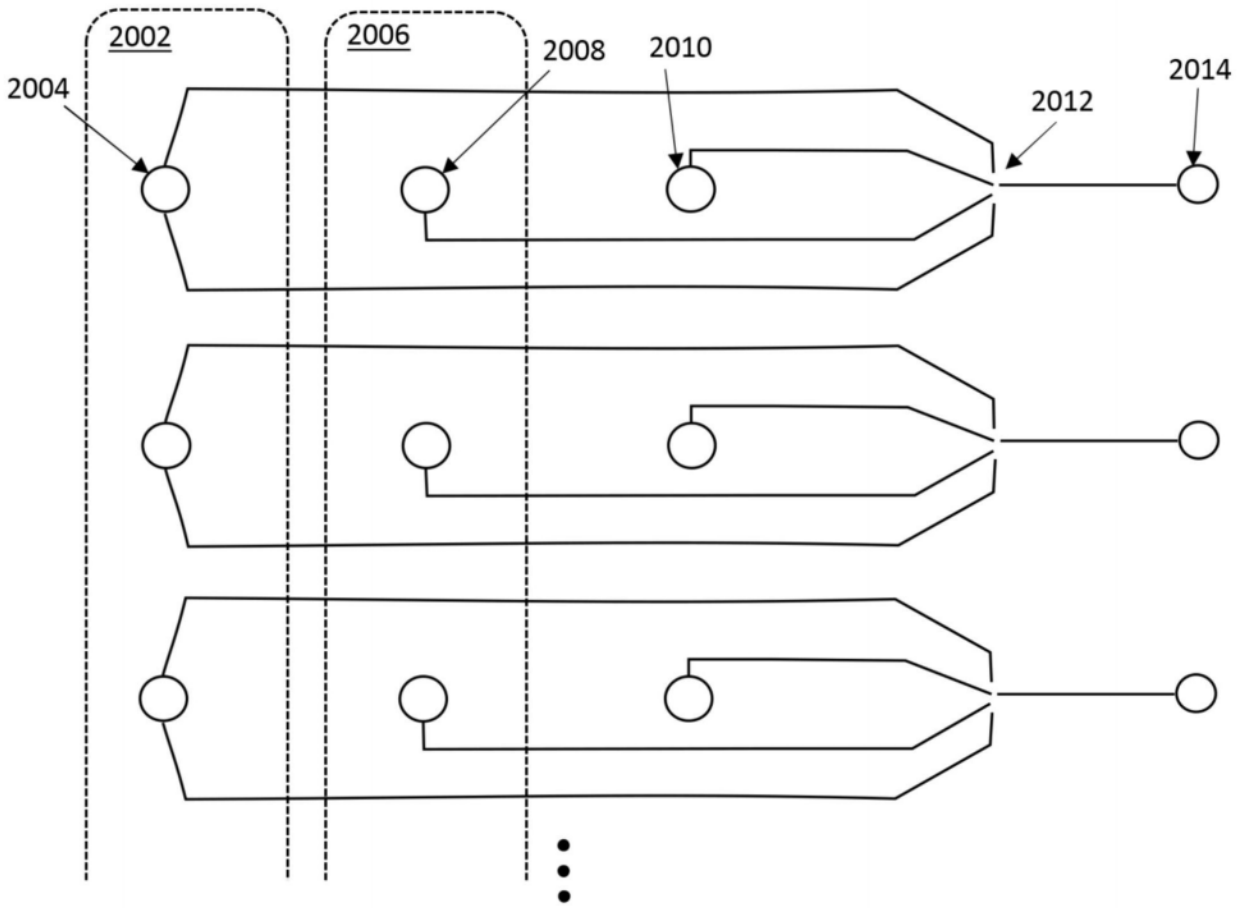


图7

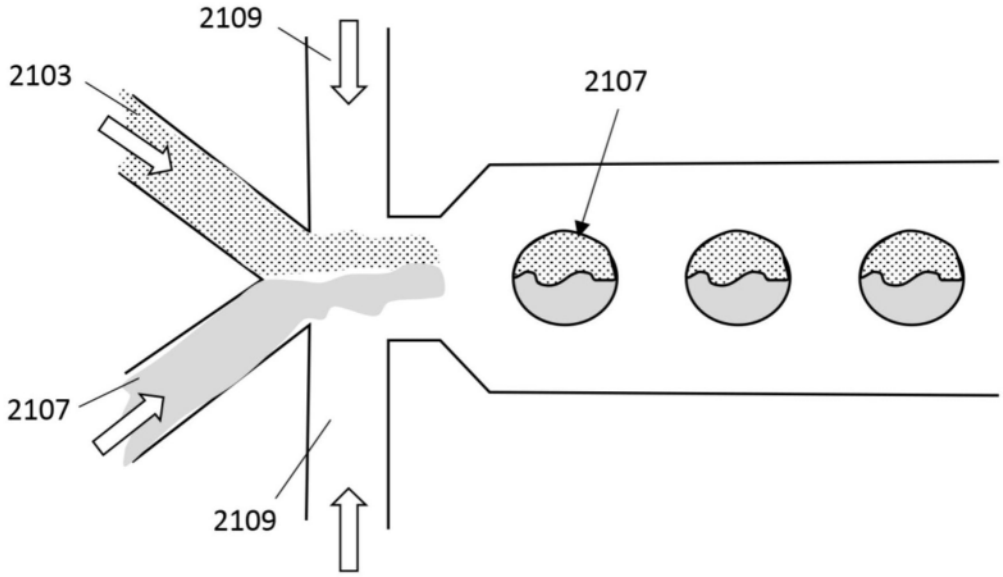
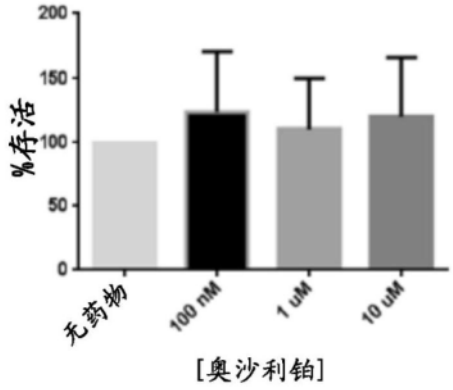
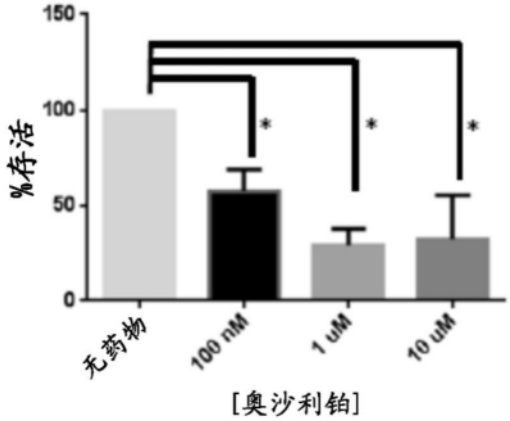


图8



预测：抗性的

图9A



预测：敏感的

图9B

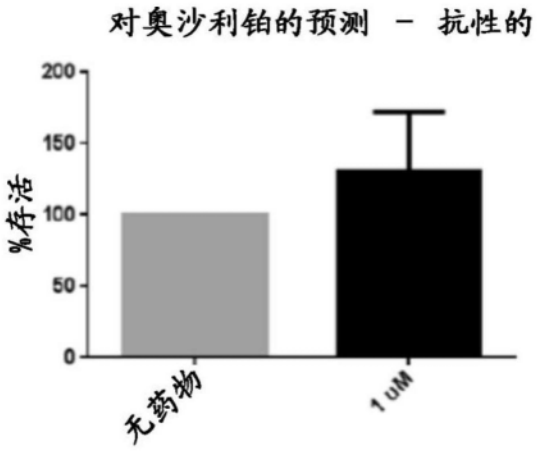

对奥沙利铂的预测 - 抗性的
%存活
200
150
100
50
0
无药物
1 uM

图10A

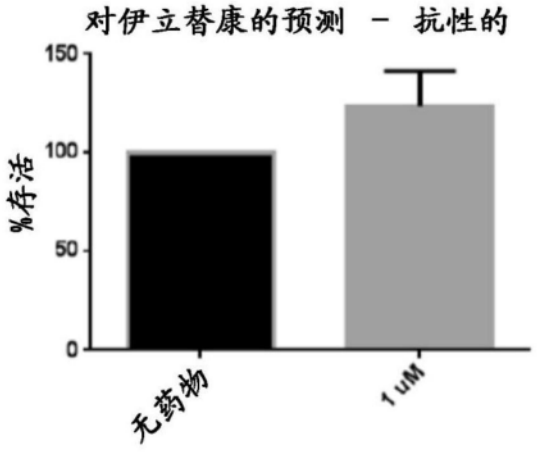

对伊立替康的预测 - 抗性的
%存活
150
100
50
0
无药物
1 uM

图10B


百分杀伤
(%)
帕唑帕尼
阿法替尼
阿昔替尼
博舒替尼
卡博替尼
色瑞替尼
尤唑替尼
达拉非尼
达沙替尼
埃罗替尼
依维莫司
吉非替尼
依鲁替尼
艾代拉里斯
伊马替尼
拉帕替尼
厄罗替尼
Olpanb
帕唑帕尼
帕纳替尼
瑞格非尼
西罗莫司
索拉非尼
舒尼替尼
替西罗莫司
曲美替尼
凡德他尼
维莫非尼

图11

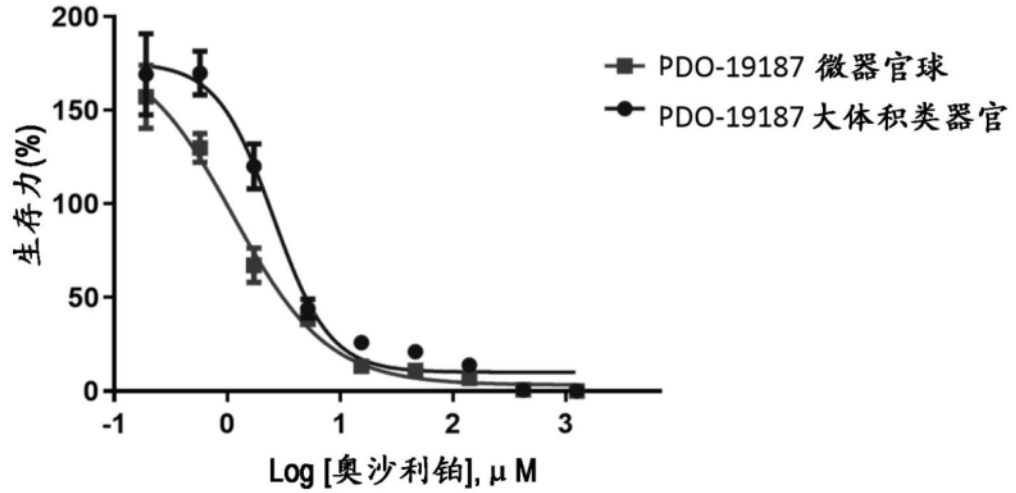

200
150
100
50
0
-1
0
1
2
3
生存力(%)
Log [奥沙利铂], μ M
PDO-19187 微器官球
PDO-19187 大体积类器官

图12

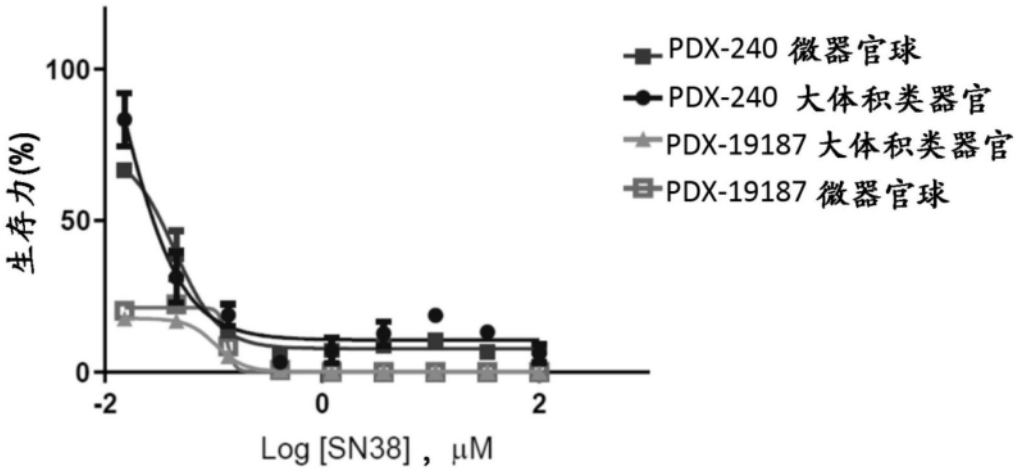

100
50
0
-2
0
2
生存力(%)
Log [SN38] , μM
PDX-240 微器官球
PDX-240 大体积类器官
PDX-19187 大体积类器官
PDX-19187 微器官球

图13

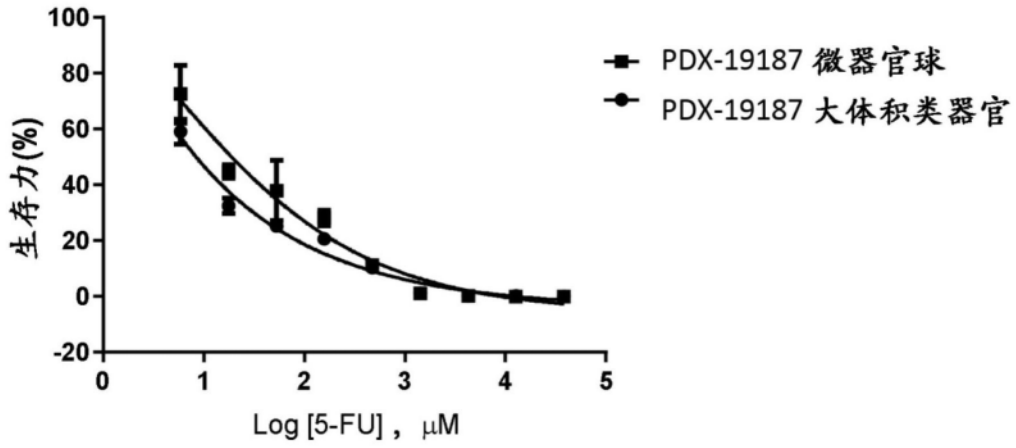

100
80
60
40
20
0
-20
0
1
2
3
4
5
生存力(%)
Log [5-FU] , μM
PDX-19187 微器官球
PDX-19187 大体积类器官

图14