(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년06월12일
(11) 등록번호 10-2820005
(24) 등록일자 2025년06월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/50 (2017.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/5082 (2013.01)
G01N 33/5011 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-7023638
(22) 출원일자(국제) 2019년02월01일
심사청구일자 2022년01월19일
(85) 번역문제출일자 2020년08월14일
(65) 공개번호 10-2020-0116944
(43) 공개일자 2020년10월13일
(86) 국제출원번호 PCT/US2019/016236
(87) 국제공개번호 WO 2019/152767
국제공개일자 2019년08월08일
(30) 우선권주장
62/625,628 2018년02월02일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
WO2017059173 A1*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
웨이크 포리스트 유니버시티 헬스 사이언시즈
미국 27157 노스캐롤라이나 윈스턴-사렘 메디칼 센터 블러바드
(72) 발명자
스카달, 알렉산더
미국, 27012, 노스캐롤라이나, 클레몬스, 케슬톤 드라이브 6719
보타노폴로스, 콘스탄티노스
미국, 27106, 노스캐롤라이나, 윈스턴-세일럼 , 다우닝 크릭 1121
(74) 대리인
특허법인 피씨알

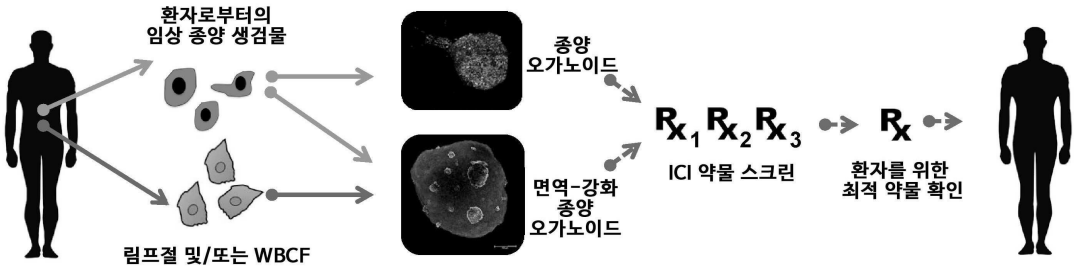
전체 청구항 수 : 총 23 항 심사관 : 안해지

(54) 발명의 명칭 **면역요법 관련 오가노이드 및 그의 제조 및 사용 방법**

(57) 요 약

1종 이상의 면역 세포를 포함하는 오가노이드, 및 이를 포함하는 시스템 및 장치가 본 명세서에 기재된다. 그러한 오가노이드, 장치, 및 시스템을 제조하고 사용하는 방법이 또한 본 명세서에 기재된다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
G01N 33/5047 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

살아있는 종양 세포, 1종 이상의 살아있는 면역 세포 및 히드로겔을 포함하는 인 비트로 세포 구조체로서,

상기 구조체는 면역학적 활성, 면역계의 조절 또는 항 종양 활성에 대해 목적 화합물을 스크리닝 하거나 면역 세포를 활성화시키기 위한 것이고,

상기 살아있는 종양 세포는 개체 중 종양으로부터 수집 또는 유래되는 것이고, 상기 1종 이상의 살아있는 면역 세포는 동일한 개체로부터 수집 또는 유래되는 것이고,

상기 살아있는 종양 세포 및 상기 1종 이상의 살아있는 면역 세포는 함께 혼합되어 상기 히드로겔에 의해 캡슐화되고,

상기 살아있는 종양 세포 및 상기 1종 이상의 살아있는 면역 세포는 각각 일차 세포(primary cell)이고, 상기 1종 이상의 살아있는 면역 세포는 항원 제시 세포(antigen presenting cell)인 것인 구조체.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 1종 이상의 살아있는 면역 세포는 상기 개체의 말초 혈액으로부터 수집 또는 유래되는 것인 구조체.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 1종 이상의 살아있는 면역 세포는 상기 개체에서 림프절 또는 골수로부터 수집 또는 유래되는 것인 구조체.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 1종 이상의 살아있는 면역 세포는, 상기 개체의 림프절 또는 골수로부터 수집 또는 유래된 추가적인 살아있는 면역 세포를 더 포함하는 것인 구조체.

청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 1종 이상의 살아있는 면역 세포는 여포성 수지상 림프 세포, 섬유모세포성 망상 림프 세포(fibroblastic reticular lymph cell), 백혈구, B 세포, T 세포, 골수 세포 또는 림프구 기원 세포(lymphoid in origin cell)인 것인 구조체.

청구항 6

청구항 1에 있어서, 백혈구(white blood cell)를 더 포함하는 것인 구조체.

청구항 7

청구항 1에 있어서, 상기 살아있는 종양 세포 및 상기 1종 이상의 살아있는 면역 세포는 상기 구조체에 약 1:1 내지 약 100:1 (종양 세포:면역 세포)의 비로 존재하는 것인 구조체.

청구항 8

청구항 1에 있어서, 양성 세포를 더 포함하는 것인 구조체.

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

청구항 1에 있어서, 상기 살아있는 종양 세포 또는 상기 1종 이상의 살아있는 면역 세포는 검출가능한 화합물을 포함하는 것인 구조체.

청구항 13

청구항 1에 있어서, 상기 구조체는 배양에서 1주 이상의 시간 동안 성장된 것인 구조체.

청구항 14

청구항 1에 있어서, 상기 살아있는 종양 세포 또는 상기 1종 이상의 살아있는 면역 세포는 50% 이상의 수용율(take rate)을 갖는 방법을 이용하여 제조되는 것인 구조체.

청구항 15

청구항 1에 있어서, 상기 구조체는 배양의 2주차에 구조체 중 평균 세포의 개수 기준으로 75% 이상의 살아있는 세포를 포함하는 것인 구조체.

청구항 16

삭제

청구항 17

청구항 1에 있어서, 상기 구조체는 약 1백만개 내지 약 5백만개, 천만개, 2천5백만개, 5천만개, 7천만개, 또는 1억개 범위의 총 세포수를 갖는 것인 구조체.

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

인 비트로에서 면역학적 활성 또는 면역계의 조절에 대해 목적 화합물을 스크리닝하는 방법으로서:

청구항 1의 구조체를 제공하는 단계;

상기 목적 화합물을 인 비트로에서 상기 구조체와 접촉시키는 단계; 및

인 비트로에서 상기 목적 화합물을 상기 구조체와 접촉시키는 것에 반응하여, 상기 구조체의 면역학적 반응을 결정하는 단계를 포함하는 것인 방법.

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

인 비트로에서 항-종양 활성에 대해 목적 화합물을 스크리닝하는 방법으로서:

청구항 1의 구조체를 제공하는 단계;

인 비트로에서 상기 목적 화합물을 상기 구조체에 접촉시키는 단계; 및

인 비트로에서 상기 목적 화합물의 상기 구조체로의 접촉에 반응하여, 상기 목적 화합물의 항-종양 활성을 나타내는, 살아있는 종양 세포의 성장을 결정하는 단계를 포함하는 것인 방법.

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

인 비트로에서, 면역학적 활성, 면역계의 조절, 또는 항-종양 활성에 대해 목적 화합물을 스크리닝하는 방법으로서:

청구항 1의 구조체 및 살아있는 종양 세포 오가노이드를 포함하는 장치를 제공하는 단계;

상기 구조체 및 상기 살아있는 종양 세포 오가노이드를 성장 배지와 접촉시키는 단계;

목적 화합물을 상기 구조체 및 상기 살아있는 종양 세포 오가노이드와 접촉시키는 단계; 및

상기 목적 화합물을 상기 구조체 및 상기 살아있는 종양 세포 오가노이드에 접촉시키는 것에 반응하여, 상기 살아있는 종양 세포의 성장을 결정하거나 또는 상기 구조체 및 상기 살아있는 종양 세포 오가노이드의 면역학적 반응을 결정하는 단계를 포함하는 것이고,

상기 살아있는 종양 세포의 성장의 감소는 상기 목적 화합물의 항-종양 활성을 나타내는 것인 방법.

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

청구항 70

삭제

청구항 71

삭제

청구항 72

삭제

청구항 73

삭제

청구항 74

삭제

청구항 75

삭제

청구항 76

삭제

청구항 77

삭제

청구항 78

삭제

청구항 79

삭제

청구항 80

삭제

청구항 81

삭제

청구항 82

삭제

청구항 83

삭제

청구항 84

삭제

청구항 85

생체 외에서(ex vivo) 면역 세포를 활성화시키는 방법으로서, 상기 방법은:

살아있는 종양 세포 오가노이드를 포함하는 챔버를 통해 제1 면역 세포를 순환시켜 상기 제1 면역 세포를 활성화하고 활성화된 면역 세포를 제공하는 단계;

상기 살아있는 종양 세포 오가노이드로부터 상기 활성화 면역 세포를 단리하여 단리된(isolated) 활성화 면역 세포를 제공하는 단계; 및

상기 단리된 활성화 면역 세포를 증식시켜 활성화 면역 세포의 집단을 제공하는 단계를 포함하는 것이고,

상기 살아있는 종양 세포 오가노이드는 복수 개의 살아있는 종양 세포, 항원 제시 세포인 복수 개의 제2 면역 세포 및 히드로겔을 포함하는 것이고,

상기 복수 개의 살아있는 종양 세포 및 상기 복수 개의 제2 면역 세포는 서로 혼합되어 상기 히드로겔에 의해 캡슐화되는 것이고,

상기 복수 개의 살아있는 종양 세포는 개체 중 종양으로부터 수집 또는 유래되며, 상기 복수 개의 제2 면역 세포는 동일한 개체로부터 수집 또는 유래되는 것이고,

상기 제1 면역 세포와 상기 복수 개의 제2 면역 세포는 서로 다른 것인 방법.

청구항 86

삭제

청구항 87

삭제

청구항 88

삭제

청구항 89

삭제

청구항 90

삭제

청구항 91

삭제

청구항 92

삭제

청구항 93

삭제

청구항 94

삭제

청구항 95

삭제

청구항 96

삭제

청구항 97

삭제

청구항 98

삭제

청구항 99

삭제

청구항 100

청구항 85에 있어서, 상기 복수 개의 살아있는 종양 세포는 개체 중 종양으로부터 수집 또는 유래되는 것이고, 상기 제1 면역 세포 및 상기 복수 개의 제2 면역 세포는 동일한 개체로부터 수집 또는 유래되는 것인 방법.

청구항 101

청구항 85에 있어서, 상기 제1 면역 세포는 상기 개체에서 말초 혈액으로부터 수집 또는 유래되는 것인 방법.

청구항 102

청구항 85에 있어서, 상기 복수 개의 제2 면역 세포는 상기 개체에서 기관(organ)으로부터 수집 또는 유래되는 것인 방법.

청구항 103

청구항 85에 있어서, 상기 복수 개의 제2 면역 세포는 상기 개체에서 림프절로부터 수집 또는 유래되는 것인 방법.

청구항 104

청구항 85에 있어서, 상기 살아있는 종양 세포 오가노이드는 청구항 1의 구조체를 포함하는 것인 방법.

청구항 105

청구항 85의 방법에 따라 제조된 활성화된 면역 세포.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] **우선권의 진술**

[0002] 본 출원은 35 U.S.C. § 119(e)에 따라, 그 전체 내용이 참조에 의해 본 명세서에 포함된, 2018년 2월 2일에 출원된 미국 임시 출원 제62/625,628호의 이익을 주장한다.

[0003] **정부 지원**

[0004] 본 발명은 국립보건원(National Institutes of Health)에 의해 수여된 그랜트 번호(grant number) 1U54TR001362-01, 5UL1TR001420-03, 및 5P30CA012197-43의 정부 지원에 의해 이루어졌다.

[0005] **분야**

[0006] 본 발명은 전반적으로 종양 오가노이드(tumor organoid) 및 면역 세포를 포함하는 오가노이드를 포함한, 오가노이드 및 그를 제조하고 사용하는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0007] 면역요법은 종양을 효율적으로 표적화하는 능력 때문에 매력적인 항암 치료법으로 부상하고 있다. 그러나, 그러한 치료법이 일반적으로 또는 특정 환자들에 대해 적절하게 테스트될 수 있는 인 비트로 모델이 존재하지 않는다.

[0008] 처음에는, 동물 모델이 인 비보 종양 생리를 연상시키는 복잡성을 제공할 수 있기 때문에, 동물 모델이 매력적인 것으로 보였다. 그러나, 동물의 사용에 수반되는 인프라(infrastructure) 요건 및 윤리적 문제를 넘어서도, 이러한 모델들이 인간에서 결과를 예측하는 검정력(power)이 미약하다. 환자-유래 종양 이종이식 (PDX) 기술이 최근에 환자의 종양이 약물에 어떻게 반응할 것인지를 예측하기 위해 도입되었다. 환자의 종양의 작은 단편을 면역-결핍 마우스에 이식한다. 종양 단편이 적당한 크기까지 증식되면, 종양을 제거하고, 여러 조각으로 나누고, 새로운 마우스에 재-이식한다. PDX 기술의 주요한 장점은: 1) 환자의 종양 세포가 인 비보에서 확장되어 암의 병리 생물학에 상당한 기여를 하는 종양 미세환경(microenvironment)의 요소들을 재현할 수 있고, 2) 환자의 임상적 치료 전에 환자의 성장하는 종양에 대해 약물을 테스트할 수 있는 능력을 갖는다는 것이다. 그러나, PDX 기술은 특정한 크기 미만인 종양을 성장시킬 수 없고, 가장 성공적인 PDX는 매우 공격적인 종양으로부터 유래되므로, 이 기술은 모든 암 환자가 아닌, 일부 암 환자에게만 적용가능하다. 또한, PDX에 대한 종양 미세 환경(TME)은 마우스 기원이어서, 인간-특이적 기질 요소(human-specific stromal elements)가 결여된다.

[0009] 암 연구는 제어된, 인 비트로 환경에서 종양 진행 및 신호전달(signalling) 메카니즘을 정확하게 모델링할 수 없는 불능에 의해 제한되었다. 전술된 PDX 모델의 문제 외에도, 동물 모델은 단지 제한된 조작 및 연구만 가능하게 하고, 반드시 인간에서의 결과를 예측하는 것은 아니다. 전통적인 인 비트로 2D 배양은 3D 인 비보 미세환경을 재현(recapitulate)하지 못한다. 약물 동력학은 극적으로 달라지므로, 2D에서 효과적인 용량이 종종 환자에서 효과가 없고, 세포-세포/세포-매트릭스 상호작용이 부정확하다. 조직 배양 접시는 형태(topography), 강성(stiffness), 및 2D 대 3D 아키텍처(2D versus 3D architecture)에 있어서 인 비보 종양과 상이하다. 또한, 2D 배양은 세포에 분자 및 표현형 특성을 변화시키는 선택적 압력을 부여할 수 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] **요약**

[0011] 본 발명의 제 1 양태는 복수 개의 면역 세포를 포함하는, 면역계 모델(immune system model)로서 유용한(예를 들면, 면역학적 활성의 평가 및/또는 면역계의 조절에 유용하고 및/또는 하나 이상의 암 치료법 및/또는 면역요법의 스크리닝에 유용한) 인 비트로 세포 구조체(in vitro cell construct)(또는 "오가노이드(organoid)")에 관한 것이다.

[0012] 본 발명의 또 다른 양태는 살아있는 종양 세포 및 1종 이상의 면역 세포(at least one type of immune cells)를 포함하는, 종양 모델로서 유용한(예를 들면, 면역학적 활성의 평가 및/또는 면역계의 조절에 유용하고 및/또는 하나 이상의 암 치료법 및/또는 면역요법의 스크리닝에 유용한) 인 비트로 세포 구조체(또는 "오가노이드")에 관한 것이다.

[0013] 본 발명의 또 다른 양태는 인 비트로에서 면역학적 활성 및/또는 면역계의 조절에 대해 목적 화합물(compound of interest)를 스크리닝하는 방법으로서: 복수 개의 세포를 포함하는 하나 이상의 오가노이드를 제공하는 단계(예를 들면, 선택적으로(optionally) 상기 하나 이상의 오가노이드는 간 오가노이드, 심장 오가노이드, 종양 오가노이드, 면역계 오가노이드 등인 것인 단계); 인 비트로에서 상기 목적 화합물을 상기 하나 이상의 오가노이드와 접촉시키는 단계; 및 그 후, 인 비트로에서 상기 목적 화합물의 상기 하나 이상의 오가노이드로의 접촉에 반응하여, (예를 들면, 상기 목적 화합물과의 접촉 전에 및/또는 상기 접촉의 부재 하에 상기 오가노이드의 면역학적 반응/활성에 비교하여) 상기 하나 이상의 오가노이드의 면역학적 반응을 결정하는 단계를 포함하는 것인 방법에 관한 것이다.

[0014] 본 발명의 또 다른 양태는 인 비트로에서 항-종양 활성에 대해 목적 화합물를 스크리닝하는 방법으로서: 살아있

는 종양 세포 및 1종 이상의 면역 세포를 포함하는 하나 이상의 구조체를 제공하는 단계; 인 비트로에서 상기 목적 화합물을 상기 구조체와 접촉시키는 단계; 및 그 후, 인 비트로에서 상기 목적 화합물의 상기 하나 이상의 오가노이드로의 접촉에 반응하여, 상기 목적 화합물의 항-종양 활성을 나타내는, (예를 들면, 상기 목적 화합물에 접촉되지 않은 하나 이상의 유사한(like) 구조체의 종양 세포에 비교해 및/또는 상기 구조체 또는 하나 이상의 유사한 구조체 중 살아있는 양성(benign) 세포에 비교해) 상기 살아있는 종양 세포의 성장의 감소(예를 들면, 종양 세포의 증식의 부재, 종양 세포의 사멸, 종양 세포에 의한 침윤의 감소, 등)를 결정하는 단계를 포함하는 것인 방법에 관한 것이다.

[0015] 본 발명의 또 다른 양태는 인 비트로에서 면역학적 활성, 면역계의 조절, 항-전이 활성 활성, 및/또는 항-종양 활성에 대해 목적 화합물을 스크리닝하는 방법으로서: 면역 세포 오가노이드 및 살아있는 종양 세포 오가노이드를 포함하는 장치를 제공하는 단계; 상기 면역 세포 오가노이드 및 상기 살아있는 종양 세포 오가노이드를 성장 배지(growth medium)와 접촉시키는 단계; 목적 화합물을 상기 면역 세포 오가노이드 및/또는 상기 살아있는 종양 세포 오가노이드와 (예를 들면, 상기 화합물을 상기 성장 배지에 첨가하는 것에 의해) 접촉시키는 단계; 및 상기 목적 화합물을 상기 면역 세포 오가노이드 및/또는 상기 살아있는 종양 세포 오가노이드에 접촉시키는 것에 반응하여, (예를 들면, 상기 목적 화합물과 접촉되지 않은 하나 이상의 유사한 살아있는 종양 세포 오가노이드(like live tumor cell organoid)의 종양 세포에 비교하여 및/또는 상기 오가노이드 또는 하나 이상의 유사한 살아있는 종양 세포 오가노이드 중 살아있는 양성 세포에 비교하여) 상기 살아있는 종양 세포의 성장을 결정하고, 상기 살아있는 종양 세포의 성장의 감소(예를 들면, 종양 세포의 증식의 부재, 종양 세포의 사멸, 종양 세포에 의한 침윤의 감소, 등)는 상기 목적 화합물의 항-종양 활성을 나타내고, 및/또는 (예를 들면, 상기 목적 화합물과의 접촉 전 및/또는 부재 시의 상기 면역 세포 오가노이드 및/또는 상기 살아있는 종양 세포 오가노이드의 면역학적 반응/활성에 비교하여) 상기 면역 세포 오가노이드 및/또는 상기 살아있는 종양 세포 오가노이드의 면역학적 반응을 결정하는 단계를 포함하는 것인 방법에 관한 것이다.

[0016] 본 발명의 또 다른 양태는 생체 외에서(ex vivo) 면역 세포를 활성화시키는 방법으로서, 상기 방법은: 면역 세포(예를 들면, 림프구)를 복수 개의 살아있는 종양 세포를 포함하는 살아있는 종양 세포 오가노이드와 접촉시켜 (예를 들면, 적응 면역 메카니즘을 통해) 활성화 면역 세포(activated immune cell)를 제공하는 단계; 상기 살아있는 종양 세포 오가노이드로부터 상기 활성화 면역 세포를 단리하여 단리된(isolated) 활성화 면역 세포를 제공하는 단계; 및 상기 단리된 활성화 면역 세포를 증식시켜 활성화 면역 세포의 집단을 제공하는 단계를 포함하는 것인 방법에 관한 것이다.

[0017] 일 구체예에 대해 기재된 본 발명의 양태는 그에 대해 구체적으로 기술되지 않더라도, 다른 구체예에 포함될(incorporated) 수 있다는 것에 주목한다. 즉, 모든 구체예 및/또는 임의의 구체예의 특징이 임의의 방식 및/또는 조합으로 합쳐질 수 있다. 출원인은 최초에 그러한 방식으로 청구되지 않았더라도, 최초에 제출된 청구항을 다른 청구항 또는 청구항들을 인용하고 및/또는 그들의 특징을 포함시키도록 보정할 수 있는 권리를 포함한, 최초에 제출된 청구항을 변경할 수 있고 및/또는 따라서 새로운 청구항을 제출할 수 있는 권리를 보유한다. 본 발명의 이러한 목적 및/또는 양태 및 기타 목적 및/또는 양태가 하기에 기술된 명세서에서 상세하게 설명된다. 본 발명의 추가적인 특징, 장점, 및 세부사항은 하기에 기재된 도면 및 바람직한 구체예의 상세한 설명을 읽는 것으로부터 당해 기술 분야에서 통상의 기술을 가진 자에 의해 이해될 것이고, 그러한 설명은 단지 본 발명을 예시(illustrative)하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0018] **실시 구체예의 상세한 설명**

[0019] 본 발명은 이제 본 발명의 구체예가 도시된 첨부된 도면을 참조하여 하기에서 보다 완전하게 설명된다. 그러나, 본 발명은 다수의 다른 형태로 구현될 수 있고, 본 명세서에서 기재된 구체예에 한정되는 것으로 해석되어서는 안 된다; 오히려, 이러한 구체예는 본 개시가 철저하고 완전하고, 당해 기술 분야의 기술자에게 본 발명의 범위를 완전하게 전달하도록 제공된다.

[0020] 본 명세서 중 발명의 설명에서 사용된 용어는 특정한 구체예 만을 기술하기 위한 목적이고 본 발명을 한정하는 것으로 의도되지 않는다. 본 발명의 설명 및 첨부된 청구항에서 사용된, 단수 형태("a," "an" 및 "the")는 문맥이 명확하게 달리 나타내지 않으면, 복수 형태도 포함하도록 의도된다.

[0021] 달리 정의되지 않으면, (기술 및 과학 용어를 포함한) 모든 용어는 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 기술자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로 사용되는 사전에서 정의된 것과 같은

용어들은 본 출원 및 관련 기술 분야의 상황에서 그들의 의미와 일관된 의미를 갖는 것으로 해석되어야하고 본 명세서에서 명시적으로 그렇게 정의되지 않은 경우, 이상화되거나 또는 과도하게 형식적인 의미로 해석되어서는 안되는 것으로 이해될 것이다. 본 명세서에서 본 발명의 설명에서 사용된 용어는 단지 특정한 구체예를 기술하는 목적을 위한 것이고, 본 발명을 한정하는 것으로 의도되지 않는다. 본 명세서에서 언급된 모든 공개문헌, 특허 출원, 특허, 및 기타 참조문헌은 그 전체로 참조에 의해 본 명세서에 포함된다. 용어에 있어서 충돌이 있는 경우, 본 출원이 우선한다.

[0022] 본 명세서에서 사용된, "및/또는(and/or)"은 연관된 열거 항목들 중 하나 이상의 모든 가능한 조합, 및 대안적으로 해석되는 경우("또는(or)"), 조합의 부재를 의미하고 포함한다.

[0023] 문맥상 달리 표시되지 않는 경우, 본 명세서에 기재된 본 발명의 다양한 특징들은 임의의 조합으로 이용될 수 있는 것으로 구체적으로 의도된다. 또한, 본 발명은, 본 발명의 일부 구체예에서, 본 명세서에서 제시된 특징 또는 특징들의 조합이 배제되거나 또는 생략될 수 있다는 것을 고려한다. 예시하면, 명세서에 복합체가 성분 A, B, 및 C를 포함하는 것을 기재된 경우, A, B, 또는 C, 또는 그들의 조합이 생략되고, 포기될 수 있는 것으로 구체적으로 의도된다.

[0024] 본 명세서에서 사용된, 전이 구(transitional phrase) "필수적으로 구성된(consisting essentially of)" (및 문법적 변형)은 기재된 물질 또는 단계, "및 청구된 발명의 기본적 및 신규한 특징에 실질적으로 영향을 미치지 않는 것들(and those that do not materially affect the basic and novel characteristic(s))"을 포함하는 것으로 해석된다. *In re Herz*, 537 F.2d 549, 551-52, 190 U.S.P.Q. 461, 463 (CCPA 1976) (원문에 강조 부가(emphasis in the original)) 참조; 또한, MPEP §2111.03 참조. 따라서, 본 명세서에서 사용된 용어, "필수적으로 구성된"은 "포함하는(comprising)"과 균등한 것으로 해석되어서는 안 된다.

[0025] 양, 농도, 등과 같은 측정가능한 값을 언급할 때, 본 명세서에서 사용된 용어 "약(about)"은 특정된 값, 및 특정된 값의 ±10%, ±5%, ±1%, ±0.5%, 또는 심지어 ±0.1%의 차이(variation)를 포함하도록 의도된다. 예를 들면, X가 측정가능한 값인 경우, "약 X"는 X 및 X의 ±10%, ±5%, ±1%, ±0.5%, 또는 심지어 ±0.1%의 차이를 포함하도록 의도된다. 측정가능한 값에 대해 본 명세서에서 제공된 범위는 그에 속하는 임의의 기타 범위 및/또는 개별적인 값을 포함할 수 있다.

[0026] 하나의 요소가 또 다른 요소의 "위에(on)", 그에 "부착된(attached)", 그에 "연결된(connected)", 그와 "결합된(coupled)", 그와 "접촉하는(contacting)" 등으로 언급될 때, 그 요소는 나머지 요소에 직접적으로 그 위에 있거나, 그에 부착되거나, 연결되거나, 그와 결합되거나, 또는 그에 접촉할 수 있거나, 또는 개재 요소(intervening element)가 존재할 수 있는 것으로 이해될 것이다. 대조적으로, 하나의 요소가 예를 들면, 또 다른 요소에 대해 "직접적으로 그 위에(directly on)", "직접적으로 부착된(directly attached)", "직접적으로 연결된(directely connected)", "직접적으로 결합된(directly coupled)", 또는 "직접적으로 접촉하는(directly contacting)"으로 언급되는 경우, 개재 요소는 존재하지 않는다. 또 다른 특징(feature)에 "인접하여(adjacent)" 배치된 구조 또는 특징에 대한 언급은 인접한 특징과 겹쳐지거나 또는 그 아래에 위치하는(underlie) 부분을 포함할 수 있는 것으로 당해 기술분야의 기술자에 의해 이해될 것이다.

[0027] 공간적으로 상대적인 용어(spatially relative terms), 예를 들면, "아래(under)", "밑(below)", "하부(lower)", "위에(over)", "상부(upper)" 등은 본 명세서에서 도면에 예시된 바와 같이, 하나의 요소 또는 특징의 또 다른 요소 또는 특징에 대한 관계를 설명하기 위한 설명의 용이를 위해 사용된다. 공간적으로 상대적인 용어들은 도면에 표현된 배향 외에 사용 또는 작동 중인 장치의 다른 배향들을 포함하도록 의도되는 것으로 이해될 것이다. 예를 들면, 도면의 장치가 뒤집힌 경우, 다른 요소 또는 특징의 "아래" 또는 "밑"에 있는 것으로 기재된 요소들이 나머지 요소 또는 특징의 "위"에 배향될 것이다. 따라서, 예시적 용어 "아래(under)"는 "위" 및 "아래"의 배향 모두를 포함할 수 있다. 장치가 달리 배향될 수 있고(90도 회전되거나 또는 다른 배향으로) 본 명세서에서 사용된 공간적으로 상대적인 설명들은 그에 따라 해석된다. 마찬가지로, 용어 "상향으로(upwardly)", "하향으로(downwardly)", "세로의(vertical)", "가로의(horizontal)" 등은 달리 구체적으로 표시되지 않으면, 본 명세서에서 설명의 목적으로만 사용된다.

[0028] 다양한 요소들을 기술하기 위해서 용어 "제 1(first)", "제 2(second)" 등이 본 명세서에서 사용될 수 있으나, 이러한 요소들은 이들 용어에 의해 한정되지 않는 것으로 이해될 것이다. 이러한 용어들은 단지 하나의 요소를 또 다른 요소와 구별하기 위해서만 사용된다. 따라서, 하기에서 검토되는 "제 1" 요소는 본 발명의 교시로부터 벗어나지 않으면서 또한 "제 2" 요소로 지칭될 수 있다. 동작(또는 단계)의 순서는 구체적으로 달리 표시되지 않으면, 청구항 또는 도면에 제시된 순서로 한정되지 않는다.

[0029] 본 명세서에서 사용된, 용어 "증가하다(increase, increases)", "증가된(increased)", "증가하는(increasing)" 및 유사한 용어는 특정된 파라미터의 적어도 약 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, 150%, 200%, 300%, 400%, 500% 또는 그 이상의 상승을 나타낸다.

[0030] 본 명세서에서 사용된, 용어 "감소하다(reduce, reduces)", "감소된(reduced)", "감소(reduction)", "억제하다(inhibit)" 및 유사한 용어는 특정된 파라미터의 적어도 약 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 또는 100%의 감소를 나타낸다.

[0031] 본 발명에서 사용된 "세포들(cells)" 및 "세포(cell)"는 일반적으로, 동물 세포, 구체적으로 포유류 및 영장류 세포이고, 이들의 예는 인간, 개, 고양이, 토끼, 원숭이, 침팬지, 소, 돼지, 염소를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 세포들은 적어도 부분적으로 특정한 세포 또는 조직 종류, 예를 들면, 간, 장, 췌장, 림프절, 평활근, 골격근, 중추 신경, 말초 신경, 피부, 면역계 등으로 분화될 수 있다. 일부 세포들은 하기에서 검토되는 암 세포일 수 있고, 이들은, 선택적으로 하기에서 검토되는 바와 같은, 검출가능한 화합물을 (천연적으로, 또는 재조합 기법에 의해) 발현할 수 있다.

[0032] "3차원 조직 구조체(three dimensional tissue construct)" 및 "오가노이드(organoid)"는 본 명세서에서 호환적으로 사용되며, 본 명세서에서 사용된 바와 같이, (단일층과 대조적으로) 3차원 형상(configuration) 또는 다층 형상으로 배열된, 일반적으로 담체 배지(carrier media) 중에 있는, 살아있는 세포의 조성물을 의미한다. 오가노이드는 기관, 조직, 또는 그의 일부의 기능 및/또는 조직학적 구조를 모사하거나 유사하도록 인 비트로에서 형성된 인공적인, 3차원 구조체이다. 적절한 담체 배지는 히드로겔(hydrogel), 예를 들면, 하기에 기술된 바와 같은 가교 히드로겔을 포함한다. 히드로겔의 추가적인 예는 각각의 내용이 그 전체로 참조에 의해 본 명세서에 포함된 PCT/US2015/055699, PCT/US2017/058531, 및 2018년 10월 10일에 제출된 미국 출원 제16/156,535호에 기재된 것들을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 오가노이드는 모델링(model)되거나 모방되는 특정한 조직 및/또는 기관에 따라, 1종(type) 이상(예를 들면, 1, 2, 3, 4개, 또는 그 이상)의 분화된 세포를 포함할 수 있다. 일부 오가노이드는 하기에서 더 검토되는 바와 같이, 암 세포를 포함할 수 있다. 오가노이드가 암 세포를 포함하는 경우, 그들은 조직 세포를 포함할 수 있고, 및/또는 세포 없이 조직 모사체(tissue mimic), 예를 들면, 세포외 매트릭스(extracellular matrix) (또는 그로부터 유래된 단백질 및/또는 폴리머), 히알루론산, 젤라틴, 콜라겐, 알기네이트 등, 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다. 따라서, 일부 구체예에서, 세포는 세포외 매트릭스 또는 가교된 매트릭스와 함께 혼합되어 오가노이드를 형성하고, 다른 구체예에서, 세포 응집체(cell aggregate), 예를 들면, 스페로이드(spheroid) 및/또는 오가노이드가 예비-형성(pre-form)될 수 있고, 그 후 세포외 매트릭스 및/또는 본 발명의 조성물과 조합될 수 있다.

[0033] 일부 구체예에서, 오가노이드는 티올화(thiolated) 히알루론산(본 명세서에서 호환적으로 티올-변형(thiol-modified) 히알루론산으로도 지칭됨), 메타크릴화(methacrylated) 콜라겐(본 명세서에서 메타크릴레이트-변형 콜라겐으로도 지칭됨), 및 물을 포함하는 히드로겔에 존재할 수 있고 및/또는 형성될 수 있다. 하나 이상(예를 들면, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7개, 또는 그 이상)의 추가적인 성분들이 히드로겔에 존재할 수 있다. 예를 들면, 일부 구체예에서, 오가노이드는 메타크릴화 젤라틴(GelMa), 헤파린 술페이트, 콘드로이틴 술페이트, 알기네이트 소디움 염, 비변형 젤라틴(unmodified gelatin), 엘라스틴, 비-티올화 히알루론산(non-thiolated hyaluronic acid), 비-메타크릴화 콜라겐(예를 들면, 타입 I, II, III, 및/또는 IV 콜라겐), 조성물의 탄성 모듈러스(elastic modulus)를 변형시키기 위한 하나 이상의 성분, 세포 접합 프로파일 변형(cell adhesion profile modification)을 위한 하나 이상의 성분, 조직-특이적 생화학적 변형을 위한 하나 이상의 성분, 및/또는 하나 이상의 소형 분자(예를 들면, 추가적인 가교 능력을 가질 수 있고, 및/또는 수소 결합 및/또는 비-공유결합 복합체화(complexing)를 제공할 수 있는 소형 분자)를 포함하는 히드로겔에 존재할 수 있다. 일부 구체예에서, 본 발명의 오가노이드는 광개시제(photoinitiator), 약 1% w/v 티올화 히알루론산, 및 약 4 mg/mL 메타크릴화 콜라겐(methacrylated collagen)을 포함하는 히드로겔에 존재하고 및/또는 그 히드로겔 중에 형성될 수 있고, 선택적으로, 상기 티올화 히알루론산과 메타크릴화 콜라겐은 부피 기준으로 1:3 비율(티올화 히알루론산:메타크릴화 콜라겐)로 혼합되고, 광중합(photopolymerization)(예를 들어, UV 광에 의한 광중합)을 통해 가교된다. 일부 구체예에서, 티올화 히알루론산과 메타크릴화 콜라겐은 약 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 또는 1:5 (티올화 히알루론산:메타크릴화 콜라겐)의 부피 기준 비율로 혼합된다. 그 내부에 오가노이드가 존재하고 및/또는 침착된(deposited) 히드로겔의 부피는 약 1, 5, 10, 15, 또는 20 ㎕ 내지 약 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 또는 60 ㎕ 범위일 수 있다. 그 내부에 오가노이드가 존재하고 및/또는 침착된 히드로겔의 부피는 약 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 또는 60 ㎕일 수 있다. 일부 구체예에서, 본 발명의 오가노이드 및/또는 히드로겔은 저장소(reservoir) 및/또는 복수 개의 저장소(예를 들면, 웰 플레이트의 웰)에 존재할 수 있다. 저장소는 오

가노이드 및/또는 히드로겔을 수용하는 적절한 저장소 또는 용기일 수 있다. 일부 구체예에서, 상기 저장소는 웰 플레이트의 웰, 예를 들면, 6-웰 플레이트, 12-웰 플레이트, 24-웰 플레이트, 48-웰 플레이트, 96-웰 플레이트, 또는 384-웰 플레이트의 웰이나, 이에 한정되지 않는다.

[0034] 일부 구체예에서, 오가노이드는 단백질(예를 들면, 부착 단백질(adhesion protein)) 및/또는 프로테오글리칸, 선택적으로 변형된 단백질 및/또는 변형된 프로테오글리칸을 포함하는 히드로겔에 존재할 수 있다. 일부 구체예에서, 상기 단백질 및/또는 프로테오글리칸은 티올화 히알루론산, 비-티올화 히알루론산, 메타크릴화 콜라겐, 및/또는 비-메타그릴화 콜라겐에 결합하고 및/또는 가교될 수 있는, 하나 이상의 관능기로 변형될 수 있고, 예를 들면, 말레이미드(maleimide)로 변형될 수 있다. 일부 구체예에서, 오가노이드는 피브로넥틴, 헤파린, 및/또는 라미닌, 선택적으로 변형 피브로넥틴, 헤파린, 및/또는 라미닌(예를 들면, 말레이미드에 의해 변형된 라미닌), 또는 기타 세포 부착 단백질 및/또는 세포 부착 단백질 펩티드 유도체를 포함하는 히드로겔에 존재할 수 있다.

[0035] 하나 이상의 성장 인자가 히드로겔에 존재할 수 있다. 일부 구체예에서, 상기 히드로겔은 헤파린 곁사슬(heparin pendant chain)에 연결되고 및/또는 결합된 하나 이상의 성장 인자를 포함한다. 상기 하나 이상의 성장 인자는 상기 히드로겔에 존재하고 및/또는 그에 첨가될 수 있는 특정한 세포 및/또는 제조될 특정한 조직 대체물(tissue substitute) 및/또는 오가노이드에 적합할 수 있다. 일부 구체예에서, 성장 인자 및/또는 기타 성장 촉진 단백질이 조직 세포에 상응하는 조직으로부터의 탈세포화(decellularized) 세포외 매트릭스 조성물(ECM)(예를 들면, 살아있는 동물 세포가 간 세포인 경우, 탈세포화 세포외 간 매트릭스; 살아있는 동물 세포가 심근 세포인 경우, 탈세포화 세포외 심근 매트릭스; 살아있는 동물 세포가 골격근 세포인 경우, 탈세포화 세포외 골격근 매트릭스; 등)으로 제공될 수 있다. 추가적인 콜라겐, 글리코사미노글리칸, 및/또는 엘라스틴(예를 들면, 세포외 매트릭스 조성물을 보충하기 위해 첨가될 수 있는 것들), 등도 포함될 수 있다.

[0036] 일부 구체예에서, 오가노이드는 하나 이상(예를 들면, 1, 2, 3, 4, 5개, 또는 그 이상)의 조직(예를 들면, 포유류 신체에서 발견되는 조직)의 생화학적 프로파일(biochemical profile)과 일치하도록(match) 맞춤화될 수 있는 히드로겔에 존재할 수 있다. 일부 구체예에서, 부착 단백질, 예를 들면, 특정 조직에서 발견되는 부착 단백질은 조성물 중 성분으로의 직접적인 결합(coupling)이 가능하도록 합성에 의해 변형될 수 있다(예를 들면, 티올화 히알루론산 및/또는 메타크릴화 콜라겐). 성장 인자들이 헤파린 곁사슬을 통해 연결될 수 있다. 피브로넥틴, 라미닌, 및/또는 기타 부착 단백질이 조성물 중 하나의 성분에 직접적으로 가교되는 하나 이상의 화학 작용기(chemical group)를 작용기를 갖도록 합성에 이해 변형될 수 있고(예를 들면, 티올화 히알루론산 및/또는 메타크릴화 콜라겐), 이는 조직-특이적 맞춤화(tissue-specific customization)를 가능하게 한다. 일부 구체예에서, 조성물 중 공유결합에 의해 연결된 피브로넥틴의 내포는 조성물에서 형성되고 및/또는 그에 제공된 오가노이드(예를 들면, 간 오가노이드)의 기능을 유지하는 것에 중대한 영향을 가질 수 있다.

[0037] 세포들은 비캡슐화(unencapsulated) 세포, 또는 이전에 스페로이드 또는 (전술된 바와 같은) 예비-형성된(pre-formed) 오가노이드에 캡슐화된 세포를 포함한, 적절한 형태로 조성물 및/또는 히드로겔에 내포될 수 있다. 폴리머 스페로이드에 캡슐화되거나 담긴 동물 조직 세포가 공지된 기법에 따라 생산될 수 있거나, 일부 경우에, 상업적으로 이용가능하다(*예를 들면,* Insphero AG, *3D Hepg2 Liver Microtissue Spheroids* (2012); Inspherio AG, *3D InSight™ Human Liver Microtissues*, (2012) 참조).

[0038] 일부 구체예에서, 본 발명의 오가노이드는 인간-유래 세포인 세포들을 포함하고, 일부 구체예에서, 오가노이드는 인간-유래 세포로 구성된 세포들을 포함한다. 본 발명의 오가노이드는 인 비보에서 해당 세포에 의해 생성되는 바이오마커와 동일한 하나 이상(예를 들면, 1, 2, 3, 4개, 또는 그 이상)의 바이오마커를 발현할 수 있고 및/또는 생산할 수 있다. 예를 들면, 간 세포는 인 비보에서 알부민을 생성하고, 간 세포를 포함하는, 본 발명의 오가노이드는 알부민을 발현할 수 있다. 일부 구체예에서, 오가노이드는 인 비보에서 상응하는 세포에 의해 생성되고 및/또는 발현되는 평균량과 동일한 양 또는 그 평균량의 ± 20%, ± 10%, 또는 ± 5%인 양으로 바이오마커를 발현할 수 있다. 바이오마커의 예는 알부민, 글루타티온 S-트랜스퍼라아제(GST) (예를 들면, α-GST), 케모카인(예를 들면, IL-8, IL-1β, 등), 프로스타사이클린(prostacyclin), SB100B, NSE(neuron-specific enolase), MBP(myelin basic protein), 호르몬(예를 들면, 테스토르테론, 에스트라디올, 프로게스테론, 등), 인히빈 A/B, LDH(lactate dehydrogenase), 및/또는 TNF(tumor necrosis factor)를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 세포들은 분화 세포 또는 미분화 세포일 수 있으나, 일부 구체예에서, 조직 세포(예를 들면, 간세포(hepatocyte)와 같은 간 세포, 췌장 세포, 심근 세포, 골격근 세포, 등)이다.

[0039] 세포의 선택은 생성될 특정 오가노이드에 따라 결정될 것이고, 세포들은 형광 화합물(예를 들면, 염료, 단백질,

등)과 같은, 그러나 이에 한정되지 않는 검출가능한 화합물로 표지될 수 있다. 예를 들면, 간 오가노이드의 경우에, 간의 간세포(liver hepatocyte cell)가 이용될 수 있다. 말초신경 또는 중추신경 오가노이드의 경우, 말초 신경 세포, 중추 신경 세포, 신경교 세포, 또는 이들의 조합이 사용될 수 있다. 골 오가노이드의 경우, 골조골세포, 골 파골세포, 또는 이들의 조합이 사용될 수 있다. 폐 오가노이드의 경우, 폐 기도 상피 세포가 사용될 수 있다. 림프절 오가노이드의 경우, 여포성 수지상 림프 세포(follicular dendritic lymph cells), 섬유모세포성 망상 림프 세포(fibroblastic reticular lymph cells), 백혈구, B 세포, T 세포, 임의의 골수 세포(예를 들면,(수지상 세포 및 포식 세포를 포함한) 기원이 골수인 세포(any myeloid in origin)), 림프구 기원 세포(lymphoid in origin cell), 또는 이들의 조합이 사용될 수 있다. 평활근 및/또는 골격근 오가노이드의 경우, 평활근 세포, 골격근 세포, 또는 이들의 조합이 사용될 수 있다. 피부 오가노이드의 경우, 피부 각질형성 세포(keratinocyte), 피부 멜라닌형성 세포(melanocyte), 또는 이들의 조합이 사용될 수 있다. 조성물로의 최초 내포(initial incorporation) 시에, 세포들은 분화된 것일 수 있거나, 또는 후속적으로 분화되는 미분화 세포가 사용될 수 있다. 추가적인 세포가 조성물 및/또는 히드로겔에 첨가될 수 있다. 일부 구체예에서, 종양 세포 및/또는 면역 세포가 오가노이드(예를 들면, 간 오가노이드)에 첨가되거나, 또는 오가노이드는 면역 세포의 존재 또는 부재 하에 주로 종양 세포로 구성될 수 있다. 일부 구체예에서, 본 발명의 오가노이드는 백혈구, 말초 혈액 단핵 세포, 여포성 수지상 림프 세포, 섬유모세포성 망상 림프 세포, 백혈구(leukocyte), B 세포, T 세포, 임의의 골수 세포(예를 들면, (수지상 세포 및 포식 세포를 포함한) 기원이 골수인 세포), 및/또는 림프구 기원 세포로부터 선택될 수 있는, 1종 이상의 면역 세포를 포함하거나, 이들로 필수적으로 구성되거나 또는 이들로 구성된다. 일부 구체예에서, 상기 1종 이상의 면역 세포는 개체의 림프절(예를 들면, 림프절 생체시료(biospecimen)), 골수, 및/또는 말초혈액 또는 그의 분획(fraction) (예를 들면, 백혈구 분획, 예를 들면, 말초혈액 단핵세포(PBMC) 분획)으로부터 유래 및/또는 수집될 수 있다.

[0040] 일부 구체예에서, 본 발명의 오가노이드는 예를 들면, 동일한 오가노이드 내에 종양 세포와 면역 세포가 존재한다는 점에서 혼합 오가노이드(mixed organoid)일 수 있다(본 명세서에서 혼합 종양/면역 오가노이드(ixed tumor/immune organoid)로도 지칭됨). 일부 구체예에서, 본 발명의 오가노이드는 공생성 오가노이드일 수 있다. 본 명세서에서 사용된, "공생성 오가노이드(symbiotic organoid)" 는 종양 세포와 면역 세포가 접촉하고 있는 것인 하나 이상의 오가노이드를 의미한다. 일부 구체예에서, 공생성 오가노이드는 종양 세포 및 면역 세포를 포함하는 하나의 오가노이드(예를 들면, 혼합 오가노이드)로 구성된다. 일부 구체예에서, 공생성 오가노이드는 2개 이상의 오가노이드를 포함하고, 상기 2개 이상의 오가노이드 중 제 1 오가노이드는 종양 세포를 포함하고, 상기 2개 이상의 오가노이드 중 제 2 오가노이드는 면역 세포를 포함하며, 상기 제 1 오가노이드의 적어도 일부분과 상기 제 2 오가노이드의 적어도 일부분은 상호 간에 접촉하고 있다. 공생성 오가노이드와 관련하여 본 명세서에서 사용된 "접촉하고 있는(in contact)"은 종양 세포의 적어도 일부와 면역 세포의 적어도 일부가 충분히 인접하여 물리적으로 접촉하고 있고, 세포 대 세포 소통(cell to cell communication)을 갖고, 및/또는 동일한 오가노이드 내에 및/또는 위에 존재하는 것을 의미한다. 일부 구체예에서, 2개 또는 그 이상의 별개의 오가노이드가 함께 성장해서 공생성 오가노이드를 형성할 수 있다. 일부 구체예에서, 면역 오가노이드와 별개의 종양 오가노이드 간의 소통을 제공하고 및/또는 소통을 가능하게 하기 위해 세포 이동(예를 들면, 순환을 통한 세포 이동)이 요구될 수 있다.

[0041] 본 발명의 환자-유래 종양 오가노이드(PTO)는, 예를 들면, 각각 환자 자신의 종양으로부터 수득된, 종양 세포를 연관된 기질(stroma) 및/또는 종양-침윤 백혈구(TIL)와 혼합하는 것에 의해, 환자의 종양 미세환경을 재현할 수 있다. 림프절은 각각의 개별적인 환자의 면역계 표현(immune system representation)의 80%를 포함하고, 풍부한 항원 제시 세포(APC)를 통해 적응성 면역의 발달에서 중심적 역할을 갖는다. 일부 구체예에서, 본 발명의 면역 종양 오가노이드는, 선택적으로 림프절 조직이 환자에 대해 이용가능하지 않은 경우, 말초 혈액 단핵 세포를 포함할 수 있다.

[0042] 본 발명에서 선택적으로 사용되는 암 세포는 흑색종, 암종, 육종(혈관 육종, 점액섬유육종, 평활근육종, 융기성 피부섬유육종(dermatofibrosarcoma protuberans)을 포함하나, 이에 한정되지 않음), 모세포종, 신경교종, 충수(appendiceal) 암, 골수종(예를 들면, 다발성 골수종), 두경부암, 유방암, 폐암, 및 성상세포종 세포, 등을 포함하나, 이에 한정되지 않는 임의의 종류의 암세포일 수 있다. 일부 구체예에서, 본 발명에서 사용된 암세포는 N-카데린(N-cadherin)을 발현하고, 및/또는 상피간엽이행(epithelial to mesenchymal transition)을 보인다. 암세포는 장(소장, 대장, 결장, 충수), 폐, 유방, 전립선, 피부, 골, 뇌, 간, 췌장, 자궁, 자궁경부, 정소, 및 난소 암세포, 등을 포함하나, 그에 한정되지 않는 임의의 기원의 조직으로부터의 암세포일 수 있다.

[0043] 일부 구체예에서, 세포는 개체, 예를 들면, 암의 치료를 받고 있고 및/또는 암을 가진 개체 및/또는 환자, 및/

또는 약화된(compromised) 면역계를 갖는 개체로부터 수득될 수 있다. 일부 구체예에서, 세포는 종양 세포, 예를 들면, 환자 생검-유래 종양 세포이고, 그러한 세포로부터 제조된 오가노이드가 잠재적으로 효과적인 약물 및/또는 치료를 스크리닝하기 위해 사용될 수 있다. 장(소장, 대장, 결장, 충수), 폐, 유방, 전립선, 피부, 골, 뇌, 간, 췌장, 자궁, 자궁경부, 정소, 및 난소 종양 세포, 등을 포함하나, 그에 한정되지 않는 임의의 종류의 종양 세포가 본 발명의 오가노이드, 장치, 및/또는 방법에서 사용될 수 있다. 생검 유래 종양 오가노이드(biopsy-derived tumor organoid)의 예는 중피종, 대장(colorectal), 충수, 폐, 흑색종, 및 육종 오가노이드를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 일부 구체예에서, 세포는 조직 생검으로부터 수득된 양성(benign) 세포(비-암성(non-cancerous) 세포로도 지칭됨)를 포함한다. 세포는 적어도 부분적으로 특정한 세포 또는 조직 종류, 예를 들면, 뇌, 간, 장, 췌장, 림프절, 평활근, 골격근, 중추신경, 말초신경, 면역계 등으로 분화될 수 있다. 생검-유래 세포(예를 들면, 종양 및/또는 양성)가 본 발명의 오가노이드를 형성 및/또는 제조하기 위해 사용될 수 있고, 결과적으로 수득된 오가노이드는 생검 후 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 또는 8일 내에 본 발명의 방법 및/또는 장치에서 제조되고 및/또는 사용될 수 있다. 일부 구체예에서, 세포는 형광 화합물(예를 들면, 염료, 단백질, 등)과 같은, 그러나 그에 한정되지 않는 검출 가능한 화합물로 표지될 수 있다. 일부 구체예에서, 종양 세포를 포함하는 오가노이드, 이를 포함하는 장치, 및/또는 그의 사용 방법이, 그 내용이 전체로 참조에 의해 본 명세서에 포함된, 국제출원 PCT/US2017/045277에 기재된 바와 같을 수 있다.

[0044] 일부 구체예에서, 본 발명의 오가노이드는 불멸화 세포주(immortalized cell line)로부터의 세포로부터 제조되지 않고 및/또는 상기 세포를 포함하지 않는다. 본 발명의 오가노이드는 일차 세포(primary cell) 및/또는 줄기 세포, 예를 들면, 유도 만능 줄기 세포 및/또는 분화된 iPS-유래 세포와 같은, 그러나 이에 한정되지 않는 고 기능성 세포(high functioning cell)를 포함하고, 및/또는 그를 사용하여 제조될 수 있다.

[0045] 일부 구체예에서, 본 발명의 오가노이드는 살아있는 종양 세포로 이루어진(comprised of) 코어; 및 상기 코어를 둘러싸는(예를 들면, 봉입하는(encapsulating)) 쉘(shell)을 포함하고, 상기 쉘은 살아있는 면역 세포 및/또는 살아있는 양성 세포(예를 들면, 조직 세포, 비-암성 세포, 등)로 이루어진다. 양성 세포는 개체, 예를 들면, 개체 중 조직으로부터 수득 및/또는 유래될 수 있고, 선택적으로, 종양 세포 및/또는 면역 세포와 동일한 개체로로부터 수득 및/또는 유래될 수 있다. 일부 구체예에서, 상기 살아있는 양성 세포는 조직 생검물(biopsy)로부터 수득 및/또는 유래될 수 있고, 및/또는 조직 특이적일 수 있다. 살아있는 양성 세포를 포함하는 오가노이드는 살아있는 종양 세포 및/또는 면역 세포를 포함하는 오가노이드와 별개일 수 있다(예를 들면, 장치의 상이한 챔버에 별개로 형성 및/또는 존재할 수 있다).

[0046] 세포(예를 들면, 면역 세포, 종양 세포, 및/또는 양성 세포)가 개체, 예를 들면, 개체로부터의 조직 시료 및/또는 종양 생검물로부터 수득되는 경우, 하나 이상의 별개의 세포 집단을 제공하기 위해 상이한 세포 집단들이 분리될 수 있고, 상기 별개의 세포 집단들 중 하나 또는 그 이상이 표지될 수 있고 및/또는 본 명세서에 기재된 오가노이드를 제조하기 위해 사용될 수 있다. 상이한 세포들의 집단을 분리하는 방법이 당해 분야에서 기술자에게 알려져 있고, 임의의 적합한 방법, 예를 들면, FACS(fluorescence activated cell sorting)를 포함하나, 이에 한정되지 않는 방법이 이용될 수 있다. 2개 이상의 세포 집단이 표지되는 경우, 상기 2개 이상의 세포 집단은 상이한 검출가능한 신호를 가질 수 있다. 일부 구체예에서, 조직 시료 및/또는 조직 생검물이 돌연변이를 식별하기 위해 부분적으로 또는 완전히 유전적으로 시퀀싱될 수 있고, 식별된 돌연변이가 개체를 위한 치료 목적(예를 들면, 면역계 조절 활성 및/또는 항-종양 활성)을 위해 하나 이상의 목적 화합물을 나타내고 및/또는 시사할 수 있다. 본 발명의 방법은 유전자 시퀀싱에서 확인된 하나 이상의 목적 화합물을 스크리닝하는 단계, 및 상기 하나 이상의 목적 화합물 및/또는 이들의 조합을 조직 시료로부터의 세포를 사용하여 제조된 오가노이드와 접촉시키는 단계를 포함할 수 있다. 본 발명의 오가노이드는 개체에서 인 비보에서 발견되는 조직 및/또는 종양과 동일하거나 실질적으로 동일한 이질성(heterogeneity)을 가질 수 있다.

[0047] 상기 하나 이상의 세포 집단(이들 각각이 선택적으로 표지될 수 있음)은 적절한 방식으로 조합될 수 있다. 일부 구체예에서, 상기 하나 이상의 세포 집단이 동일한 공통 배지 및/또는 히드로겔에 첨가될 수 있다. 일부 구체예에서, 상기 하나 이상의 세포 집단이 본 발명의 히드로겔에 의해 캡슐화된 본 명세서에 기재된 오가노이드를 형성하기 위해 사용될 수 있다. 본 발명의 오가노이드 중 하나 또는 그 이상의 상이한 세포 집단은 인 비보에서 조직 및/또는 종양의 해당 집단에 있는 세포의 양과 실질적으로 동일한(예를 들면, 약 ±20% 내) 양으로 존재할 수 있다. 일부 구체예에서, 세포가 개체로부터의 조직 시료로부터 수득되고, 분류(sort)되고, 및/또는 표지된 경우, 상이한 세포 집단들이 상기 조직 시료에 존재하는 양과 동일한 양으로 조합된다. 일부 구체예에서, 본 발명의 오가노이드를 형성하기 위해 사용된 세포(예를 들면, 종양 세포)는 분류되지 않을 수 있고, 이는 원래의 이질성(native heterogeneity)를 갖는 오가노이드의 제공을 촉진할 수 있다. 예를 들면, 일부 구체예에서, 종양

세포는 본 발명의 종양 오가노이드 및/또는 혼합 오가노이드를 형성하기 전에 분류되지 않고, 이는 종양 오가노이드가, 예를 들면, 최초 생체시료(original biospecimen) 및/또는 샘플에 존재하는 기질 세포(stromal cell), 내피 세포, 면역 세포, 등을 포함하는 것에 의해 원래의 종양 이질성을 모사할 수 있게 한다. 유사하게, 일부 구체예에서, 면역 세포는 본 발명의 면역 오가노이드 및/또는 혼합 오가노이드를 형성하기 전에 분류되지 않고, 이는 오가노이드가 종양 세포를 사멸시키는데 필요한 T 세포 교육(education) 및/또는 활성화에 중요할 수 있는 오가노이드에 있는 다른 세포들, 예를 들면, B 세포, 수지상 세포, 포식세포, 등을 유지할 수 있게 한다. 따라서, 본 발명의 오가노이드는 비-종양 세포 및/또는 비-T 세포 지지 세포(non-T cell support cell)를 포함할 수 있고, 이들은 종양 또는 면역(예를 들면, 림프절) 미세환경을 유지하는데 기여할 수 있고 및/또는 ECM의 다양한 신호전달 메카니즘 및 일부 천연적인 리모델링(natural remodeling)을 통해 생존력을 유지시키는 것을 촉진할 수 있다. 일부 구체예에서, 본 발명의 종양 오가노이드는 종양 세포를 연관된 기질(associated stroma) 및/또는 종양 침윤성 백혈구(TIL)를 결합시키는 것에 의해 종양 미세환경(tumor microenvironment)을 재현한다. 일부 구체예에서, 면역 세포가 혈액으로부터 수득되는 경우, 적혈구를 제거하기 위해 적혈구 용해가 수행된다.

[0048] 일부 구체예에서, 2개 이상(예를 들면, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8개, 또는 그 이상)의 상이한 오가노이드가 단일 개체로부터 (예를 들면, 상기 개체로부터의 하나 이상의 생검물을 이용하여) 수득 및/또는 유래된 세포로 형성될 수 있고, 하나 이상의 오가노이드는 상기 개체로부터의 종양 생검물로부터의 살아있는 종양 세포를 포함하고, 하나 이상의 별개의 오가노이드는 상기 개체로부터의 살아있는 면역 세포 및/또는 살아있는 양성(예를 들면, 간) 세포를 포함한다. 일부 구체예에서, 2개 이상(예를 들면, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8개, 또는 그 이상)의 상이한 오가노이드가 단일 개체로부터 (예를 들면, 상기 개체로부터의 하나 이상의 생검물을 이용하여) 수득 및/또는 유래된 세포로 형성되고, 하나 이상의 오가노이드는 상기 개체로부터의 종양 생검물로부터의 살아있는 종양 세포를 포함하고, 선택적으로, 상기 개체로부터의 면역 세포를 포함하며, 하나 이상의 별개의 오가노이드는 상기 살아있는 종양 세포와 동일한 조직 종류(type)인, 상기 개체로부터의 살아있는 양성 세포를 포함하고, 선택적으로, 상기 개체로부터의 면역 세포를 포함한다. 일부 구체예에서, 본 발명의 오가노이드는 개체로부터의 하나 이상의 생검물을 이용하여, 단일 개체로부터 수득 및/또는 유래된 세포들을 조합하는 것에 의해 생성될 수 있다 (예를 들면, 개체로부터의 종양 생검물로부터 수득 및/또는 유래된 세포와 동일한 개체로부터의 별개의 림프절 생검물로부터 수득 및/또는 유래된 세포를 조합하는 것에 의해 생성된 혼합 종양/림프절 공생성 오가노이드). 일부 구체예에서, 개체로부터 생검된(biopsied) 조직이, 선택적으로 2 mm x 2 mm 다진(minced) 조직으로부터 수득된 세포와 함께, 본 발명의 하나 이상의 오가노이드를 제조하기 위해 사용될 수 있다. 일부 구체예에서, 본 발명의 오가노이드는 종양 모델 및/또는 면역계 모델로서 유용할 수 있다. 예를 들면, 오가노이드는 면역학적 활성을 평가하고 및/또는 면역계를 조절하기 위해 유용하고 및/또는 하나 이상의 암 치료법 및/또는 면역요법을 스크리닝하기 위해 유용할 수 있다. 예를 들면, 본 발명의 종양 오가노이드, 예를 들면, 혼합 종양/면역 오가노이드(예를 들면, 혼합 종양/림프절 공생성 오가노이드)는 환자의 말초혈액 T 세포가 환자 자신의 림프절/종양 공생성 오가노이드에 포함된 항원 제시 세포(APC)의 표면에 전시되는 종양 항원을 인식할 수 있게 하는 훈련(training)을 통해 적응 면역의 생성에 대한 스크리닝을 가능하게 할 수 있다.

[0049] 일부 구체예에서, 오가노이드는 약 50 ㎛, 100 ㎛, 또는 200 ㎛ 내지 약 350 또는 500 ㎛, 예를 들면, 약 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 또는 500 ㎛의 직경 및/또는 최소 치수(smallest dimension)를 갖는다. 일부 구체예에서, 오가노이드는 약 100, 90, 80, 70, 60, 또는 50 ㎛ 미만의 직경 및/또는 최소 치수를 갖는다. 일부 구체예에서, 오가노이드는 약 1 ㎕ 내지 약 20 ㎕ 부피, 예를 들면, 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20 ㎕ 부피를 갖는다. 오가노이드는 총 약 1,500개, 2,000개, 또는 5,000개 내지 약 10,000개, 25,000개, 또는 50,000개의 세포, 또는 총 약 1,000개, 5,000개, 10,000개, 또는 50,000개 내지 약 75,000개, 100,000개, 150,000개, 250,000개, 500,000개, 750,000개, 1,000,000개, 50,000,000개, 또는 100,000,000개의 세포를 포함할 수 있다. 일부 구체예에서, 본 발명의 오가노이드는 약 1백만, 2백만, 또는 5백만개 내지 약 10백만, 25백만, 50백만, 또는 100백만개의 세포/mL를 포함할 수 있다. 일부 구체예에서, 본 발명의 오가노이드는 mL당 약 천만개의 세포, 또는 mL당 2천만개의 세포를 포함할 수 있다. 일부 구체예에서, 본 발명의 오가노이드는 mL당 약 5백만 또는 천만개의 세포 내지 mL당 약 1천5백만개 또는 2천만개의 세포를 포함할 수 있다. 본 발명의 오가노이드는 적합한 형태, 예를 들면, 3차원 형태 또는 다층 형태(multi-layered shape)일 수 있다. 일부 구체예에서, 본 발명의 오가노이드는 스페로이드(spheroid)의 형태이다. 일부 구체예에서, 본 발명의 오가노이드는 현탁액 또는 배지(예를 들면, 가교된 히드로겔)에서 자가-조직화(self-organized)될 수 있다.

[0050] 본 명세서에서 사용된, "개체(subject)"는, 본 발명의 양태들이 수의학 및/또는 연구 목적으로, 다른 동물 개체들, 특히, 포유류 개체(예를 들면, 개, 고양이, 말, 염소, 양)에서 구현될 수 있으나, 일반적으로 인간 개체이

다. 개체는 유아, 청소년, 청년, 성년(adult), 및 노년(geriatric)을 포함한, 임의의 연령의 남성 또는 여성일 수 있다.

[0051] "성장 배지(growth media)"와 "배양 배지(culture media)"는 본 명세서에서 호환적으로 사용되고, 본 발명을 실시하기 위해 사용되는 세포를 유지하는 천연 또는 인공 성장 배지(일반적으로 수성 액체)일 수 있다. 예는 필수 배지(essential media) 또는 최소 필수 배지(MEM), 또는 그의 변형물, 예를 들면, EMEM(Eagle's minimal essential medium) 및 DMEM(Dulbecco's modified Eagle medium), 및 그의합성 모사물(synthetic mimics)을 포함한 혈액, 혈청, 혈장, 림프액, 등을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 일부 구체예에서, 성장 배지는 pH 발색 지시약(pH color indicator)(예를 들면, 페놀 레드)을 포함한다.

[0052] "테스트 화합물(test compound)", "후보 화합물(candidate compound)" 및 "목적 화합물(compound of interest)"은 본 명세서에서 호환적으로 사용되며, 그의 약리적 또는 생리적 활성이 결정될 임의의 화합물 또는 작용제(agent), 예를 들면, 그의 세포 또는 조직 (예를 들면, 심장 조직)에 대한 약리적 또는 생리적 활성 및/또는 2개의 테스트 화합물/작용제 간의 상호작용이 결정될 화합물 또는 작용제일 수 있다. 예시적 목적을 위해, 이소프로테레놀(isoproterenol), 퀴니딘(quinidine), 프로프라놀롤(propranolol), 및 에피네프린이 테스트 화합물의 예이다. 그러나, 단백질, 펩티드, 핵산, 및/또는 소형 유기 화합물(지방족, 방향족, 및 혼합 지방족/방향족(mixed aliphatic/aromatic) 화합물)과 같은, 그러나 이에 한정되지 않는 유기 화합물을 포함한, 임의의 화합물 및/또는 작용제가 사용될 수 있다. 후보 화합물은 조합 기법(combinatorial technique)에 의한 무작위(random) 생성, 및/또는 특정 표적에 기반한 합리적(rational) 설계를 포함한, 적절한 기법에 의해 생성될 수 있다. 약물 상호작용이 연구되는 경우, 2개 (또는 그 이상)의 테스트 화합물이 동시에 투여될 수 있고, 그 중 1개 (또는 2개 모두)는 공지된 화합물일 수 있고, 그에 대해 가능한 통합된 효과(combined effect)가 결정된다. 일부 구체예에서, 2종 이상의 테스트 화합물이 개체에 대해 인 비보 투여와 유사한(예를 들면, 2종 이상의 테스트 화합물의 단계적 주입(staged infusion)과 유사한) 방식으로 투여될 수 있고, 이는 동시 투여(concurrent administration) 또는 순차적 투여일 수 있다. 일부 구체예에서, 테스트 화합물은 금속, 예를 들면, 알루미늄, 납 등이나 이에 한정되지 않는 금속이다. 일부 구체예에서, 테스트 화합물은 중금속이고, 예를 들면, 비소, 카드뮴, 크롬, 납, 및/또는 수은이나, 이에 한정되지 않는다. 일부 구체예에서, 테스트 화합물은 살충제(pesticide)이다. 일부 구체예에서, 테스트 화합물은 화학요법제 및/또는 면역요법제, 예를 들면, 면역 관문 억제제(ICI)이다. 일부 구체예에서, 면역요법제는 개체의 면역계의 하나 이상의 활성 및/또는 성분을 조절하고 및/또는 그에 영향을 미친다. 일부 구체예에서, 면역요법제는 베무라페닙, 이필리무맙, 니볼루맙, 및/또는 펨브롤리주맙일 수 있다. 일부 구체예에서, 테스트 화합물은 관문 억제제(예를 들면, PD-1 억제제, CTLA-4 억제제, 등)이다. 일부 구체예에서, 테스트 화합물은 유전적으로 조작된 면역 세포(engineered immune cell), 예를 들면, CAR T 세포이다. 일부 구체예에서, 테스트 화합물은 면역원성 약화 면역활성화 바이러스(immunogenic attenuated immunoactivating virus)이다. 일부 구체예에서, 약물 스크리닝은 대량 신속처리(high-throughput) 방법으로 수행되고 및/또는 진행될 수 있다. 예를 들면, 테스트 화합물은 저장소(reservoir) 및/또는 복수 개의 저장소(예를 들면, 웰 플레이트의 웰)에 존재할 수 있다. 일부 구체예에서, 상기 저장소는 웰 플레이트의 웰, 예를 들면, 6-웰 플레이트, 12-웰 플레이트, 24-웰 플레이트, 48-웰 플레이트, 96-웰 플레이트, 또는 384-웰 플레이트의 웰이나 이에 한정되지 않는다.

[0053] 본 명세서에서 사용된, "검출가능한 화합물(detectable compound)"은 형광 화합물(예를 들면, 형광 단백질(예를 들면, 적색 형광 단백질(red fluorescent protein), 녹색 형광 단백질(green fluorescent protein), 등)), 효소, 형광, 또는 방사성 작용기, 또는 기타 표지(label)에 결합된 항체가 특이적으로 결합할 항원성 단백질 또는 펩티드, 또는 기타 적합한 검출가능한 화합물일 수 있다. 검출가능한 화합물은 세포에서 자연적으로 생성되거나(예를 들면, 암 세포, 예를 들면, 비-암 세포보다 암 세포에서 더 높은 수준으로 발현되는 세포 마커 단백질), 또는 유전자 조작/재조합 DNA 기법에 의해 세포 내로 삽입된(즉, 외래의(heterologous)) 것일 수 있다. 일부 구체예에서, 검출가능한 화합물은 QD(quantum dot), 형광 유기 염료(fluorescent organic dye), 및/또는 형광 단백질이다. 일부 구체예에서, 세포는 검출가능한 화합물을 (천연적으로, 또는 재조합 기법에 의해) 발현할 수 있다.

[0054] 검출가능한 화합물은 세포 및/또는 세포 집단의 판별(differentiation) 및/또는 식별을 가능하게 하는 검출가능한 신호를 제공 및/또는 생성하는 적절한 화합물일 수 있다. 검출가능한 신호는 세포와 연관된 하나 이상의 검출가능한 화합물에 의해 제공 및/또는 생성될 수 있다. 일부 구체예에서, 검출가능한 신호는 세포와 연관된(예를 들면, 세포에 적용되거나, 부착되거나, 결합되거나, 복합체화된(compounded)) 하나 이상의 검출가능한 화합물(예를 들면, 화학 물질, 단백질, 등)에 의해 생성되는 신호(예를 들면, 광학적 및/또는 전기적 신호)이다. 검

출가능한 신호는 광학적으로 및/또는 전자적으로 검출가능할 수 있고, 이는 당해 기술 분야에서 기술자에게 알려진 방법을 이용하여, 사람의 눈에 의해 시각적으로 인식되고 및/또는 전자적으로 판독되고, 검출되고, 및/또는 수득될 수 있다. 일부 구체예에서, 세포 및/또는 세포 집단에 대한 검출가능한 신호는 신호의 부재(즉, 검출가능한 신호가 없음, 예를 들면, 세포로부터의 검출가능한 형광의 부재)일 수 있다. 일부 구체예에서, 세포 및/또는 세포 집단에 대한 검출가능한 신호는 형광 신호이다.

[0055] 본 발명의 장치 및/또는 시스템은 검출기(예를 들면, 카메라) 및/또는 여기 소스(excitation source)(예를 들면, 여기 광원(excitation light source))를 포함할 수 있다. 검출기는 세포 및/또는 세포 집단으로부터 검출가능한 신호를 검출하고 및/또는 이미징할 수 있다. 여기 소스가 검출가능한 신호를 생성하기 위해 이용될 수 있고 및/또는 검출가능한 신호를 생성할 수 있고, 예를 들면, 검출가능한 화합물이 형광을 내도록 광(light)을 제공 및/또는 생성하고, 그에 의해 검출가능한 신호를 제공 및/또는 생성하기 위해 사용될 수 있다.

[0056] 일부 구체예에서, 본 발명의 장치(예를 들면, 미세유체 장치(microfluidic device))의 적어도 일부는 투명하다. 예를 들면, 일부 구체예에서, 상기 장치의 상부 및/또는 하부 기판(top and/or bottom substrate)이 투명할 수 있고 및/또는 상기 장치에 존재하는 히드로겔이 투명할 수 있다. 상기 검출기는 상기 장치와 작동가능하게 결합된(operatively associated with) 검출기(예를 들면, 카메라)를 포함할 수 있다. 상기 검출기는 상기 장치의 하나 이상의 챔버와 작동가능하게 결합될 수 있다. 일부 구체예에서, 상기 검출기는 상기 장치의 위 및/또는 아래에 제공되고, 여기 소스는 상기 장치의 위 및/또는 아래에 제공될 수 있다. 일부 구체예에서, 상기 장치는 여기 소스(예를 들면, 광(light), 예를 들면, 카메라의 플래쉬(flash) 및/또는 LED)를 포함한다. 상기 검출기는 상기 장치의 하나 이상의 챔버에서 세포를 검출(예를 들면, 이미징)하도록 구성될 수 있다. 일부 구체예에서, 상기 장치는 상기 장치의 하나 이상의 챔버와 접촉하고 있는 표지된 세포의 이미지가 실시간으로 이미징 및/또는 정량화될 수 있도록 배치된 검출기(예를 들면, LED/CCD 검출기)를 포함할 수 있다. 일부 구체예에서, 검출기는 소정의(predetermined) 간격으로 이미지(예를 들면, 형광 이미지)를 획득할 수 있고, 및/또는 하나 이상의 챔버에 존재하는 오가노이드에서 및/또는 그로부터 유래된 표지된 세포의 집락형성(colonization), 이동, 및/또는 성장의 이미지 및/또는 발생률(incidence)을 획득할 수 있고, 이는 오가노이드 중 세포 및/또는 그들의 성장, 전이, 및/또는 그 등가물의 실시간 관찰 및/또는 정량화를 가능하게 할 수 있다.

[0057] 본 발명의 구체예에 따라, 1종 이상의 면역 세포를 포함하는 오가노이드(면역 오가노이드(immunology organoid)로도 지칭됨)가 제공된다. 상기 1종 이상의 면역 세포는 개체에서 림프절, 골수, 및/또는 말초 혈액(예를 들면, 림프절 생체시료, 골수 생검물, 및/또는 말초혈액 채혈)으로부터 수집 및/또는 유래될 수 있다. 일부 구체예에서, 상기 1종 이상의 면역 세포는 여포성 수지상 림프 세포, 섬유모세포성 망상 림프 세포(fibroblastic reticular lymph cell), 백혈구, 말초 혈액 단핵 세포, B 세포, T 세포, 골수 세포 (예를 들면, (수지상 세포 및 포식세포를 포함한) 골수 기원 세포(any myeloid in origin)), 및/또는 림프구 기원 세포(lymphoid in origin cell)로부터 선택된다. 일부 구체예에서, 1종 이상의 면역 세포를 포함하는 오가노이드는 백혈구를 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 1종 이상의 면역 세포는 검출가능한 화합물(예를 들면, 형광 화합물)을 포함한다.

[0058] 일부 구체예에서, 1종 이상의 면역 세포를 포함하는 오가노이드는, 선택적으로 특정한 개체/환자에 대한, 인 비트로 모델 면역계로 기능한다. 이는 면역요법 약물(예를 들면, PD-1 및 CTLA-4 억제제, IL-2, 인터페론)과 같은, 면역계에 영향을 미치고 및/또는 조절할 수 있는 약물의 스크리닝을 가능하게 하고, 이들은 면역 세포가 종양 세포를 공격할 수 있게 한다. 일부 구체예에서, 본 발명의 면역 오가노이드는 선택적으로 조직 염증으로의 호밍(homing)에서, 호중구 집단을 추적하고, 유전적 분석을 검증하고, 및/또는 개체/환자를 위해 치료법을 선택하고 및/또는 최적화하기 위해 사용될 수 있다.

[0059] 본 발명의 오가노이드는 림프절 (예를 들면, 개체의 림프절로부터의 세포), 골수, 및/또는 (예를 들면, 개체로부터, 선택적으로 림프절 세포와 동일한 개체로부터) 백혈구 및/또는 이들의 성분으로부터의 세포를 포함할 수 있다. 일부 구체예에서, 본 발명의 오가노이드는, 선택적으로 종양 절제의 시점에 제거된, 절제된 림프절의 조각으로부터의 세포, (예를 들면, 말초 혈액으로부터 수득된) 백혈구, 및/또는 골수 생검으로부터 수득된 세포를 포함하고, 모든 세포는 동일한 개체로부터 수득 및/또는 유래된다. 개체는 종양 및/또는 암을 가질 수 있고, 및/또는 면역요법이 상기 개체에 대한 치료 옵션일 수 있다. 예를 들면, **도 12**에 도시된 바와 같이, 종양 세포는 개체의 종양으로부터 수득될 수 있고, 및/또는 면역 세포는 개체로부터의 림프절로부터 수득될 수 있고, 종양 세포 및 면역 세포가 조합되고 및/또는 히드로겔(예를 들면, 젤라틴, 콜라겐, 히알루론산, 부착 단백질(예를 들면, 피브로넥틴, 라미닌, 등) 및/또는 성장 인자를 포함하는 원래의 ECM 히드로겔)에서 캡슐화되어 면역 강화 환자 종양 오가노이드(immune enhanced patient tumor organoid)를 형성할 수 있다. 본 발명의 또 다른 예가 **도 13**에 예시되고, 이는 종양 세포가 환자로부터의 임상적 종양 생검물로부터 수득될 수 있고, 면역 세포가 환

자로부터의 림프절 및/또는 백혈구 분획(WBCF)으로부터 수득될 수 있다는 것을 보여준다. **도 13**에 도시된 바와 같이, 환자로부터 유래된 이러한 종양 세포의 일부가 림프절 또는 WBCF 샘플로부터의 면역 세포를 포함하지 않는 종양 오가노이드를 형성하기 위해 사용될 수 있고, 환자로부터 유래된 종양 세포의 또 다른 부분은 림프절 또는 WBCF 샘플로부터의 면역 세포와 조합되어, 면역 강화 종양 오가노이드를 형성할 수 있다. 일부 구체예에 따르면, 본 발명의 방법은 그러한 오가노이드를 별도로 하나 또는 그 이상의 테스트 화합물(예를 들면, 화학요법제 및/또는 면역요법제)에 노출시키고 및/또는 접촉시키는 단계 및 상기 오가노이드의 세포가 수득된 환자를 치료하기 위해 사용될 수 있는 적합한 테스트 화합물(예를 들면, 약물, 예를 들면, 면역 관문 억제제(ICI))을 결정하고 및/또는 식별하는 단계를 포함한다(**도 13**).

[0060] 일부 구체예에서, 본 발명의 오가노이드는 각각 그 종류에 대해 개체의 림프절, 골수, 및/또는 혈액 중의 양과 거의 동일한 양으로 오가노이드에 존재하는, 1종 이상의 살아있는 면역 세포를 포함할 수 있다. 예를 들면, T 세포는 개체의 림프절에 인 비보에서 존재하는 T 세포의 양과 거의 동일한 양으로 본 발명의 오가노이드에 존재할 수 있다. 일부 구체예에서, 2종 이상의 상이한 종류의 살아있는 면역 세포가 본 발명의 오가노이드에 인 비보에서, 예를 들면, 개체의 림프절, 골수, 및/또는 혈액 중 각각의 면역 세포의 비율 또는 양과 유사한 비율 또는 양으로 존재한다. 일부 구체예에서, 1종 이상의 살아있는 면역 세포는 본 발명의 오가노이드에 약 1,500개, 2,000개, 또는 5,000개 내지 약 10,000개, 25,000개, 또는 50,000개의 세포 또는 약 1,000개, 5,000개, 10,000개, 또는 50,000개 내지 약 75,000개, 100,000개, 150,000개, 250,000개, 500,000개, 750,000개, 1,000,000개, 50,000,000개, 또는 100,000,000개의 세포의 양으로 존재할 수 있다. 일부 구체예에서, 본 발명의 오가노이드는 mL당 약 1백만, 2백만, 또는 5백만개 내지 약 10백만, 50백만, 또는 1억개의 세포의 양으로 1종 이상의 살아있는 면역 세포를 포함할 수 있다.

[0061] 본 발명의 오가노이드 (예를 들면, 면역 오가노이드)는 종양 오가노이드(예를 들면, 선택적으로 림프절 및/또는 백혈구와 동일한 개체로부터 유래된 종양 세포를 포함하는 오가노이드)를 포함하는 장치(예를 들면, 미세유체 장치)에서 사용될 수 있다. 상기 장치는 개체에서 종양을 표적화하고 및/또는 상기 장치(예를 들면, 면역 오가노이드) 중 면역 세포가 종양 세포를 공격할 수 있게 하기 위한 하나 이상의 면역요법제(예를 들면, PD-1 및/또는 CTLA-4 억제제)의 유효성을 스크리닝하기 위해 사용될 수 있다. 면역 세포 및/또는 종양 세포는 T-세포 활성화 마커 및/또는 종양 세포의 세포 사망 지표(indicator)를 갖는 면역 세포를 추적 및/또는 공동화(colocalize)시키기 위해 형광으로 표지될 수 있다. 일부 구체예에서, 종양 세포 생존력(tumor cell viability) 대 세포 사멸(cell death)이 본 발명의 장치에서 평가될 수 있다. 일부 구체예에서, 환자(예를 들면, 그로부터 하나 이상의 세포가 수득된 개체)가 치료(예를 들면, 면역요법 약물)를 받는 경우, 본 발명의 장치 및/또는 오가노이드에 의한 인 비트로 반응이 실제 환자 결과에 비교되거나 또는 예측할 수 있다. 일부 구체예에서, 본 발명의 방법은 인 비트로 결과를 인 비보 결과와 상관시키고 및/또는 예측하는 것을 포함할 수 있다.

[0062] 일부 구체예에서, 본 발명의 오가노이드는 1종 이상의 본 명세서에 기재된 면역 세포 및 살아있는 종양 세포를 포함한다. 살아있는 종양 세포는 개체의 종양으로부터 수집 및/또는 유래될 수 있다. 일부 구체예에서, 상기 1종 이상의 면역 세포 및 살아있는 종양 세포는 동일한 개체로부터 수집 및/또는 유래될 수 있다. 상기 살아있는 종양 세포와 상기 1종 이상의 면역 세포는 오가노이드에 적절한 비율로 존재할 수 있다. 일부 구체예에서, 상기 살아있는 종양 세포와 상기 1종 이상의 면역 세포는 오가노이드에 약 1:1 또는 5:1 내지 약 10:1, 20:1, 30:1, 40:1, 50:1, 60:1, 70:1, 80:1, 90:1, 또는 100:1 (종양 세포:면역 세포)의 비율로 존재할 수 있다. 일부 구체예에서, 백혈구 세포 및/또는 종양 침윤 림프구(TIL)만이 면역 세포로 존재하는 경우, 상기 비율은 약 10:1 내지 약 100:1일 수 있다. 일부 구체예에서, 상기 종양 세포 대 면역 세포의 비율은 약 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 또는 10:1일 수 있다. 일부 구체예에서, 상기 살아있는 종양 세포와 상기 1종 이상의 면역 세포는 오가노이드에 약 5:1, 10:1, 50:1, 또는 100:1의 비율로 존재할 수 있다. 일부 구체예에서, 동일한 개체로부터의 종양 세포 및/또는 면역 세포를 포함하는 오가노이드 및/또는 장치를 제공하는 것에 의해, 상기 오가노이드 및/또는 장치는 표준 화학요법제 및/또는 면역요법제가 상기 개체에 대해 더 효과적일 수 있는지 여부를 평가하기 위해 이용될 수 있다. 동일한 개체로부터의 면역 세포 및 종양 세포를 포함하는 오가노이드 및/또는 장치를 제공하는 것은 유전적으로 일치되는(genetically matched) 면역계에 인 비트로 종양 모델 (예를 들면, 종양 오가노이드)을 제공할 수 있고, 이는 인 비트로에서 하나 이상의 면역요법제 및/또는 화학요법제를 테스트하고 및/또는 스크리닝하기 위해 이용될 수 있다.

[0063] 일부 구체예에서, 본 발명의 오가노이드는 양성 세포를 포함한다. 예를 들면, 본 발명의 오가노이드는 1종 이상의 본 명세서에 기재된 면역 세포 및/또는 본 명세서에 기재된 살아있는 종양 세포를 포함할 수 있고, 양성 세포(예를 들면, 혈관 내피 세포, 기질 세포, 등)를 더 포함할 수 있다. 일부 구체예에서, 본 발명의 오가노이드

는 본 명세서에 기재된 바와 같은 1종 이상의 면역 세포 및 양성 세포 (예를 들면, 혈관 내피 세포, 기질 세포, 등)를 포함할 수 있다. 상기 양성 세포는 상기 1종 이상의 면역 세포 및/또는 살아있는 종양 세포가 수득 및/또는 유래된 개체와 동일한 개체로부터 수집 및/또는 유래될 수 있다. 오가노이드 중 세포(예를 들면, 종양 세포, 면역계 세포, 및/또는 양성 세포)는 임의의 적절한 방식으로 오가노이드에서 배열될 수 있다. 일부 구체예에서, 세포(예를 들면, 종양 세포, 면역계 세포, 및/또는 양성 세포)는 함께 조합 및/또는 혼합되고 오가노이드 중에 무작위로 분포될 수 있다. 일부 구체예에서, 본 발명의 오가노이드는 살아있는 종양 세포 및/또는 살아있는 면역계 세포의 코어, 및 1종 이상의 면역계 세포 및/또는 살아있는 양성 세포를 포함하는 쉘을 포함한다. 일부 구체예에서, 양성 세포(예를 들면, 내피 세포 및/또는 기질 세포)가 본 발명의 오가노이드 주위에 적어도 부분적으로 존재할 수 있고, 상기 오가노이드는 선택적으로 종양 세포 및/또는 면역 세포를 포함한다. 일부 구체예에서, 내피층(endothelial layer) 및/또는 장벽이 본 발명의 오가노이드의 주위에 적어도 부분적으로 또는 완전히 존재할 수 있다. 본 발명의 오가노이드 (예를 들면, 종양 오가노이드 또는 혼합 오가노이드) 위에 및/또는 주위에 존재할 수 있는 세포들은 인 비보에서 종양 주위에 존재할 수 있는 세포들을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 본 발명의 오가노이드 (예를 들면, 종양 오가노이드 또는 혼합 오가노이드)의 위에 및/또는 주위에 존재할 수 있는 세포의 예는 상피 세포, 기질 세포, 섬유모세포, 성상 세포(stellate cell), 성상교 세포, 신경교 세포, 등을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 일부 구체예에서, 본 발명의 오가노이드는 오가노이드에 존재하는 총 세포 수의 약 1%, 5%, 10%, 25%, 50% 내지 약 55%, 60%, 75%, 80%, 90%, 95%, 또는 100%의 양으로 면역계 세포를 포함한다. 일부 구체예에서, 본 발명의 오가노이드는 오가노이드에 존재하는 총 세포 수의 약 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 양으로 면역계 세포를 포함한다. 본 발명의 오가노이드가 오가노이드에 존재하는 총 세포 수의 100% 미만의 양으로 면역계 세포를 포함하는 경우, 임의의 적절한 양의 종양 세포 및/또는 양성 세포가 세포의 나머지 개수 및/또는 비율을 구성할 수 있다.

[0064] 본 발명의 오가노이드는, 선택적으로 치료법 및/또는 치료의 개시 전에, 환자의 치료를 결정하기 위해 사용될 수 있는 환자-특이적 인 비트로 모델 시스템을 제공할 수 있다. 일부 구체예에서, 목적 화합물은, 선택적으로, 유전적 바이오마커 평가 및/또는 유전적 프로파일링과 같은, 그러나 이에 한정되지 않는 추가적인 스크리닝 방법 외에, 면역학적 활성, 면역계의 조절, 및/또는 항-종양 활성에 대해 스크리닝될 수 있다. 일부 구체예에서, 본 발명의 오가노이드, 장치, 및/또는 방법은 예를 들면, 환자에서 치료 목적을 위해 사용될 수 있는 면역원성 바이러스의 효능 테스트를 포함한, 세포 바이오마커 인식, 바이오마커 발현 정량화, 및/또는 실시간 면역요법 및/또는 화학요법 약물 효능 테스트를 가능하게 하고 및/또는 허용할 수 있다.

[0065] 본 발명의 오가노이드는 종양 돌연변이를 식별하는 것을 촉진하고 및/또는 돌연변이와 개체를 위해 이용가능한 약물을 상관시키기 위해 이용될 수 있다. 일부 구체예에서, 본 발명의 방법은 본 발명의 오가노이드에 의해 달성된 결과물에 의해 치료법을 확인한다(identify).

[0066] 일부 구체예에서, 본 발명의 장치 및/또는 방법은 환자-유래 종양 오가노이드를 면역계로부터의 성분들(예를 들면, 종양 세포를 수득한 환자의 림프절 생체시료로부터 유래된 세포)과 통합시킬 수 있다. 이러한 오가노이드, 장치, 및/또는 방법은 개별적인 환자에 대해 인 비트로에서 면역요법제의 약물 효능을 평가하는 정밀 의료-중심 약물 연구(precision medicine-driven drug studies)에서 사용될 수 있다(예를 들면, 작용가능한 돌연변이 및/또는 유전적 프로파일, 및 후속적인 치료법 맞춤화(customization)를 발견하기 위해 사용될 수 있다). 일부 구체예에서, 종양 오가노이드 및/또는 혼합 종양/면역 오가노이드 (예를 들면, 혼합 종양/림프절 공생성 오가노이드)를 신선한 종양으로부터 직접적으로 제조할 수 있고, 이러한 종양 오가노이드는 종양 미세환경을 모사(replicate)할 수 있고, 세포 바이오마커 인식, 바이오마커 발현 정량, 및/또는 면역요법 및/또는 화학요법 약물 효능의 실시간 테스트를 가능하게 할 수 있다. 본 발명의 오가노이드는 미세유체 장치 내에 제공되고 및/또는 수용될 수 있고, 이는 복수 개의 약물의 병렬 스크리닝을 제공하고 및/또는 가능하게 할 수 있고, 및/또는 복수 개의 조직 및/또는 종양과 유체 소통을 제공할 수 있다. 일부 구체예에서, 본 발명의 오가노이드 및/또는 장치는, 선택적으로 환자로의 투여 전에, 개별적인 환자에 대해 유전적 스크린(genetic screen)을 보완할 수 있고 및/또는 악성(malignancy)의 정도 및/또는 최적의 치료법을 예측하기 위해 이용될 수 있다. 다양한 농도에서 다양한 테스트 화합물로 약물 스크린을 수행할 수 있고, 결과는 약 1주 미만 내에(예를 들면, 약물 스크린에서 사용되는 오가노이드를 제조하기 위해 사용되는, 환자로부터의 세포를 수득한 후 1주 미만 내에) 수득될 수 있다. 대조적으로, 일반적인 유전자 시퀀싱은 평균적으로 3-4주 동안 실행가능한(actionable) 데이터 세트를 결과로 도출하지 않는다.

[0067] 본 발명의 장치는 면역 오가노이드 (예를 들면, 1종 이상의 면역 세포를 포함하는 오가노이드) 및 별개의 종양

오가노이드를 포함할 수 있다. 일부 구체예에서, 본 발명의 장치는 종양 세포 및 1종 이상의 면역 세포를 모두 포함하는 오가노이드를 포함한다. 본 발명의 장치 중 종양 세포를 포함하는 오가노이드는 면역 세포와 동일한 개체로부터의 종양 세포를 포함할 수 있고, 선택적으로, 혈관 내피 세포 및/또는 기질 세포와 같은, 그러나 이에 한정되지 않는 다른 세포 집단들을 포함할 수 있다. 종양 세포를 포함하는 오가노이드 외에 다른 세포 집단을 포함하는 것은 종양 이질성 및/또는 클론 형성능(clonality)을 보존하는 것에 기여할 수 있고, 이는 더 현실적으로 종양을 재현할 수 있다.

[0068] 일부 구체예에서, 면역 오가노이드는 별개의 종양 오가노이드로부터 상류에 있을 수 있거나(upstream from), 또는 그와 유체 소통관계에 있을 수 있고, 유체 (예를 들면, 미세유체) 순환을 통해 종양 세포로의 T-세포 호밍(homing)을 평가하기 위해 이용될 수 있다. 면역 요법 하에 반응을 개시할 수 있는 인 비보 종양-침윤 림프구(TIL)가 존재할 수 있으나, 이들이 모든 종양에서 활성인 것은 아니다. 따라서, 종종, 면역요법 하에 일차 면역 반응(primary immune response)은 순환을 통해 림프절로부터 온다. 일부 구체예에서, 본 발명의 장치는 면역 세포가 상류 면역 오가노이드로부터 상기 장치 중 종양 오가노이드로 호밍하는 능력을 평가하고 및/또는 T-세포 활성화 및/또는 종양 사멸을 평가하기 위해 사용될 수 있다. 일부 구체예에서, 백혈구 세포가 상기 장치 내로 주입될 수 있으며, 선택적으로, 림프절 조직 및/또는 림프절 세포의 개수가 불충분할 때 주입될 수 있다.

[0069] 환자-특이적 생검물-유래 종양 오가노이드를 면역 세포(예를 들면, 림프절 세포)와 짝지워 주는 장치 및/또는 동일한 환자로부터의 그러한 세포를 포함하는 오가노이드를 제공하는 것에 의해, 예를 들면, 유전적으로 일치된 인간 면역계를 종양 오가노이드 내로 제공할 수 있다. 이 장치는 면역요법제를 스크리닝하기 위해 이용될 수 있고, 환자별(patient-by-patient)로 수행될 수 있다. 일부 구체예에서, 본 발명의 장치 및/또는 방법은 예를 들면, 복수 개의 샘플이 테스트될 수 있기 때문에, 오류 및/또는 위양성(false positives) 및/또는 위음성의 가능성을 낮출 수 있다.

[0070] 일부 구체예에서, 본 발명의 방법은 체외에서(ex vivo) 면역 세포를 활성화시키는 단계를 포함할 수 있고, 상기 방법은: 면역 세포(예를 들면, 림프구)를 복수 개의 살아있는 종양 세포를 포함하는 살아있는 종양 세포 오가노이드와 접촉시켜 활성화 면역 세포를 제공하는 단계; 살아있는 종양 세포 오가노이드로부터 상기 활성화 면역 세포를 단리하여, 단리된 활성화 면역 세포를 제공하는 단계; 및 상기 단리된 활성화 면역 세포를 증식시켜 활성화 면역 세포의 집단을 제공하는 단계를 포함한다. 임의의 종류의 면역 세포, 예를 들면, 본 명세서에 기재된 면역 세포를 살아있는 종양 세포 오가노이드와 접촉시킬 수 있다. 일부 구체예에서, 면역 세포는 비계대(unpassaged) 세포 (예를 들면, 환자로부터 수득된 비계대 세포)일 수 있고 및/또는 살아있는 종양 세포 오가노이드를 형성하기 위해 사용된 종양 세포는 비계대 세포(예를 들면, 환자로부터 수득된 비계대 세포)일 수 있다. 일부 구체예에서, 면역 세포 및/또는 종양 세포는 0, 1, 2, 3, 또는 4회 또는 그 이상 계대될 수 있다. 일부 구체예에서, 면역 세포는 말초 혈액 단핵 세포를 포함한다. 따라서, 일부 구체예에서, 본 명세서에 기재된 종양 오가노이드 및 환자 자신의 림프구가 암을 치료하기 위해 사용될 수 있다. 예를 들면, 흑색종 환자의 경우, 상기 방법은 환자의 림프구를 환자 자신의 흑색종 세포로 제조되고 및/또는 형성된 종양 오가노이드 또는 그의 생성물과 접촉시키는 단계, 체외에서 환자의 림프구를 약물의 존재 또는 부재 하에 활성화시키는 단계, 그 후 활성화 림프구를 수집하는 단계, 그들의 집단을 확장하는 단계, 및 그들을 환자에게 투여하는 단계를 포함할 수 있다. 체외에서 면역 세포를 활성화하는 방법의 하나 이상의 단계가 1회 이상(예를 들면, 수회, 또는 오가노이드 중 세포가 살아있는 한) 반복될 수 있다. 일부 구체예에서, 상기 방법은 새로운 종양 재발로부터의 세포로 환자를 위해 수행될 수 있다.

[0071] 일부 구체예에서, 활성화 면역 세포는 적응 면역을 갖는 면역 세포(예를 들면, 적응 면역을 갖는 T 세포) 및/또는 환자 자신의 종양 항원으로의 체외 노출(ex vivo exposure)로부터 수득된 면역 메모리(immunologic memory)를 갖는 면역 세포 (예를 들면, 면역 메모리를 갖는 T 세포) 일 수 있다. 일부 구체예에서, 프라이밍 및/또는 활성화 면역 세포는 약물로의 노출에 반응하여 프라이밍되고 및/또는 활성화될 수 있다.

[0072] 일부 구체예에서, 체외에서 면역 세포를 활성화시키는 방법은 환자의 림프구(예를 들면, T 세포)를 포함하는 환자의 채혈로부터의 백혈구 세포 분획을 이용하고, 상기 환자의 림프구를 환자 자신의 종양 세포 오가노이드 또는 그들의 분비된 산물(secreted product)과 접촉시키고, 이는 림프구를 체외에서 약물의 존재 또는 부재 하에 활성화시킬 것이고, 그 후, 활성화 림프구(예를 들면, T 세포)를 수집하는 것을 포함할 수 있다. 일부 구체예에서, 환자의 림프구를 환자 자신의 종양 세포 오가노이드 또는 그들의 분비된 산물과 접촉시키는 것은 하나 이상의 약물의 존재 하에 수행될 수 있고, 이는 림프구의 활성화 가능성(activation potential)을 증가시킬 수 있다. 활성화 림프구는 다시 환자에게 주입될 수 있고 선택적으로 주입 전에, 인 비트로에서 확장될 수 있다. 체외에서 면역 세포를 활성화시키는 방법은 환자의 외부에서 T 세포의 활성화를 제공할 수 있고 및/또는 환자를

불필요한 약물 독성으로부터 보호할 수 있다. 일부 구체예에서, 체외에서 면역 세포를 활성화하는 방법은 종양 세포 및/또는 종양 오가노이드에 인접하여 국소화된 세포들보다 더 많은 세포들을 활성화할 수 있다.

[0073] **도 11**을 참조하면, 본 발명의 장치는 오가노이드(예를 들면, 종양 오가노이드)를 포함하는 하나 이상의 챔버 각각과 데이지-사슬 방식으로 연결될 수 있는 하나 이상의 평행 채널에 의해 연결될 수 있는 하나 이상의 챔버를 포함할 수 있고(**도 11a**), 이는 순환 경로 당 오가노이드의 개수(예를 들면, 환자 종양 오가노이드(PTOs) 개수)를 증가시킬 수 있다. 일부 구체예에서, 동일한 챔버에 2개 또는 그 이상의 오가노이드가 존재하고 및/또는 패터닝될 수 있다(**도 11b**). 일부 구체예에서, 하나 이상의 T 세포가 본 발명의 장치 및/또는 방법에서, 예를 들면, **도 11c**에 도시된 바와 같이 주입되고 및/또는 순환될 수 있고, 이는 종양 항원 인식에 반응하여 T 세포의 프라이밍 및/또는 활성화를 유도할 수 있다. 순환 T 세포는 일정 시간 후에 상기 장치로부터 제거되고 및/또는 옮겨질 수 있다. 일부 구체예에서, 제거된 순환 T 세포를, 예를 들면, 활성화 수준 및/또는 종양 사멸을 테스트하기 위해, 미노출 일치(unexposed matched) 환자 종양 오가노이드(예를 들면, 비-면역 강화 종양 오가노이드(non-immune enhanced tumor organoids))에 접촉시킬 수 있다. 일부 구체예에서, 프라이밍 및/또는 활성화 T 세포를 개체/환자에게 투여할 수 있다.

[0074] 일부 구체예에서, 본 발명의 방법 및/또는 장치는 2개 이상(예를 들면, 2, 3, 4, 5, 6, 7개 또는 그 이상)의 목적 화합물의 동시 스크리닝(parallel screening)을 제공하고 및/또는 가능하게 할 수 있다. 일부 구체예에서, 상기 2개 이상의 목적 화합물 중 하나 이상은 면역요법 약물이다.

[0075] 일부 구체예에서, 본 발명의 방법 및/또는 장치는, 그의 세포들이 상기 방법 및/또는 장치에서 사용된 본 발명의 오가노이드를 제조하기 위해 사용된 것인 개체로부터의 생검물(예를 들면, 림프절 및/또는 종양 생검물)이 수득된 후 약 1 또는 2주 내에 (예를 들면, 약 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10일 내에) 결과(예를 들면, 약물 스크리닝 결과 및/또는 치료 분석)를 제공하고 및/또는 가능하게 할 수 있다. 일부 구체예에서, 본 발명의 방법은 개체로부터 생검물(예를 들면, 림프절 및/또는 종양 생검물)이 수득된 후 약 1주, 2주, 또는 3주 내에 (예를 들면, 약 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 또는 14일 이내에), 선택적으로 상기 생검물로부터의 세포에 의해 수득된 결과(예를 들면, 약물 스크리닝 결과 및/또는 치료 분석)에 반응하여, 개체를, 선택적으로 목적 화합물로, 치료하는 단계를 포함한다.

[0076] 또한, (a) 챔버, 및 상기 챔버와 유체 소통되는 채널을 갖는 미세유체 장치; (b) 상기 챔버 중 하나 이상의 오가노이드 (예를 들면, 면역 세포 및/또는 종양 세포를 포함하는 오가노이드); (c) 상기 챔버 및 상기 채널 중 성장 배지; (d) 상기 챔버 및 채널과 작동가능하게 결합되고(operatively associated with) 상기 배지를 상기 챔버로부터 상기 채널을 통해 다시 상기 챔버로 순환시키도록 구성된 펌프; 및 (e) 상기 채널에 존재하고 상기 배지가 관통하여(therethrough) 흐르도록 배치된 미세다공성 막(microporous membrane) (예를 들면, TRANSWELL ® 미세다공성 막) 을 포함하는, 인 비트로에서 면역 세포 및/또는 종양 세포를 평가하는데 유용한 장치가 본 명세서에 기재된다. 본 발명의 장치는 순환 흐름(circulating flow) 및/또는 간헐적 흐름(intermittent flow) 하에, 선택적으로 약 1, 2, 또는 5 ㎕/분 내지 약 7, 10, 15, 20, 25, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 또는 500 ㎕/분의 유속인 유동 하에 유지될 수 있다. 일부 구체예에서, 간헐적 흐름은 오가노이드 내부에서 간질성 흐름(interstitial flow)을 줄이기 위해, 선택적으로, 세포에 대해 오가노이드로 및/또는 오가노이드로부터의 이동이 조사되고 및/또는 결정되는 경우, 이용될 수 있다. 일부 구체예에서, 간헐적 흐름이 인 비보에서 약물 투여(예를 들면, 주입)을 촉진하기 위해 이용될 수 있다. 일부 구체예에서, 상기 장치는 생화학적 분석 및 칩상에서의 직접적인 이미징(direct imaging on a chip)과 같은, 그러나 이에 한정되지 않는 분석적 검사를 위해 구성되고 및/또는 그에 적합하다. 일부 구체예에 따르면, 세포(예를 들면, 면역 세포)가 본 발명의 장치 내로, 선택적으로 약 1, 2, 또는 5 ㎕/분 내지 약 7, 10, 15, 20, 25, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 또는 500 ㎕/분의 유속으로 주입될 수 있다. 일부 구체예에서, 본 발명의 장치의 유속 및/또는 세포의 주입 속도는 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20 mL/분일 수 있다.

[0077] 일부 구체예에서, 상기 장치는 인 비트로에서 면역학적 활성 및/또는 면역계 및/또는 그의 활성의 조절 활성에 대해 목적 화합물을 스크리닝하기에 유용하다. 일부 구체예에서, 상기 장치는 인 비트로에서 종양 세포의 전이를 평가하고, 인 비트로에서 종양 세포 이동 및/또는 침윤을 평가하고, 인 비트로에서 종양 세포를 포함하는 구조체의 성장을 평가하고, 및/또는 목적 화합물의 반응을 평가하기에 유용하다. 일부 구체예에서, 상기 장치는 인 비트로에서 구조체 크기, 인 비트로에서 종양 세포의 개수, 및/또는 인 비트로에서 종양 세포 사멸을 평가하기 위해 유용할 수 있다.

[0078] 일부 구체예에서, 본 발명의 방법은 하나 이상의 종양 오가노이드 반응 (예를 들면, 종양 세포 생존력, 세포 개수, 크기(volume), 아폽토시스, 등), 하나 이상의 면역 세포 활성, (면역형광 바이오마커에 의해 평가될 수 있는) 하나 이상의 마커의 활성화 또는 고갈 및/또는 하나 이상의 T 세포 활성화 마커 및/또는 T 세포 기능부전(dysfuction) 마커의 존재를 결정할 수 있다. 일부 구체예에서, 본 발명의 방법은, 선택적으로 살아있는 세포 추적을 통해, 림프절 세포 이동을 결정하는 것을 포함할 수 있다. 테스트 화합물의 효능은: 세포의 생존력(LIVE/DEAD), 생존 세포의 개수, 생존 세포 대 죽은 세포의 개수, 미토콘트드리아 대사(MTS), LDH 정량(종양 세포에서 양성임), 및/또는 IHC (예를 들면, Annexin V vs. KI67 -아폽토시스 vs. 증식성 마커)에 의해 결정될 수 있다.

[0079] 일부 구체예에서, 본 발명의 방법은 조작된 면역 세포, 예를 들면, CAR T 세포에 의해 부여된 효능 및/또는 종양 사멸률을 인 비트로에서 모니터링하기 위해 이용될 수 있고, 및/또는 선택적으로 효능 및/또는 질병의 크기(volume)에 근거하여 환자에 대해 합병증을 예방하기 위해, 조작된 면역 세포(예를 들면, CAR T 세포)의 적절한 용량 및/또는 주입 속도를 계산하기 위해 이용될 수 있다.

[0080] 본 발명의 일부 구체예에 따라, 인 비트로에서 면역학적 활성 및/또는 면역계의 조절에 대해 목적 화합물을 스크리닝하는 방법으로서, 상기 방법은: 복수 개의 세포를 포함하는 하나 이상의 오가노이드 (예를 들면, 선택적으로, 상기 하나 이상의 오가노이드는 간 오가노이드, 심장 오가노이드, 종양 오가노이드, 면역 오가노이드, 혼합 오가노이드 등임)를 제공하는 단계; 인 비트로에서 상기 목적 화합물을 상기 하나 이상의 오가노이드와 접촉시키는 단계; 및, 인 비트로에서 상기 목적 화합물을 상기 하나 이상의 오가노이드에 접촉시키는 것에 반응하여, (예를 들면, 상기 목적 화합물과의 접촉 전에 및/또는 그의 부재 하에 상기 오가노이드의 면역학적 반응/활성에 비교하여) 상기 하나 이상의 오가노이드의 면역학적 반응을 결정하는 단계를 포함하는 것인 방법이 제공된다. 일부 구체예에서, 상기 하나 이상의 오가노이드는 종양 오가노이드 및 면역 세포를 포함하는, 별개의 오가노이드이다. 일부 구체예에서, 상기 하나 이상의 오가노이드는 종양 세포 및 면역 세포를 포함하는 오가노이드이다. 일부 구체예에서, 상기 하나 이상의 오가노이드는 혼합 오가노이드(예를 들면, 혼합 공생성 오가노이드(mixed symbiotic organoid))이다.

[0081] 일부 구체예에서, 본 발명의 방법은 상기 하나 이상의 오가노이드를 배양 배지와 접촉시키는 것을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 배양 배지는 1종 이상의 면역 세포, 선택적으로 백혈구 세포를 포함하고, 상기 1종 이상의 면역 세포는 상기 하나 이상의 오가노이드 중 세포와 동일한 출처로부터 유래될 수 있다. 일부 구체예에서, 상기 배양 배지는 목적 화합물을 포함한다.

[0082] 본 발명의 방법은, 선택적으로 살아있는 세포 추적을 이용하여, 세포 이동을 결정하는 것(예를 들면, 1종 이상의 면역 세포이 이동을 결정하는 것) 것을 포함할 수 있다. 일부 구체예에서, 본 발명의 방법은, 선택적으로 면역형광을 이용하여, 세포(예를 들면, 오가노이드에 존재하는 세포들 및/또는 이동하는 세포들) 상의 활성화 및/또는 고갈 마커의 존재를 결정하는 것을 포함한다. 일부 구체예에서, 본 발명의 방법은 인 비트로에서 목적 화합물을 상기 하나 이상의 오가노이드에 접촉시키는 것에 반응하여, 상기 목적 화합물은 1종 이상의 세포 (예를 들면, 면역 세포)의 면역학적 활성을 활성화시키고 및/또는 증가시키는 것을 포함한다. 일부 구체예에서, 본 발명의 방법은 인 비트로에서 목적 화합물을 상기 하나 이상의 오가노이드에 접촉시키는 것에 반응하여, 하나 이상의 오가노이드에 존재하는 세포 (예를 들면, 종양 세포)의 성장의 감소 (예를 들면, 세포의 증식의 부재, 세포의 사멸, 세포의 침윤의 감소, 등)가 있는 것을 포함한다. 상기 하나 이상의 오가노이드가 종양 세포를 포함하는 경우, 본 발명의 방법은 인 비트로에서 목적 화합물을 하나 이상의 오가노이드에 접촉시키는 것에 반응하여, 하나 이상의 오가노이드에 존재하는 종양 세포의 증식의 감소(예를 들면, 세포의 증식의 부재, 세포의 사멸, 세포의 침윤의 감소, 등)를 결정하는 것을 포함할 수 있다. 일부 구체예에서, 살아있는 종양 세포의 증식의 감소를 결정하는 것은 상기 하나 이상의 오가노이드 중 생존(viable) 종양 세포의 개수를 결정하는 것, 상기 하나 이상의 오가노이드 중 살아있는 종양 세포의 개수를 결정하는 것, 상기 하나 이상의 오가노이드의 부피를 결정하는 것 및/또는 상기 하나 이상의 오가노이드에 존재하는 죽은 종양 세포의 개수를 결정하는 것을 포함한다.

[0083] 일부 구체예에서, 본 발명의 방법은 개체에게 투여할 목적 화합물의 용량 및/또는 주입 속도를 계산하는 것을 포함한다. 일부 구체예에서, 본 발명의 방법은, 인 비트로에서 목적 화합물을 하나 이상의 오가노이드와 접촉시키는 것에 반응하여, 선택적으로 상기 목적 화합물이 인 비트로에서 종양 세포의 전이를 감소시키고, 인 비트로에서 오가노이드 크기를 감소시키고, 인 비트로에서 종양 세포의 개수를 감소시키고, 인 비트로에서 종양 세포 사멸을 유도하고, 인 비트로에서 면역 세포의 활성을 증가시키고, 및/또는 인 비트로에서 면역 세포를 활성화시키는 것으로 결정되는 경우, 개체에게 치료-유효량(treatment-effective amount)으로 목적 화합물을 투여하는

것을 포함한다.

[0084] 일부 구체예에서, 인 비트로에서 종양 세포 및/또는 면역 세포를 평가하기에 유용한 장치는, 각 챔버에 하나 이상의 오가노이드를 갖고, 상호 간에 유체 소통되는 것인 하나 이상(예를 들면, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개, 또는 그 이상)의 챔버를 포함한다. 상기 장치는 면역학적 활성, 면역계 및/또는 그의 활성의 조절, 인 비트로에서 종양 세포의 전이, 인 비트로에서 종양 세포 이동 및/또는 침윤의 평가, 인 비트로에서 종양 세포를 포함하는 구조체의 성장의 평가, 및/또는 목적 화합물에 대한 반응의 평가를 위해 유용할 수 있다. 일부 구체예에서, 상기 장치는 인 비트로에서 구조체 크기, 인 비트로에서 종양 세포의 개수 및/또는 인 비트로에서 종양 세포 사멸의 평가를 위해 유용할 수 있다. 상기 장치에 존재하는 하나 이상의 오가노이드는 단일 개체로부터 수득된 세포로부터 제조될 수 있다. 일부 구체예에서, 상기 장치는 제1 챔버에 살아있는 종양 세포 오가노이드 및 제2 챔버에 면역 세포를 포함하는 오가노이드를 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 장치는 선택적으로, 예를 들면, **도 2**에 도시된 바와 같이, 상호 간에 분리된, 살아있는 종양 세포 오가노이드 및 면역 세포를 포함하는 오가노이드를 동일한 챔버에 포함한다. 일부 구체예에서, 2개 이상의 오가노이드가 동일한 챔버에 제공되는 경우, 오가노이드 및/또는 오가노이드들의 세포는 상기 챔버의 하나 이상(예를 들면, 2개, 3개, 4개, 5개, 또는 그 이상)의 영역(zone) 및/또는 구역(area)에 존재할 수 있다. 일부 구체예에서, 예를 들면, **도 4a-4c**에 도시된 바와 같이, 챔버는 2개 이상의 영역 및/또는 구역을 포함하고 하나의 오가노이드(예를 들면, 면역 세포 오가노이드)의 세포는 제1 영역 및/또는 구역에 존재할 수 있고 제2 오가노이드(예를 들면, 종양 세포 오가노이드)의 세포는 제2 영역 및/또는 구역에 존재할 수 있다. 동일한 챔버에, 그러나, 선택적으로 상호 간에 인접한, 다른 영역 및/또는 구역에 상이한 세포 및/또는 오가노이드를 갖는 것은 오가노이드를 통한 세포의 이동을 제공 및/또는 강제할 수 있으나, 순환을 통한 세포의 이동을 제공 및/또는 강제할 수 없다. 살아있는 종양 세포 오가노이드와 간 오가노이드가 동일한 개체로부터 수득된 세포들로부터 형성될 수 있고, 이는 맞춤형 분석(personalized analysis)을 제공할 수 있다.

[0085] 일부 구체예에서, 상기 장치는: 살아있는 종양 세포 오가노이드를 포함하는 일차 챔버(primary chamber); 상이한 오가노이드를 포함하는, 하나 이상의 이차 챔버; 상기 일차 챔버와 이차 챔버를 연결하고 그들 간에 유체 소통(예를 들면, 성장 배지의 흐름)을 제공하는 하나 이상의 일차 도관(primary conduit); 및 선택적으로, 상기 일차 챔버, 이차 챔버, 및 일차 도관 중 성장 배지를 포함할 수 있다. 일부 구체예에서, 2개 이상(예를 들면, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개 또는 그 이상)의 이차 챔버가 제공되고, 각각의 이차 챔버는 또 다른 챔버와 상이한 세포를 포함하는 오가노이드를 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 하나 이상의 이차 챔버는 간 오가노이드를 포함하고, 선택적으로 상기 살아있는 종양 세포 오가노이드 및 간 오가노이드는 동일한 개체로부터 수득된 세포로부터 제조된다. 장치의 추가적인 예는 각각이 참조에 의해 그 전체로 본 명세서에 포함된, PCT/US2016/054611 및 PCT/US2017/045277에 기재된 것들을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[0086] 일부 구체예에서, 장치(예를 들면, 미세유체 장치)의 적어도 일부분은 투명하고, 상기 장치는 미세다공성 막과 작동가능하게 결합되고 상기 미세다공성 막 위에 있는 세포 (예를 들면, 종양 및/또는 면역 세포)를 검출(예를 들면, 이미징)하도록 구성된 검출기(예를 들면, 카메라)를 포함할 수 있다.

[0087] 장치 본체(device body) 자체는 임의의 적절한 물질 또는 물질의 조합으로 형성될 수 있다. 예는 폴리디메틸실록산 (PDMS), 폴리스티렌, 폴리메틸 메타크릴레이트 (PMMA), 폴리아크릴아미드, 관능화(functionalized) PEG (예를 들면, PEG 디아크릴레이트, PEG 디아크릴아미드, PEG 디메타크릴레이트, 등, 또는 다중-암 형태(multi-arm form)인 전술된 PEG, 등)을 포함한 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 가교 또는 경화될 수 있는 천연 폴리머 또는 단백질 (예를 들면, 가교를 지원하는 화학 작용기에 의해 관능화된 그의 유도체, 가교된 형태 중 전술된 "가교-가능한 프리폴리머(cross-linkable prepolymer)", 및 그의 조합을 포함한, 히알루론산, 젤라틴, 콘드로이틴 술페이트, 알기네이트, 등)을 포함하나, 그에 한정되지 않는다. 장치 본체는 몰딩(molding), 주조(casting), 적층 가공(additive manufacturing)(3D 프린팅), 리소그래피(lithography), 등, 및 이들의 조합을 포함한, 임의의 적절한 프로세스에 의해 형성될 수 있다.

[0088] 구조적 지지체(structural support)가 상기 장치에 포함되는 경우, 히드로겔과 같이, 구조적 지지체가 패터닝될 수 있다(예를 들면, 규칙적 또는 불규칙적 패턴, 예를 들면, 규칙적 또는 불규칙적 격자(lattice), 그리드(grid), 나선(spiral), 등)).

[0089] 일부 구체예에서, 본 발명의 방법에서 사용될 수 있는, 본 발명의 장치는 생리적 또는 초생리적(hyperphysiological) 유체 대 조직 부피비를 제공하도록 구성될 수 있다. 예를 들면, 상기 장치 중 하나 이상의 챔버는 약 2 ㎕ 내지 약 10 ㎕ 범위의 평균 부피를 가질 수 있다. 일부 구체예에서,상기 장치 중 하나 이상

의 챔버는 약 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10 ㎕의 평균 부피를 가질 수 있다. 일부 구체예에서, 본 발명의 장치 (예를 들면, 적어도 2개 또는 6개의 챔버를 포함하는 장치)는 약 100 ㎕ 미만, 예를 들면, 약 95, 90, 85, 80, 75, 70, 65, 60, 55, 50, 45, 40 ㎕ 또는 그 미만* 양으로 액체를 사용할 수 있고 및/또는 약 100 ㎕ 미만, 예를 들면, 약 95, 90, 85, 80, 75, 70, 65, 60, 55, 50, 45, 40 ㎕ 또는 그 미만의 부피를 가질 수 있다. 본 명세서에서 사용된, 장치의 부피는 상기 장치의 챔버 및 채널을 채우는 부피를 의미한다. 일부 구체예에서, 본 발명의 장치 (예를 들면, 적어도 2개 또는 6개의 챔버를 포함하는 장치)는 약 50 ㎕ 미만의 양으로 액체를 사용할 수 있고 및/또는 약 50 ㎕ 미만의 부피를 가질 수 있다. 일부 구체예에서, 상기 장치의 부피는 외부 유체 저장소(external fluid reservoir)와의 통합 및/또는 사용에 의해 증가될 수 있다. 외부 유체 저장소는 전체 시스템 부피를 증가시킬 수 있고 및/또는 상기 장치의 부피를 조절하는 것을 도울 수 있다.

[0090] 본 발명의 시스템, 장치, 및/또는 방법은 각각이 적어도 1, 2, 3, 4, 5주, 또는 그 이상 동안 생존가능한, 하나 이상(예를 들면, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8개, 또는 그 이상)의 상이한 조직 및/또는 오가노이드를 포함하고 및/또는 제공할 수 있다. 일부 구체예에서, 본 발명의 시스템, 장치, 및/또는 방법은 상호 간에 및 공통의 수성 성장 배지와 유체 소통되고, 각각 적어도 1, 2, 3, 4, 5주, 또는 그 이상 동안 생존가능한 하나 이상(예를 들면, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8개, 또는 그 이상)의 상이한 오가노이드를 포함하고 및/또는 제공한다. 따라서, 일부 구체예에서, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개 또는 그 이상의 상이한 오가노이드가 상호 간에 및 공통된 수성 성장 배지와 유체 소통되고, 각각은 적어도 1, 2, 3, 4, 5주, 또는 그 이상 동안 생존가능하다. 일부 구체예에서, 하나 이상의 오가노이드가 생존가능할 수 있고 1주, 2주, 3주, 4주, 5주차, 또는 그 이상에 구조체에 존재하는 평균 세포의 개수에 근거하여 적어도 약 75% 또는 그 이상(예를 들면, 약 80%, 85%, 90%, 95% 또는 그 이상)의 살아있는 세포를 포함할 수 있다. 조직 및/또는 오가노이드는 공통 세포 샘플(예를 들면, 개체로부터 수집된 피부 샘플과 같은 샘플)로부터 분화에 의해 생성될 수 있다. 하나 이상의 오가노이드는 상응하는 원래의(예를 들면, 인간) 조직에 존재하는 세포의 비율에 유사한 비율로 세포를 포함할 수 있다. 일부 구체예에서, 하나 이상의 오가노이드는 전이성 및/또는 악성 세포를 포함한다. 일부 구체예에서, 조직 및/또는 오가노이드의 기능 및/또는 특성이 결정되고 및/또는 측정되고 상응하는 원래의 조직의 기능 및/또는 특성에 비교될 수 있다(예를 들면, 뇌 오가노이드의 특성이 측정되고, 개체 중 뇌 조직의 동일한 특성에 비교될 수 있다). 일부 구체예에서, 조직 및/또는 오가노이드의 기능 및/또는 특성은 상응하는 원래의 조직의 기능 및/또는 특성과 유사할 수 있다.

[0091] 본 명세서에 기재된 바와 같이, 세포 및/또는 세포 샘플이 본 발명의 오가노이드를 형성하기 위해 본 발명의 방법에서 사용될 수 있다. 본 발명의 방법은 생존가능한 오가노이드를 제공할 수 있다. 일부 구체예에서, 본 발명의 방법은 적어도 50% 또는 그 이상, 예를 들면, 약 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 또는 그 이상의 수용률(take rate)을 달성할 수 있다. 예를 들면, 90% 수용률은 90%의 경우에 생존가능한 오가노이드 또는 복수 개의 오가노이드(예를 들면, 오가노이드 세트(organoid set))가 본 발명의 방법에 의해 달성되고 및/또는 제공된다는 것을 의미한다. 즉, 90% 수용률의 경우, 10개의 세포 샘플(예를 들면, 종양 세포 샘플) 중 9개가 본 발명의 방법에 따라 제조되는 경우, 생존가능한 오가노이드 또는 복수 개의 오가노이드를 생성한다. 오가노이드 또는 복수 개의 오가노이드가 본 발명의 또 다른 방법 및/또는 진단에서 사용될 수 있다. 일부 구체예에서, 세포 및/또는 세포 샘플은 종양, 예를 들면, 중피종 생체시료 및/또는 GI 종양 생체시료 및/또는 림프절 생검물로부터 유래될 수 있다.

[0092] 인 비트로에서 항-전이 활성 및/또는 항-종양 활성에 대해 목적 화합물을 스크리닝하는 방법은: 본 명세서에 기재된 종양 세포를 포함하는 하나 이상의 오가노이드를 포함하는 장치를 제공하고; 상기 장치에서 배지를 순환시키고; 종양 세포에 (예를 들면, 상기 배지에 상기 화합물을 첨가하는 것에 의해) 목적 화합물을 투여하며; 미세다공성 막 상에 포획된(captured) 종양 세포를 정량적으로 또는 정성적으로 검출하는 것에 의해 수행될 수 있고, (예를 들면, 유사한 조건 하에서 다른 종양 세포, 및/또는 유사한 조건 하에서 비-전이성 세포와 비교하여) 포획된 더 작은 개수의 종양 세포는 상기 목적 화합물의 더 높은 항-전이 활성 및/또는 항-종양 활성을 나타낸다. 일부 구체예에서, 1종 이상의 면역 세포가 상기 장치에(예를 들면, 배지에, 종양 세포를 포함하는 하나 이상의 오가노이드에, 및/또는 상기 장치의 챔버 중 오가노이드에) 존재할 수 있다.

[0093] 인 비트로에서 항-전이 활성 및/또는 항-종양 활성에 대해 목적 화합물을 스크리닝하는 방법은: 본 명세서에 기재된 장치(예를 들면, 살아있는 종양 세포 오가노이드를 포함하는 일차 챔버 및 하나 이상의 이차 챔버를 포함하는 장치)를 제공하고; 상기 장치에서 배지를 순환시키고; 종양 세포에 (예를 들면, 상기 배지에 상기 화합물을 첨가하는 것에 의해) 목적 화합물을 투여하며; 하나 이상의 이차 챔버에 존재하는 종양 세포를 정성적으로 또는 정량적으로 (예를 들면, 선택적으로 이차 챔버에 존재하는 오가노이드 위에서 및/또는 내에서) 검출하는 것에 의해 수행될 수 있고, (예를 들면, 유사한 조건 하에서 다른 종양 세포, 및/또는 유사한 조건 하에서 비-

전이성 세포와 비교하여) 하나 이상의 상기 제2 챔버에 존재하는 더 작은 개수의 종양 세포는 상기 목적 화합물의 더 높은 항-전이 활성 및/또는 항-종양 활성을 나타낸다. 일부 구체예에서, 1종 이상의 면역 세포가 상기 장치에(예를 들면, 배지에, 종양 세포를 포함하는 하나 이상의 오가노이드에, 및/또는 상기 장치의 챔버 중 오가노이드에) 존재할 수 있다.

[0094] 본 발명의 방법은 세포(예를 들면, 종양 세포 및/또는 면역 세포)를 검출가능한 화합물, 예를 들면, 형광 화합물 (예를 들면, 염료, 단백질, 등)과 같은, 그러나 이에 한정되지 않는 검출가능한 화합물로 표지하는 단계를 포함할 수 있다.

[0095] 본 발명의 전술된 양태 및 기타 양태가 하기 실시예에서 더 설명된다.

도면의 간단한 설명

[0096] **도 1a 내지 1c**는 동일한 환자로부터 수득된 일치하는(matched) 림프절로부터 유래된 면역 세포의 존재 또는 부재 하에 환자 종양 오가노이드에 대한 면역요법 효과를 보여준다. 도 1a는 배지 단독(대조군), 배지 + 펨브롤리주맙, 및 배지 + 니볼루맙에서 측정된 대장 종양 미토콘드리아 대사를 보여준다. 면역 세포가 적절한 약물(이 경우, 니볼루맙)과 함께 존재하는 경우에만 증가된 대사가 관찰되어, T-세포 활성화를 시사한다. 도 1b는 림프절 세포(node cell)의 존재 및 부재시 충수 종양 오가노이드의 LIVE/DEAD 이미징을 보여준다. 약물 부재시 미미한 차이가 관찰되었으나, PD-1 억제제 니볼루맙과 펨브롤리주맙은 면역 세포 (림프) 집단이 포함된 경우에만 효과적인 것으로 보인다. 도 1c는 관문 억제제 면역요법에 반응하지 않는 것으로 확인된 흑색종 환자("비-반응자(Non-Responder)")로부터 유래된 종양 오가노이드의 LIVE/DEAD 이미징을 보여준다. 환자 종양 오가노이드는 비-반응자 환자 표현형의 재현(recapitulation)을 보여준다. 다브라페닉(dabrafenic)/트라메티닙(trametinib)에 의한 대안적 치료(최우측 패널)는 증가된 DEAD 염색의 반응을 보였다.

도 2는 본 발명의 구체예에 따른 예시적 2-오가노이드 시스템(2-organoid system)을 보여준다.

도 3a 내지 3c는 본 발명의 구체예에 따른 미세유체 장치의 개략도(schematic illustration)이다. 도 3a는 미세유체 장치 층들의 개략적인 조립(assembling)을 보여준다. 도 3b는 인 시투 오가노이드 패터닝 기법(in situ organoid patterning technique)을 보여준다: 미세유체 챔버를 HA 히드로겔, 광개시제, 및 환자-유래 종양 세포를 포함하는 히드로겔 혼합물로 채우고, 포토마스크(photomask)를 통해 UV 광을 조사한다. 노출된 전구체가 히드로겔로 가교되어, 그 영역 내에 세포를 체류시키고, 깨끗한 PBS를 이용하여 비-가교 겔을 챔버로부터 관류시킨다(flush). 최종적으로, 인큐베이션을 위해 PBS를 DMEM으로 대체한다. 도 3c는 컴퓨터-제어 연동 펌프에 의해 촉진되는 각 오가노이드에 대한 저-용적, 폐쇄 루프 유체 회로(low-volume, closed loop fluidic circuit)를 포함하는(featuring) 전체 측정 셋-업의 개략도를 보여준다.

도 4a 내지 4c는 본 발명의 구체예에 따라 상호작용을 위해 세포들이 서로를 향해 이동하게 할 수 있는, 독립적이나, 인접한 영역에 제공된 종양 세포와 면역 세포를 포함하는 챔버의 개략도이다.

도 5는 흑색종 오가노이드 및 흑색종 및 림프절 오가노이드의 다양한 관문 억제제에 대한 반응을 보여주는 그래프이다.

도 6은 본 발명의 구체예에 따른 예시적인 프로세스 다이어그램(exemplary process diagram)을 보여준다.

도 7은 본 발명의 구체예에 따라 고형 조직으로부터 세포를 단리하는 예시적인 프로세스를 보여준다.

도 8은 본 발명의 구체예에 따라 오가노이드를 제조하는 예시적인 프로세스를 보여준다.

도 9는 본 발명의 구체예에 따라 배양 배지로의 첨가를 위해 백혈구 세포를 준비하는 예시적인 프로세스를 보여준다.

도 10은 본 발명의 구체예에 따른 약물 스크리닝 및 분석을 위한 예시적인 프로세스를 보여준다.

도 11a 내지 11d는 본 발명의 구체예에 따라 T 세포의 주입 및 그들의 활성화 상태의 프라이밍(priming)을 위해 이용될 수 있는 TOC(tumor-on-a-chip)의 개략도이다. **도 11a**는 기존의 TOC 시스템의 병렬 채널(parallel channels)이 서큘레이터 경로(circulator path) 당 환자 종양 오가노이드(PTO) 개수를 증가시키기 위해 함께 데이지 체인 방식으로 연결된다는(daisy chained) 것을 보여준다. **도 11b**는 다수의 PTO가 장치의 단일 챔버에 패터닝될 수 있다는 것을 보여주는 개략도이고, 이는 PTO 개수를 급격하게 증가시킬 수 있다. **도 11c**는 예를 들면, 종양 항원 인식에 반응하여 프라이밍/활성화를 유도하기 위해, T 세포 주입 및/또는 재순환 후에, 예를 들면, 활성화 수준 및/또는 종양 사멸(tumor killing)을 테스트하기 위해, 순환 T 세포를 제거하고 비노출 일치

(unexposed matched) PTO TOC로 이전시킬 수 있다는 것을 설명하는 예시적 개략도를 보여준다. 장치 채널 아키텍처의 비-한정적 예는 데이지-체인, 예를 들면, 하나의 더 큰 챔버를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 이러한 프라이밍된 및/또는 활성화된 T 세포가 환자에게 투여될 수 있다. **도 11d**는 예를 들면, 종양 항원 인식에 반응하여 프라이밍/활성화를 유도하기 위해, T 세포 주입 및/또는 재순환 후에, 예를 들면, 활성화 수준 및/또는 종양 사멸을 테스트하기 위해, 순환 T 세포를 제거하고 비노출 일치 PTO TOC로 이전시킬 수 있다는 것을 설명하는 또 다른 예시적 개략도를 보여준다. 이러한 프라이밍된 및/또는 활성화된 T 세포가 환자에게 투여될 수 있다.

도 11e는 **도 11d**에 예시된 프로세스의 상이한 단계에서 PTO의 LIVE/DEAD 염색(staining)을 보여준다. 치료 전(상단 이미지), 프라이밍 후(중간 이미지), 및 그들이 종양 세포 사멸을 유도하는, 이전에 접촉되지 않았던 PTO로의 전달 후(하단 이미지)의 염색이 표시된다.

도 12는 본 발명의 구체예에 따른 환자 종양 오가노이드로의 면역 성분의 결합(incoporation)을 보여주는 개략도이다.

도 13은 본 발명의 일부 구체예에 따른 환자 종양 오가노이드로의 면역 성분의 결합 및 맞춤 의약(personalized medicine)을 위한 사용 방법을 보여주는 개략도이다.

도 14a 내지 14c는 종양 오가노이드(즉, 종양 세포만을 포함하는 오가노이드) 및 종양/면역 오가노이드(즉, 종양 세포 및 림프절 세포를 포함하는 오가노이드)의 생존력을 보여주는 그래프이다. 오가노이드의 세트 각각은 1명의 흑색종 환자로부터 수득된 세포로 제조하고, **도 14a**, **14b**, 및 **14c**는 3명의 상이한 흑색종 환자 각각에 대한 개별화된 결과를 보여준다. 결과는 림프절 세포를 이용하여 면역 강화된, 종양 면역 오가노이드가 면역 관문 억제제 처리 하에 종양 세포 사멸을 보여줄 수 있고, 반면에, 면역 강화가 없는 종양 오가노이드는 반응하지 않는다는 것을 보여준다.

도 15a 및 **15b**는 종양 오가노이드(즉, 종양 세포만을 포함하는 오가노이드) 및 종양/면역 오가노이드(즉, 종양 세포 및 환자 혈액 채혈의 백혈구 세포 분획으로부터의 면역 세포를 포함하는 오가노이드)의 생존력을 보여주는 그래프이다. 오가노이드의 세트 각각은 1명의 흑색종 환자로부터 수득된 세포로 제조하고, **도 15a** 및 **15b**는 2명의 상이한 흑색종 환자 각각에 대한 개별화된 결과를 보여준다. 결과는 채혈의 백혈구 세포 분획으로부터의 세포를 이용하여 면역 강화된, 종양 면역 오가노이드가 면역 관문 억제제 처리 하에 종양 세포 사멸을 보여줄 수 있고, 반면에, 면역 강화가 없는 종양 오가노이드는 반응하지 않는다는 것을 보여준다.

도 16a 및 **16b**는 종양 오가노이드(즉, 종양 세포만을 포함하는 오가노이드) 및 종양/면역 오가노이드(즉, 종양 세포 및 환자 혈액 채혈의 백혈구 세포 분획으로부터의 면역 세포를 포함하는 오가노이드)의 생존력을 보여주는 그래프이다. **도 16a**의 오가노이드는 1명의 혈관 육종 환자로부터 수득된 세포로 제조되었다. **도 16b**의 오가노이드는 1명의 DFSP 환자로부터 수득된 세포로 제조되었다. 결과는 채혈의 백혈구 세포 분획으로부터의 세포를 이용하여 면역 강화된, 종양 면역 오가노이드가 면역 관문 억제제 처리 하에 종양 세포 사멸을 보여줄 수 있고, 반면에, 면역 강화가 없는 종양 오가노이드는 반응하지 않는다는 것을 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0097] **실시예**

[0098] **실시예 1 - 인 비트로에서 면역요법(IT) 약물 효능을 테스트하기 위한 신선한 환자-유래 폐 TOC 모델 내에서 림프절과 백혈구 세포 성분의 통합(integration) .**

[0099] *통합된 종양 및 림프절 오가노이드 생체제조(biofabrication):* 림프절 세포(node cells)과 백혈구 세포를 막-결합 염료(membrane-incorporating dye) (PKH26-레드 또는 PKH67-그린)를 통해 표지하고 종양 생체시료 세포들(tumor biospecimen cell)과 통합할 것이다. 생체제조 후에, 면역 세포 표면 마커로 염색하고 전술된 막 염료와의 공동화(co-localization)를 입증하는 것에 의해 면역 세포의 존재를 확인할 것이다. 대조군(control)은 종양 오가노이드만으로 구성될 것이다.

[0100] *PD-L1 및 CTLA-4 평가:* 조직 수집 후에, PD-L1 항체를 이용하여 각 종양 생검물의 일부에 또는 CTLA-4 항체를 이용하여 림프절 생검물에 면역조직화학 분석(IHC)을 수행할 것이다. 고-PD-L1 또는 CTLA-4 발현을 정의하는 확립된 5% 역치값(threshol value)을 이용하여, 각각을 고-발현 또는 저-발현으로 분류하여, IT 감수성(susceptibility)에 대해 각 생체시료별 가설을 생성할 수 있게 할 것이다.

[0101] *면역요법 약물 패널 컴파일링(immunotherapy drug panel compilation):* 오가노이드는 임의적으로(arbitrarily)

부피가 작게 제조될 수 있고, 그에 의해 약물 스크리닝(및 순열(permutation)) 및 바이오마커 확인을 위해 원하는 개수의 오가노이드를 생성할 수 있다. 펨브롤리주맙(pembro)은 PD-1 수용체를 표적으로 한다. 니볼루맙(nivo)은 PD-1 수용체를 표적으로 하고, 암이 *BRAF* 돌연변이를 갖지 않는 경우, 일반적으로 사용된다. 이필리무맙(ipi)은 CTLA-4를 표적화하는 것에 의해 면역계를 활성화시킨다.

[0102] *약물 스크린 결과 척도(drug screen output metrics):* 약물을 48시간 동안 투여하고, 그 후 하기와 같이 효능을 결정할 것이다: 구체적으로, 세포의 생존력을 (LIVE/DEAD), 생존 세포(viable cell)만의 개수, 생존 세포 대 죽은 세포의 개수(number of viable cells versus dead cells), 미토콘드리아 대사(MTS), LDH 정량 (종양 세포에서 양성), 및 IHC (아폽토시스, 증식, 및 종양 세포 마커와 형광 표지 면역 세포의 공동화(colocalization))에 의해 평가할 것이다. **도 1a**는 니볼루맙과의 인큐베이션 후, 아마도 T-세포 활성화를 통해 미토콘드리아 대사의 증가가 관찰된 통합된 대장 종양-림프절 오가노이드(integrated colorectal tumor-node organoids)의 데이터를 보여주고, 펨브로(pembro) 및 니보(nivo) 처리시 세포 사망의 증가가 관찰된, 유사한 저-등급 충수 종양-림프절 오가노이드에서의 LIVE/DEAD 염색(**도 1b**)을 보여준다. 이러한 결과는 바이오마커 분석을 이용하여 확증될 것이다. **도 1c**는 펨브롤리주맙 및 이필루미맙에 의해 이전에 치료되었으나 반응이 없었던 흑색종 환자("비-반응자")로부터 유래된 PTO로부터의 데이터를 보여준다. LIVE/DEAD 염색은 비-반응성 표현형의 재현을 보여주고, 이들 종양으로부터의 오가노이드도 이러한 면역 관문 억제제에 반응하지 않았으나, 다브라페닙 및 트라메티닙에는 반응했다(최우측 패널). 환자의 BRAF 야생형 상태를 고려할 때, 이는 예상되지 않았다. 돌이켜보면(retrospectively), 이 환자는 그의 BRAF 상태를 우회하는 하류 MEK 돌연변이를 가진 것으로 확인되었다. 대안적인 치료법은 MEK 돌연변이를 확인한 게놈 시퀀싱보다 4주 이상 전에 PTO 스크린에 의해 파악되어, 이 환자를 트라메티닙(trametinib)에 적합한 것으로 분류하였다. 환자는 MEK 억제제, 트라메티닙에 의한 치료를 개시하고, 거의 즉시 성공적으로 반응하기 시작했다.

[0103] **실시예 2 - 미세유체 순환(microfluidic circulation)을 통해 종양 세포로의 T-세포 호밍을 평가하기 위한, TOC(tumor-on-a-chip)으로부터 상류에 림프절 오가노이드의 구현.**

[0104] *2-오가노이드 생체제조:* 종양 오가노이드를 생성하고 (실시예 1과 유사한 방식으로, 그러나, 종양 세포와의 통합 없이) 별개의 림프절 오가노이드를 생성하며 미세유체 장치의 각 챔버에 배치할 것이다(**도 2**). 대안적으로, 림프절 오가노이드가 포함되지 않은 경우, 백혈구 세포를 순환을 통해 주입할 것이다. 대조군은 종양만으로 구성될 것이다.

[0105] *약물 스크린 결과 척도:* 약물 조건 및 결과는 실시예 1에 기재된 것과 유사할 것이다. 또한, 면역 세포 개수의 위치 확인이 수행될 것이다. 형광 태그(fluorescent tag)가 치료(처리)의 존재 하에 종양-연관 항원에 노출된 경우 면역 세포가 하류 종양으로 이동할 수 있는지 여부의 추적 및 확인을 가능하게 할 것이다(**도 2**). 특정한 이론에 한정되기를 원치 않으나, PD-1 억제와 같은 조건이 T 세포와 같은 면역 세포가 종양 세포를 인식하고, 종양으로 이동하고, 종양 세포 사망을 유도할 수 있게 할 수 있는 것으로 사료된다.

[0106] 각각의 개별적인 오가노이드 채널/챔버 내에 PTO가 생체제조된(biofabricated) 미세유체 장치 아키텍처가 **도 2**에 도시된 바와 같이 채택될 수 있다. 추가적으로, 이전에 병렬이었던 PTO 채널이 모든 PTO가 T 세포가 관류될 단일 통로를 차지하도록 데이지-사슬 형식으로 배열되어(daisy-chained)(**도 11a**), 순환 중 T 세포에 의한 종양 항원으로의 노출을 최대화할 것이다. TOC 당 PTO 개수는 하나의 더 큰 챔버에(**도 11b**) 또는 시스템 유체 부피(system fluid volume)을 줄이기 위해 복수 개의 병렬 채널에 더 많은 수의 PTO를 광패터닝(photopatterning)하는 것에 의해 유의성 있게 증가될 수 있다.

[0107] **실시예 3 - 신선한 환자-유래 TOC 모델로서 면역요법 약물 효능을 테스트하기 위한 림프절 면역계 성분의 도입**

[0108] 종양 절제 동안 제거된, 절제된 림프절의 조각으로부터 세포를 환자-특이적 TOC(tumor-on-a-chip) 오가노이드에 내포시켜, 종양을 표적으로 하는 면역요법제의 유효성(effectiveness)의 스크리닝을 촉진한다. 이 방법은 특정한 세포 집단을 규명(characterize)할 필요 없이 원래의 이질성을 재현한다. 조직 샘플로부터의 세포들(예를 들면, 종양 세포, 기질 세포, 내피 세포, 등)의 전체 혼합물을 사용하는 것에 의해, 그 시스템은 본질적으로 인비보 종양 이질성을 대표한다. 반응이 환자의 결과(output)에 비교될 것이다.

[0109] *생체시료 수득 및 처리:* 환자들은 주로 주요한 복부 내장 암(major abdominal visceral cancer) 절제를 위한 외과 수술을 통해 동의하고 등록(enroll)되거나, 또는 환자들은 진행 중인 면역요법에 대한 내성 질환의 국소 제어 목적으로 전이성 병변 및 림프절의 절제를 위한 고식적인 시술(palliative procedure)을 받을 것이다. 모든 환자가 두 성분(종양 및 림프절) 모두를 샘플링하는 것으로 요구되지는 않을 것이다. 샘플링은 임상적으로

표시된 절차의 일부에 불과할 것이다. 다시 말하면, 표시된 수술이 두 성분(종양 및 림프절)에 대한 접근을 제공하지 않는 경우, 샘플링은 접근가능하고 수술 부위 구조(operating field structure)에 존재하는 것으로부터만 수행될 것이다. 신선한 종양 생검물을 분쇄하고(minced), 세척하고, 분해시키고(digested), 여과시켜 세포 현탁액을 수득할 것이다. 모든 시료는 환자 신원에 대한 접근을 방지하도록 코딩될 것이다. 유전적 프로파일 데이터는 샘플에 익명으로 제공될 것이다.

[0110] *미세유체 장치 제조(fabrication):* 미세유체 장치의 프로토타입을 위한 리소그래피에 의해 정의된(lithographically-defined) 폴리디메틸실록산 엘라스토머의 통상적인 사용은 비싼 투명성 마스크(transparency mask), 장치 정의를 위한 포토리소그래피, 연속 캐스팅(serial casting), 및 정밀 막 정렬(precise layer alignment)에 대한 의존 때문에 수일이 소요될 수 있다. 이는 스케일 업 및 임상적 중개(clinical translation)에 과제(challenge)를 제시한다. 그러나, 이 방식은 뛰어난 해상도(extraordinary resolution)(~1 ㎛)를 위해서만 필요하다. 본 발명자들의 3D 시스템은 미세유체 구조를 형성하기 위해 폴딩(folding)을 통해 자가-정렬되고(self-aligned) 적층될(layered) 수 있는 단순하고, 얇은, 패터닝된 접착성 필름을 이용하여 제조될 것이다(**도 3a**). 챔버 및 채널의 정의는 컴퓨터-제어 레이저 컷터(computer-controlled laser cutter)를 통해 달성한다.이 플랫폼을 사용하여, 본 발명자들은 밸브(valve), 믹서(mixer), 및 기타 기능성 미세유체 시스템을 포함한 다수의 복합 장치들을 제조했다.

[0111] *오가노이드-장치 통합(Organoid-device integration):* 미세유체 시스템 내에서 3D 오가노이드를 통합하는 것의 과제를 해결하기 위해, 본 발명자들은 조직 공학 및 다양한 생체제조 기법에서 널리 사용되는, 젤라틴-기반 히드로겔, HyStem과 히알루론산(HA)을 이용하는 인 시투 생체제조(in situ biofabrication)을 위한 방법을 개발했다. 조직 구조체(tissue construct)를 제조하는 일반적인 방식에서, HA와 젤라틴/콜라겐 성분들을 조직 오가노이드, 및 티올-아크릴레이트/메타크릴레이트 광중합을 지원하기 위해 가교제 및 광개시제와 혼합한다. 각각의 세포 현탁액을 최종 통합된 구조체 중 오가노이드 부피의 비율을 인체의 기관의 부피비(예를 들면, 간 오가노이드의 매스(mass)는 심장 오가노이드의 매스의 5배이다)와 일치시키는 밀도로 겔 전구체에 첨가한다. 각각의 세포-충진된 기판(cell-laden substrate)을 순차적으로 미세유체 챔버에 도입하고 구조체의 형태 및 위치를 정의하기 위해 포지티브-톤 포토마스크(positive-tone photomask)를 이용하여 패터닝을 수행한다(**도 3b**). 가교 히드로겔은 챔버의 상부 및 하부 표면에 점착하여, 미세연동(microperistaltic) 펌프에 의해 구동되는 유체 흐름 조건에서 유지될 수 있게 하고, 이는 동시에 복수의 회로를 지지한다(**도 3c**). 이 패터닝은 임의의 개수의 독립적인 미세유체 챔버에서 수행될 수 있다. 결과적으로 수득된 3D 구조체는 뒤이어 장기적 생존력으로 순환하는 흐름 하에 유지될 수 있고, 전체 시스템은 생화학적 분석 및 직접적인 이미징 온-칩(imaging on-chip)을 포함한 분석적 검사를 수용할 수 있다(amenable). 추가적인 패터닝(예를 들면, 추가적인 세포 또는 오가노이드 종류(type)에 의한 패터닝)도 복수-성분 구조(multi-component structure)를 제조하기 위해 이용될 수 있어서, 상당한 시스템 복잡성을 가능하게 한다. 주목할 것은, 히드로겔 자체도 가용화된 세포외 매트릭스의 내포(incorporation)를 지지하고, 각각의 조직 오가노이드에 특이적인 생체분자 인자(biomolecular factor)를 공급한다. ECM 프로파일은 조직 종류 간에 상이하고, ECM 성분의 포함은 세포 생존력 및 기능을 향상시키고, ECM 성분들은 공유 결합 또는 헤파린-결합을 통해 히드로겔 내로 용이하게 연결된다. 특정한 매트릭스 단백질(예를 들면, 라미닌, 콜라겐 I, 콜라겐 IV) 및 사이토카인의 존재가 종양 성장 및 이동, 및 따라서 약물 유효성에 영향을 미칠 수 있으므로, TOC 장치 중 이러한 프로파일의 재생이 인 비보 시스템의 정확한 재현을 보장한다. 전체적으로, 이러한 제조 방식은 신속하고, 값싸며, 모듈 방식(modular)이므로, 다수의 병렬 실험을 위해 대량생산될 수 있는 명확한 가능성을 갖는다.

[0112] *분석 계획:*

[0113] *샘플 크기 및 검정력(Sample Size and Power)*: 일차 종말점(primary endpoint)은 종양 오가노이드 및 종양/림프절 오가노이드의 개발의 타당성(feasibility)이다. 본 연구는 20명의 환자를 등록시킬 것이고, 타당성은 오가노이드 개발의 성공률로 정의된다. 이 비율은 (성공적인 오가노이드 개발/20)의 비로 표현될 것이다. 이 비율은 상응하는 95% 신뢰 구간과 함께 보고될 것이다. 계획된 샘플 크기가 20이므로, 95% 신뢰 구간의 너비는 관찰된 성공률이 50%인 경우, 약 +/- 22.2%일 것이다.

[0114] *일차 결과물(Primary Outcome)의 분석:* 일차 결과물은 오가노이드 개발의 비율일 것이다; 이 비율은 오가노이드 개발의 성공을 나타낼 것이다.

[0115] *이차 결과물의 분석:* 이차 결과물은 오가노이드 화학민감성(chemosensitivity)과 화학요법제에 대한 개별적인 반응의 상관관계이다(3개의 그룹으로 분류됨: 안정한 질병(stable disease), 부분적 반응(partial response)

또는 무반응). 이러한 3개의 그룹 중 작은 샘플 크기를 고려하여, 3개의 반응 그룹에서 관찰된 화학민감성에 대한 차이를 평가하기 위해 Kruskal-Wallis 검정이 이용될 것이다.

[0116] *종양-림프절 오가노이드 생체제조:* 조직이 절제된 환자에 특이적인 TOC 모델을 생성하기 위해, 전술된 생체제조 방법을 이용할 것이다. 종양 생검-유래 세포 외에, 그 환자의 림프절로부터 단리된 세포들을 히드로겔 오가노이드 생체제조 과정에서 종양 생체시료-유래 세포와 조합할 것이다. 림프절 세포를 막-결합 **염료**(PKH26-레드 또는 PKH67-그린)를 통해 형광 표지하고, 하기 방법에서 사용할 것이다. 면역 세포의 종양 세포와의 인접성을 보장하기 위해, 본 발명자들은 종양 세포와 림프절 세포를 세포 개수 기준으로 5:1 비율로 함께 조합할 것으로 예상하나, 이 비율은 조정될 수 있다. 오가노이드 생체제조 후에, 면역 세포의 존재는 면역 세포 표면 마커에 대해 염색하고, 전술된 막 염료와의 공동화를 입증하는 것에 의해 확인될 것이다.

[0117] *면역요법 약물 패널 컴파일링:* 오가노이드는 임의로 작은 부피로 제조될 수 있고, 그에 의해 약물 스크린 및 바이오마커 확인을 위해 임의의 개수의 오가노이드를 생성할 수 있다. 인터페론은 기존 면역 세포가 암과 싸우는 것을 도와준다. 인터루킨-2는 암과 싸우도록 프라이밍된 면역 세포의 개수를 증가시키는 것을 도와준다. 펨브롤리주맙은 PD-1 수용체를 표적으로 한다. 니볼루맙은 또한 PD-1 수용체를 표적으로 하나, 암이 BRAF 돌연변이를 갖지 않는 경우, 일반적으로 사용된다. 이필리무맙은 CTLA-4를 표적화하는 것에 의해 면역계를 활성화하고, 니볼루맙/이필리무맙, 조합 요법, 베무라페닙/코비메티닙은 BRAF 돌연변이를 갖는 종양을 표적화한다.

[0118] *약물 스크린 결과 척도:* 약물 치료의 효능은 하기와 같이 결정될 것이다; 구체적으로, 세포의 생존력은 (LIVE/DEAD), 생존 세포 단독의 개수, 생존 세포의 개수 대 죽은 세포의 개수, 미토콘드리아 대사(MTS), LDH 정량화(종양 세포에서 양성임), 및 IHC (아폽토시스 대 증식 마커)에 의해 평가될 것이다. 또한, 면역 세포 개수 및 상태의 변화의 입증이 수행될 수 있다. 또한, 표지된 면역 세포와 종양 세포의 공동화를 이미징에 의해 평가할 수 있다.

[0119] *환자 반응에 대한 약물 효능 상관관계(correlation):* 약물 스크린 및 주어진 생체시료 오가노이드 세트에 대해 가장 효과적인 약물의 결정 후에, 이러한 데이터는 탈-식별 데이터(de-identified data)만을 이용하여, 전술된 바와 같이, 환자의 데이터와 상관될 것이다.

[0120] 통계 분석: 실험을 4개(quadruplicate) 또는 그 이상의 재현물로 수행할 것이다; 데이터는 평균 ± 평균의 표준 오차로 제시될 것이다. α = 0.05로 2-그룹 비교를 위해 스튜던트 t-검정(Students t-test)을 이용할 것이다. 다중 비교를 위해, 95%의 신뢰 한계(confidence limit)를 유의한 것으로 간주하는 일원 ANOVA(One-way ANOVA)를 이용할 것이다.

[0121] **실시예 4 - 환자-일치(patient-matched) 림프절 세포 집단의 환자 종양 생체시료 체외(ex vivo) TOC 오가노이드로의 도입**

[0122] *생체시료 획득 및 처리:* 환자들은 주로 주요한 복부 내장 암 절제를 위한 CRS/HIPEC 외과 수술, 또는 말단 종양 절제를 통해 동의하고 등록되고, 진행 중인 면역요법에 대한 내성 잔류 질환(resistant residual disease)의 국소 조절 목적을 위한 전이성 병변 및 림프절 절제를 위한 고식적 시술을 받는 단계 IV 흑색종 환자일 것이다. 샘플링은 임상적으로 표시된 절차의 일부에 불과할 것이다. 다시 말하면, 수술이 두 성분(종양 및 림프절)에 대한 접근을 제공하지 않는 경우, 환자는 이 연구들에 동의하지 않을 것이다. Advanced Tumor/Tissue Bank Project (BG04-104), IPHC Research Database (BG01-372), 및 이용가능한 경우, 정밀 의학 보고서(precision medicine reports) (유전자 돌연변이 분석)로부터의 조직 및 데이터가 또한 본 연구를 위해 이용될 것이다. 일반적으로, 본 발명자들의 예비 데이터와 정렬시켜서, 본 발명자들은 대장, 충수, 복막 중피종, 및 흑색종 조직을 수득할 것으로 예상한다. 모든 시료는 탈-식별된다(de-identified). 신선한 생검물을 분쇄하고, 세척하고, 분해하고, 여과시켜 세포 현탁액을 생성할 것이다. 림프절 세포의 일부는 추적을 위해 형광 표지될(QTracker 프로브) 것이다. 본 발명자들의 목표는 12개의 별개의 시료로부터의 오가노이드의 세트를 생성하는 것이다.

[0123] *미세유체 장치 제조:* 3D 시스템은 미세유체 구조를 형성하기 위해 폴딩을 통해 자가-정렬되고 적층될 수 있는 단순하고, 얇은, 패터닝된 접착성 필름을 이용하여 제조될 것이다(**도 3a**). 특징들(feature)의 정의는 컴퓨터-제어 레이저 컷터를 통해 달성한다.

[0124] *오가노이드-장치 통합:* HA와 젤라틴/콜라겐 성분들을 세포와 혼합하고, 인 시투 광중합을 위해 가교제 및 광개시제와 혼합한다. 세포들을 겔 전구체에, 바람직하게는 20백만개 세포/mL 또는 그보다 높은 밀도로 첨가하고, 그 후에 세포-겔 혼합물을 순차적으로 미세유체 챔버에 도입하고 구조체의 형태 및 위치를 정의하기 위해 포지티브-톤 포토마스크를 이용하여 패터닝을 수행한다(**도 3b**). 제안된 연구를 위해, 각 장치는 일련의 2 챔버 회로

(2 chamber circuits)를 포함할 것이고, 하나의 챔버에는 종양 오가노이드가 형성되고, 나머지 챔버에는 림프절 오가노이드가 형성될 것이다. 대안적으로, 2개의 오가노이드는 모두 분리되어, 그러나, 동일한 챔버에 존재할 수 있다(**도 2**). 또 다른 형태 인자에서, 종양 세포와 면역 세포가 인접한 영역으로서 장치 내에 광패터닝될 수 있고, 면역 세포가 종양 세포를 성공적으로 표적화도록 하기 위해, 이들은 종양 세포 항원을 인식하고, 활성화하고, 종양 영역으로 이동하게 된다(**도 4a-4c**). 결과적으로 수득되는 3D 구조체는 통상적으로 장기적 생존력으로 10 ㎕/분의 순환 흐름 하에 유지된다.

[0125] *오가노이드 특성 규명(characterization) 및 기준선(baseline) 세포 이동 연구:* 플랫폼 개시 후, TOC 장치를 1, 7, 및 14일 동안, 유동(flow) 하에 작동시킬 것이다. 이들 시점에, 오가노이드를 IHC 분석을 위해 고정할 것이다. 종양 오가노이드에 종양 종류에 따른 마커들의 패널(panel)을 적용할 것이다(본 발명자들은 예비 데이터에 기재된 종류들 각각으로부터의 오가노이드를 규명했다). 림프절 오가노이드(및 종양 오가니오드로 이동할 수 있었을 잠재적인 림프 세포)를 림프구/백혈구, TRegs, 이펙터 종류(effector type), 분화, 및 음성 피드백(negative feedback)을 확인하기 위해 CD8, CD4, CD45, CD25, FOXP3, l-selectin, CD44, CTLA4, PD1에 대한 항체를 이용하여 평가할 것이다. FACS를 이용할 수 있으나, IHC는 3D 오가노이드 내에서 시공 정보(spatiotemporal information)를 고려한다. 데이터는 초기 스크린을 위해 먼저 오가노이드 조직 절편에서 평가하나, 후기 시점에 3D로 전재 마크로-공초점 현미경(whole mount macro-confocal microscopy) (Leica LCS TSI)에 의해 평가할 것이다. 세포 이동을 라이브 형광(live fluorescence)을 이용하고, 표지된 림프절 세포의 이동을 추적하는 것에 의해 보다 미묘한(nuanced) 방식으로 평가할 것이다.

[0126] **림프절 세포 집단의 존재 및 부재시 면역요법제에 대한 환자-특이적 종양 오가노이드 반응의 평가**

[0127] *약물 패널 컴파일링:* 약물 스크린을 수행하고, 약물 농도는 임상적 혈장 수준(clinical plasma level)에 근거할 것이다. 종양+림프절(tumor+node) TOC와 병행하여, 종양-단독 TOC를 대조군으로 진행할 것이다. 스크리닝된 약물들은 하기와 같을 수 있다:

[0128] i) 펨브롤리주맙(Pembrolizumab), PD-1 수용체를 표적으로 함.

[0129] ii) 니볼루주맙(Nivolumab), PD-1 수용체를 표적으로 하나, 암이 *BRAF* 돌연변이를 갖지 않는 경우, 일반적으로 사용됨.

[0130] iii) 이필리무맙(Ipilimumab) (Ipi), CTLA-4를 표적으로 하는 것에 의해 면역계를 활성화시킴.

[0131] iv) 니볼루맙/이필리무맙, 조합 요법(combination therapy).

[0132] v) 베무라페닙/코비메티닙(Vemurafenib/Cobimetinib), *BRAF* 돌연변이를 갖는 종양을 표적으로 함.

[0133] vi) 이마티닙(Imatinib), 줄기 세포 마커인 *C-KIT*,의 활성화 돌연변이를 갖는 종양에 대한 항체.

[0134] vii) *인터페론* 및 *인터루킨-2*, 면역 활성화 촉진.

[0135] *림프절 세포 활성화 및 추적:* 면역 세포 집단의 활성화를 전술된 IHC 프레임워크의 서브셋트(subset)를 이용하여 평가할 것이다. 이동하는 형광 세포의 추적을 전술된 바와 같이 수행할 것이다. 환자 TOC의 각 세트에 대한 실험 간에 이동의 동력학(kinetics of migration)의 정량적 변화를 결정할 것이다.

[0136] *약물 스크린 결과 척도:* 약물 효능을 하기에 의해 결정할 것이다: 세포의 생존력(LIVE/DEAD), 생존 세포 단독의 개수, 생존 세포 대 죽은 세포의 개수, 미토콘드리아 대사(MTS), LDH 정량(종양 세포에서 양성임), 및 IHC (Annexin V vs. KI67-아폽토시스 마커(apoptotic) vs. 증식 마커(proliferative markers)).

[0137] **도 5**는 흑색종 종양 오가노이드 및 림프절 세포를 포함하는 흑색종 종양 오가노이드에 의한 약물 스크린에 대한 세포 생존력 데이터를 보여준다. 관문 억제제 니볼루맙(nivo) 또는 펨브롤리주맙(pembro)에 의한 약물 스크린에 대해, 오가노이드가 종양 세포 및 림프절로부터의 세포를 모두 포함한 경우에만 전체 대사 활성에 의해 측정된, 오가노이드 생존력의 상당한 감소가 관찰되었다.

[0138] **실시예 5 - 약물 스크리닝 및 질병 진행(disease progression) 분석을 위한 종양 및 관련 오가노이드의 생성**

[0139] 환자 종양 및 관련 조직으로부터 제조된, 생체제조된(biofabricated) 오가노이드가 인 비보 미세환경 및 면역계의 인 비트로 모사체(in vitro mimic)로 작용할 것이다. 그러한 모사체가 면역계 및 적절한 세포를 배양물에 통합시키는 것에 의해 면역요법제 및 표준 화학요법제를 포함하는 약물 스크린을 위해 사용될 수 있다. 이러한 구조체를 이용하여 질병 진행을 추가적으로 연구할 수 있어서, 개선된 치료에 대한 환자 특이적 종양 거동에 대한

더 높은 이해를 제공할 수 있다.

[0140] 본 실시예의 방법을 실시하는데 사용되는 프로세스가 **도 4-10**에 예시된다. 개방된 용기를 포함하는 모든 작업들은 Bio-Safety Cabinet (BSC)에서 수행되어야 한다. BSC 내로 전달되는 아이템들은 먼저 가벼운 분무를 통해 70% EtOH로 세정되어야 한다. BSC에서 과량의 EtOH는 절차들을 수행하기 전에 닦아내야 한다.

[0141] 인큐베이터 내에 또는 현미경 위에 배치하기 전에 세포 배양 용기를 70% EtOH로 닦아야 한다. 인큐베이터에 넣기 전에 과량의 EtOH는 닦아내야 한다. 세포를 담는 코니칼 튜브(conical tube)도 또한 원심분리기에 넣기 전에 70% EtOH로 닦거나, 분무할 것이다.

[0142] **시약 제조**

[0143] *DMEM-10*: 적절한 부피의 우태혈청(FBS)을 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium)에 넣어서 10% 용액을 생성한다. 추가적으로, 적절한 부피의 페니실린/스트렙토마이신 및 L-글루타민을 첨가하여 용액 중 각각 1%가 되게 한다. 조합된 배지를 적절한 크기의 배지 필터(500mL, 1000mL)를 통해 멸균 여과시킨다.

[0144] *분해 용액(Digestion Solution)*: 재구성된 콜라게나아제 HA 및 BP 프로테아제의 계산된 부피를 저 글루코오스 DMEM (VitaCyte)에 첨가한다. 분해 용액은 효소의 재구성 후 2시간 내에 사용되어야 한다.

[0145] **분해 배지 부피(Digestion Media volume):**

[0146] XX mg x 20 mL 분해 배지

[0147] 200 mg 조직

[0148] **배지로의 첨가:**

[0149] 6.6 ㎕/mL 콜라게나아제 HA x 제조될 배지의 부피 = 콜라게나아제 HA의 부피

[0150] ° 콜라게나아제 HA는 멸균 바이알에 담겨 있어야 하고, 20 mL의 차가운 diH_2O 중에 재구성되고, 1년 동안 보관 가능하다.

[0151] 6.4 ㎕/mL BP 프로테아제 x 제조될 배지의 부피 = BP 프로테아제의 부피

[0152] ° BP 프로테아제는 멸균 바이알에 담겨 있어야 하고, 2 mL의 차가운 diH_2O 중에 재구성되고, 2년 동안 보관 가능하다.

[0153]

[0154] *DPBS 세척 용액(Wash Solution)*: 10 mg/mL 겐타미신(Gentamicin)의 적절한 부피를 적절하게 표지된, 멸균 용기 중의 DPBS에 첨가하여 5 ㎍/mL 겐타마이신의 최종 농도를 달성한다. 적절한 혼합을 보장하기 위해 용액을 젓는다. DPBS 세척 용액은 제조 후 최장 17일까지 사용될 수 있다.

[0155] *항생제 세척 용액(Antibiotic Wash Solution)*: 아미카신(Amikacin) (20mg/mL 최종 농도), 암포테리신(Amphotericin) B (1㎍/mL 최종 농도), 겐타미신(Gentamicin) (5 ㎍/mL 최종 농도), 및 반코마이신(5mg/mL 최종 농도)의 적절한 부피를 적절하게 표지된, 멸균 용기 중의 DPBS에 첨가한다. 혼합을 보장하기 위해 용액을 휘젓는다. 항생제 세척 용액(Antibiotic Wash Solution)은 제조된 동일한 날에 사용된다.

[0156] *분해 중화 용액(Digestion Neutralization Solution)*: 고 글루코오스 DMEM과 우태혈청(FBS)을 조합하여 10% FBS의 최종 농도를 갖게 한다. 적절하게 멸균 여과하고 표지한다. 혼합을 보장하기 위해 용액을 휘젓는다.

[0157] *분해 중화 부피(Digestion Neutralization volume)*: 사용될 분해 중화 배지의 부피는 조직 생체시료를 분해하기 위해 사용된 분해 용액의 부피와 동일해야 한다.

[0158] *헤프라실(Heprasil)*: DiH_2O를 0.1% w/v Irgacure와 조합하는 것에 의해 UV 광개시제의 스톡 용액을 생성한다. 코니칼 튜브(conical)를 호일(tin foil)로 덮고, 진탕기 플레이트에 37℃에서 200 rpm으로 30분 동안 배치한다. 호일 캡을 Heprasil 바이알로부터 제거하고 1 mL의 스톡 UV 광개시제를 첨가한다. 바이알을 커버로 덮고, 37℃ 인큐베이터에 45분 동안 배치한다.

[0159] *메타크릴화 콜라겐-I(Methacrylated Collagen-I)*: 메타크릴화 콜라겐-I 병으로부터 호일 캡을 제거한다. 제조사에서 제공한 아세트산 16.8 mL를 상기 병에 넣어 6mg/mL 농도가 되게 한다. 상기 병을 4℃ 냉장고에서 보관하고

각 실험을 위해 적절한 부피를 꺼낸다.

[0160] **도구 및 비품 준비(tool and supply preparation)**

[0161] *PDMS 코팅 플레이트:* 중량을 이용하여, 엘라스토머 경화제(Elstomer Curing Agent)를 엘라스토머 기제(Elastomer Base)와 1:10의 비율로 합한다. 교반기를 이용하여 3-5분 동안 잘 섞는다. 교반기를 이용하여 PDMS의 박층(thin layer)을 48-웰 또는 24-웰 플레이트의 각 웰에 뿌린다(drizzle). 각 웰의 바닥을 완전히 뒤덮을 수 있도록 플레이트를 가볍게 흔든다. 플레이트를 20분 동안 진공에 배치한다. 진공으로부터 꺼내고 80℃에 최소 2시간 동안 배치한다. 배양물과 함께 사용하기 전에, 일단 경화되면, 플레이트를 BSC 내에 UV 광 하에 최소 20분 동안 배치한다.

[0162] *핀셋(tweezers):* 코니칼 튜브 중 조직에 사용하기 위해 핀셋을 최소 30분 동안 70% EtOH로 멸균하거나, 가압멸균(autoclave)한다.

[0163] *1.5mL 에펜도르프 튜브:* 튜브를 가압멸균 가능한 백(autoclave safe bag)에 넣고 밀봉하고, 백에 가압멸균 테이프를 배치한다. 가압멸균하고 조직 처리를 위해서만 사용한다.

[0164] **세포 처리(processing)**

[0165] *세포 단리*: 생검된 조직을 BSC로 옮기고, 준비된 항생제 세척 용액에서 각각 5분씩 3회 세척하고 뒤이어 준비된 멸균제 용액(Disinfectant Solution)에서 각각 5분씩 3회 세척한다. 조직을 세척하는 동안, 조직 분해 용액을 위한 분해 효소를 재구성한다. 세척 후에, 조직을 적절한 크기의 조직 배양 디쉬로 옮기고 외과용 메스(scalpel)를 이용하여 작은 조각들로 잘게 다진다. 잘게 다진 후에, 조직을 제조된 분해 용액으로 옮기고 온실(warm room)에서 200 rpm으로 설정된 진탕기 테이블에 15분 동안 배치한다. 분해 후에, 적절한 부피의 중화 용액(Neutralization Solution)을 분해된 조직에 첨가하고 피펫으로 부드럽게 섞는다. 림프절의 경우, 100 ㎛ 원심분리 삽입물(centrifuge inserts)을 사용하고 수동으로 세포를 분리한다. 세포 현탁액을 100 ㎛ SteriFlip 여과 유닛(filtration unit)에 넣고 진공에 의해 여과한다. 통과액(flow through)을 5분 동안 300xg에서 원심분리한다. 코니칼 튜브로부터 상층액을 제거하고 세포를 1mL의 DMEM-10에 재현탁시키고 계수한다.

[0166] *오가노이드의 제조*: 헤프라실을 재구성하고 콜라겐과 조합할 때까지 37℃ 인큐베이터에서 보관한다. 메타크릴화 콜라겐-I을 코니칼 튜브에 넣고 얼음 위에 유지하면서 1mL 메타크릴화 콜라겐-I 당 85㎕로 제조사의 중화 용액을 이용하여 중화시킨다. 헤프라실을 메타크릴화 콜라겐과 1:3의 비율로 조합하여 필요한 오가노이드의 개수에 대해 계산된 필요한 부피를 생성한다. 기포의 도입을 피하면서 혼합물을 합치고, 얼음 위에 45분 동안 방치한다. 45분 대기 동안, 각 조직 종류(종양, 림프절, 간)의 세포들을 계수하고 계산에 근거하여 1.5 mL 에펜도르프 튜브에 분량을 만든다. 종양 단독, 종양과 림프절, 및 간 단독 오가노이드가 제조되어야 한다. 종양 및 간 단독 오가노이드는 mL 당 천만개의 세포를 포함해야 하고, 각 오가노이드는 10 ㎕이다. 림프절 세포를 포함하는 종양은 mL 당 천만개의 종양 세포 및 mL 당 5백만개의 림프절 세포를 포함해야 한다. 분량을 담은 에펜도르프 튜브를 3분 동안 500xg로 원심분리해야 한다. 상층액을 튜브로부터 제거하고 각각에 적절한 부피의 헤프라실/메타크릴화 콜라겐-I을 첨가해야 한다. 세포를 재현탁시키고 피펫을 이용하여 웰 플레이트의 PDMS 코팅된 웰 각각에 넣는다. UV 광을 이용하여 각각 3초 동안 각각의 오가노이드를 가교시킨다. 각각의 48-웰 플레이트에 DMEM-10 배지를 0.5mL로, 또는 각각의 24-웰 플레이트에 1 mL로 첨가하고 인큐베이션한다.

[0167] *첨가용 백혈구 세포의 준비*: 혈액의 바이알은 처리될 수 있을 때까지 실온에서 유지해야 한다. 준비 전에, 가볍게 바이알을 뒤집어서 혈액을 혼합하여 분리되었던 혈액이 더 이상 분리되지 않게 한다. 15mL 코니칼을 사용하여, 3.5mL의 Ficoll-Paque PLUS를 첨가하고, 조심스럽게 혈액을 Ficoll 층의 상부에 적층시키고, 혈액과 Ficoll의 혼합을 피한다. 15mL 코니칼을 맞춤화(personalization) 설정을 가능하게 하는 대형 원심분리기에 넣는다. 설정은 하기와 같아야 한다: 개시 스피드(Start Speed) - 9, 브레이크 스피드(Break Speed) - 1, 온도 - 20℃, 시간 - 40분, 스피드 - 400xg. 원심분리가 완료되면, 분리된 층의 혼합이나 흔들림을 방지하면서 코니칼을 꺼낸다. 피펫을 이용하여, 분리의 완전한 제2층을 제거하고 새로운 15 mL 코니칼에 넣는다. 3mL의 DMEM-10을 그 코니칼에 넣고 5분 동안 400xg에서 원심분리한다. 상층액을 제거하고 세포를 1 mL의 DMEM-10을 이용하여 재현탁시키고, 세포를 계수한다. 웰당 25,000개의 세포를 받을 수 있도록 하기 위해 필요한 웰의 개수를 계산한다.

[0168]

[0169] **약물 스크리닝 및 분석**

[0170] *실험 계획 및 백혈구(WBC)를 포함하는 웰의 결정*: 종양과 림프절 세포 및 종양 단독 세포로 얼마나 많은 오가노이드가 제조될 수 있는지를 결정한다. 이러한 오가노이드 종류 각각에 대해, 5로 나누어 얼마나 많은 약물 조건이 수행될 수 있는지를 결정한다.

[0171] *면역요법 약물 선택*: 림프절 또는 WBC가 배양액에 존재하는 경우, 조건당 n=5개 웰에 면역요법제가 투여되어야 한다. 용량과 시간 의존성은 용량 의존성에 우선순위를 두고 고려되어야 한다. 면역요법의 이전 치료가 투여된 경우, 그 약물 치료 및 하나 이상의 다른 면역요법제를 사용한다. 림프절의 존재 및 부재와 WBC의 존재 및 부재로 투여한다. MTS 분석을 위해 n=3개 웰 및 조직학을 위해 n=2개 웰을 사용한다. 시간 의존성을 연구하지 않는 경우, 4일 동안 배지 변화 없이 투여한다.

[0172] *표준 화학요법 약물 선택*: 종양 단독 오가노이드에서, 암 기원(cancer origin) 및 환자의 이전 치료에 근거하여 표준 화학요법 치료를 선택한다. 용량과 시간 의존성은 용량 의존성에 우선순위를 두고 고려되어야 한다. 화학요법의 이전 치료가 투여된 경우, 그 약물 치료 및 하나 이상의 다른 화학요법제를 사용한다. MTS 분석을 위해 n=3개 웰 및 조직학을 위해 n=2개 웰을 사용한다. 시간 의존성을 연구하지 않는 경우, 4일 동안 배지 변화 없이 투여한다.

[0173] *MTS 분석법*: 제조사에 의해 제공된 바와 같이 용액 제조를 위해 MTS 분석 설명서를 따르고, 희석을 위해 FBS 불포함 고 글루코오스 DMEM을 사용한다. 각 웰로부터 배지를 제거하고 200㎕ MTS 분석 희석 용액으로 대체하고, 이를 3개의 비어있는, 세포 불포함 웰에 수행하여 대조군 웰로 작용하게 한다. 플레이트를 다시 인큐베이터에 2시간 동안 배치한다. 각 웰로부터 100 ㎕의 용액을 제거하고, 깨끗한 96 웰 편평 바닥 플레이트(96 well flat bottom plate)에 넣는다. 플레이트 판독기를 사용하여 490 nm에서 웰의 흡광도를 판독한다.

[0174] *파라핀 처리 및 절편화(Paraffin Processing and Sectioning)*: 오가노이드를 파라핀 처리하고 슬라이드당 4개의 절편으로 5㎛ 두께 층으로 절단한다.

[0175] *H&E 및 IHC 절편 염색*: 오가노이드의 세포충실성(cellularity)을 보장하기 위해 각 조건의 하나의 슬라이드에서 H&E를 수행해야 한다. 세포충실성이 명확한 경우, 추가적으로 IHC가 수행되어야 한다. IHC의 선택은 암세포 종류 및 림프절 또는 혈액도 배양에서 사용되었는지 여부에 근거하여 결정되어야 한다.

[0176] **실시예 6 - 면역 세포 활성화 및 종양 세포 사멸 분석을 위한 PTO의 용도.**

[0177] *종양 생체시료 처리.* 흑색종 생체시료는 본 프로젝트의 두 연구자가 구성원인 IRB 프로토콜에 따라 수득하고, 본 제안서에 기재된 데이터를 생성했다. 각각의 신선한 생체시료를 클리닉/수술실에서 단리하고, 멸균 코니칼 중 RPMI 배지에 배치하고, 즉시 처리를 위해 랩으로 전달할 것이다. 생체시료를 분쇄하고, 세척하고, 콜라게나아제/히알루로니다아제와 인큐베이션하여 ECM의 주요한 구조적 요소들을 분해시킬 것이다. 일부는 조직학적 분석(histology)을 위해 보존할 것이다. 히알루론산, 젤라틴, 및 PEG 가교제를 포함한 히드로겔에서 오가노이드를 형성할 것이다.

[0178] *TOC PTO 어레이(array) 설계.* 먼저, **도 3**에 도시된 바와 같은 각각의 개별적인 오가노이드 채널/챔버 내에 생체조직된 PTO를 갖는 동일한 미세유체 장치 아키텍쳐를 채택할 것이다. 모든 PTO가 T 세포가 관류될 단일 통로를 차지하도록 PTO 채널을 데이지-사슬 형식으로 배열하여(**도 11a**), 순환 중 T 세포에 의한 종양 항원으로의 노출을 최대화할 것이다. 그러나, 활성화 또는 세포 사멸이 거의 관찰되지 않는 경우, 본 발명자들은 하나의 더 큰 챔버에(**도 11b**) 또는 시스템 유체 부피를 줄이기 위해 복수 개의 병렬 채널에 더 많은 수의 PTO를 광패터닝하는 것에 의해TOC 당 PTO 개수를 유의성 있게 증가시킬 것이다.

[0179] *배양 후 조직학적 분석(Post culture histological analysis).* 7일차에, 각 구조체를 LIVE/DEAD 염색하고 공초점 현미경 및 불편 세그먼트화(unbiased segmentation)로 조사하여 총 세포 생존력(total cell viability)을 결정할 것이다. 이 후에 즉시, 샘플을 광표백시켜(photobleach) LIVE/DEAD 형광을 제거하고 일련의 형광 항체(PNL2, HMB45, melan-A, CD4+, CD8+, PDL1, PD1, CD80/CD86, CTLA-4)로 순차적으로 표지하고 이미징하여 흑색종 세포 및 면역세포 서브타입의 위치를 독립적으로 결정할 것이다. 순차적 표지화/이미징 사이클의 회수를 제한하기 위해, 본 발명자들은 수개의 스펙트럼에 의해 구별되는(spectrally-separated) 태그를 그룹핑하고 멀티스펙트럼 이미징(multispectral imaging)을 수행할 것이다.

[0180] *면역 세포 관류(perfusion)/활성화.* 본 발명자들은 림프절 생체시료로부터의 미분류(unsorted) 면역 세포를 테스트할 것이고, 이는 T 림프구를 위한 FACS 분류에 대한 시간 및 비용을 절감할 것이다. 또한, 이는 림프절-유래 세포의 이질성을 보존하고, 그의 여러 세포집단들이 역할을 수행한다. 최초의 수개의 생체시료 세트를 T 세

포 활성화를 유도하기 위해 필요한 PTO 개수, 충분한 활성화를 달성하기 위해 이 TOC에서 면역 세포가 순환되어야 하는 시간의 길이, 및 면역 관문 억제제가 요구되는지 여부를 결정하기 위해 이용할 것이다. T 세포 상태에 대한 하기의 방법 및 척도를 이용하여 이러한 인자들이 결정될 것이다: TOC에 탑재된(onboard) T 세포 기능의 평가로서, 인 비트로에서 항-CD3 + 항-CD28 항체 (BD) 및 상업적으로 이용가능한 (Proimmune Inc), 흑색종 항원에 해당하는 펩티드 풀, gp100, MART-1, 및 티로시나아제에 대한 반응에서 IFN-γ 생성을 결정할 것이다. 96시간 동안 조건을 유지할 것이다. IFN-γ 생성은 ELISA (R&D Systems)에 의해 평가할 것이다. T-세포 증식을 사이토카인 IFN-γ, IL-2 및 TNFα를 측정하는 CFSE 유동 분석(CFSE flow assay)에 의해 측정할 것이다. 비-효소 ECM 용해 또는 대안적으로 콜라게나아제/히알루로니다아제에 의해 TOC로부터 회수된, 오가노이드 세포의 현탁액을 유동 세포측정법(flow cytometry)에 의해 분석할 것이다. T-세포 "고갈-유사(exhausted-like)" 표현형과 연관된 CTLA-4, TIM-3, LAG3, PD-1, 및 CD160의 표면 마커 발현을 결정하기 위해 세포들은 CD3+, CD8+, 및 CD4+ 표현형에 대해 게이팅될 것이다(gated). 또 다른 세트의 실험에서, 전술된 바와 같이, 오가노이드를 고정하고, 종양 세포와 관련하여 T 세포의 국소화(localization) 및 상호작용을 평가하기 위해 CD3+, CD4+, 및 CD8+ T 세포의 형광 염색과 함께 항-PDL-1에 의해 염색할 것이다. inForm 분석 소프트웨어를 이용한 정량적 병리 분석(quantitative pathology)을 위해 다중 스펙트럼 이미징을 이용하여 절편들을 평가할 것이다.

[0181] *잠재적인 면역 관문 억제제 처리.* 필요한 경우, 본 발명자들은 TOC를 4개의 조건들 중 하나의 간헐적 흐름(intermittent flow)에 노출시킬 것이다: 깨끗한 배지, 임상적으로-적절한(clinically-relevant) 농도의 펨브롤리주맙, 니볼루맙, 또는 이필리루맙을 포함하는 배지. 이러한 2개의 널리-사용되는 PD-1 억제제 및 하나의 널리-사용되는 CTLA-4 억제제의 농도는 임상적 치료 가이드라인으로부터 도출하고 PTO의 부피까지 확장할 것이다. 현재 ~100 nM 농도가 이용되고 있고, 면역 세포를 활성화하여, 사용자-의도된 종양 세포 사멸을 유발하지 않는 경우, PTO에 대한 네가티브 효과를 갖지 않는 것으로 보인다.

[0182] 본 발명자들은 미세유체 장치의 내부에 PTO를 구축할 것이다. 구조체 형성에서, 본 발명자들의 목표는 인 비보 종양 조건으로부터의 유전적 변화(alteration)를 피하기 위해 비계대(unpassaged) 환자 세포를 이용하는 것이다. 그러나, 특정 이론에 의해 한정되기를 원치 않으면서, 이는 내재적으로 내포를 위해 이용가능한 세포의 개수를 제한할 수 있다. 예비 연구에서 본 발명자들이 처리한 샘플의 대부분이 제안된 PTO에 대해 충분한 것 이상의 세포를 제공했으나, 본 발명자들은 일부 생검물에 대해 2천만개 세포/mL의 목표 세포 밀도를 달성하는 것이 도전적인 것으로 발견할 수 있다. 그러한 경우에, 본 발명자들은 먼저 도입되어야 하는 세포-함유 전구체의 부피를 최소화하기 위해 미세유체 챔버의 전체 크기를 축소하고 세포 배양 구조체 크기를 더 줄이이면서, 전체 PTO 표면적을 증가시키는 방식을 추구할 것이다. 구체적으로, 본 발명자들은 정확한 포토마스크(석영 위 크롬(chrome on quartz)) 및 더 얇은 유리 슬라이드의 조합을 사용하여 해상도를 제한하는 광학적 효과를 감소시킬 수 있다. 이러한 방식으로, 본 발명자들은 100 ㎛ 미만(sub-100 ㎛) 구조체를 달성할 것으로 예상한다. 본 발명자들은 또한 낮은 계대수(passage number)로 확장하고, 그에 의해 유전적 부동(genetic drift)을 최소화하면서, 세포 이용가능성을 증가시킬 수 있다.

[0183] *PTO에 대한 세포 치료제로서 채택될 수 있는 교육되고 활성화된 T 세포(educated and activated T cell)의 유용성의 입증.* 림프절-유래 세포를 "활성화" 미세유체 장치로부터 활성화 실험에서 이용되지 않은 TOC 장치로 옮겨서 세포 치료를 통한 적응 면역 및 세포 사멸을 테스트할 것이다. 면역 세포 관류에 이전에 노출되지 않았던 PTO를 일치하는(matched) PTO TOC 어레이를 통해 관류에 의해 활성화된 면역 세포 집단을 이용하여 성공적으로 치료할 수 있다는 것이 고려된다.

[0184] *면역 세포 전달(transfer).* T 세포 활성화가 입증된 경우, 프라이밍을 위해 순환되는 면역 세포 현탁액을 깨끗한 유체 저장소 내로 펌핑하고 약물이나 면역 세포 노출 없이 유지되었던, 동일한 환자 생체시료로부터의 신선한 PTO TOC로 전달할 것이다(**도 11c**). 이러한 면역 세포 집단들을 10 ㎕/분으로 TOC를 통해 주입시켜, PTO의 인식 후 생착(engraftment)을 가능하게 할 것이다.

[0185] *호밍 평가.* TOC로의 주입 전에, 막 염료 (DiI/DiO, ThermoFisher)를 이용하여, 면역 세포 집단을 형광 표지할 것이다. 일간 형광 이미징(daily fluorescent imaging)은 PTO에 대해 DiI/DiO-태깅된(tagged) 세포의 운동성 및 상대적 위치, 및 PTO로의 생착 및 침윤을 추적할 것이다. 본 발명자들은 전이-온-어-칩(metastasis-on-a-chip) 플랫폼 중 오가노이드의 상황에서 그러한 추적 방법의 효능을 입증했고, 이는 미세유체 플랫폼을 통한 전이성 대장암 세포주의 소화관으로부터 하류 간 오가노이드로의 전이를 정량하기 위해 유사한 방법을 이용했다.

[0186] *치료 효능(therapeutic efficacy)의 평가.* 종양 세포 사멸 및 최근린 내삽 정량(nearest neighbor quantification)을 수행할 것이다. 3, 7, 또는 10일 동안 각 오가노이드를 지지하기 위해 지속적인 또는 간헐적

인 흐름을 이용하고, T 세포 활성화를 나타내는 분비된 마커, 그란자임(granzyme) B, 및 퍼포린(perforin), 및 IL-2, T-세포 성장 및 분화 인자, 및 ATP 활성의 ELISA 분석을 위해 배지의 분량(aliquot)을 매일 수집할 것이다. 3일차, 7일차, 및 10일차에, 구조체를 LIVE/DEAD 염색하고, 공초점 현미경 분석 및 이미지 세그먼트화를 이용하여 조사하여 총 세포 생존력을 결정할 것이다. 이 후에 바로, 샘플을 광표백시켜 LIVE/DEAD 형광을 제거하고 형광 항체로 순차적으로 표지하고 멀티스펙트럼 이미징을 이용하여 이미징하여 흑색종 세포 및 개별적인 면역세포 서브타입의 상대적 위치를 결정할 것이다. 본 발명자들은 예비 데이터가 타당한 것으로 보여주는, 세포 치료를 위해 PTO를 프라이밍하기 위해 관문 억제제의 추가적인 사용을 탐색할 것이다.

[0187] 본 발명자들은 PTO의 저(low)- 및 고(high)-PD-L1 및 CD80/86 발현 코호트 간에 면역 관문 억제제의 효능을 비교할 것이다. 흑색종에서 높은 PD-L1 및 CD80/86 발현에 대한 문헌 값은 다양하나, 통상적으로, 흑색종 서브타입에 따라, 30-60% 정도의 유병률을 시사한다. 실험은 3회 또는 그 이상의 재현으로 수행될 것이다; 데이터는 평균 ± 평균의 표준 오차로 제시될 것이다. α = 0.05로 2-그룹 비교를 위해 스튜던트 t-검정을 이용할 것이다. 다중 비교를 위해, 95%의 신뢰 한계를 유의한 것으로 간주하는 일원 ANOVA를 이용할 것이다.

[0188] **실시예 7 - 맞춤형 면역치료제 스크리닝을 위한 동일한 환자로부터의 통합 림프절/종양 오가노이드(combined lymph node/tumor organoid)의 조작(engineering)**

[0189] 통합 림프절/흑색종 오가노이드를 동일한 환자로부터의 세포로 제조하여 혼합 종양/림프절 오가노이드를 생성하고, 환자 종양, 기질, 및 면역계가 맞춤화 면역요법 스크리닝을 위해 생존가능한 상태로 유지되는지 여부를 평가하기 위해 실험을 수행했다. 혼합 오가노이드는 개별 환자 종양과 기질 및 면역계가 맞춤화 면역요법 스크리닝에 대해 생존가능한 상태로 유지될 수 있게 하고 환자의 말초혈액 T 세포가 환자 자신의 림프절/종양 공생성 오가노이드에 내포된 APC의 표면에 제시된 종양 항원을 인식하도록 훈련하여 적응 면역의 생성을 가능하게 했다.

[0190] *방법*: 동일한 환자로부터 수술에 의해 수득된 일치하는 흑색종 및 림프절 생체시료를 연구실로 전달하고, 염수(saline), 항생제, 및 적혈구 용해 완충액으로 세척했다. 생체시료를 분리시키고, ECM-기반 히드로겔 시스템에 내포시키고 3D 환자-특이적 혼합 흑색종/림프절 오가노이드로 생체제조했다. 기질 및 면역 세포 성분들을 포함하는 종양 이질성을 보존하기 위해, 종양에 대해 세포들을 분류하지 않았다. 니볼루맙, 펨브롤리주맙, 및 다프라페닙/트라메티닙을 이용하여, 동시에 오가노이드 세트들을 72시간 동안 스크리닝하였다. Live/Dead 염색의 정량 및 대사 분석을 수행하여, 특정 환자에 대해 흑색종 세포 사멸에서 상대적 약물 효능을 기록했다. 광학 현미경 분석, IHC 및 NGS(next generation sequencing)를 이용하여 종양 흑색종 세포를 오가노이드 흑색종 세포와 비교했다.

[0191] *결과*: 5명의 III기 및 IV기 흑색종 환자로부터의 생체시료를 혼합 오가노이드 발생(development)을 위해 적용했다. 생존 오가노이드 세트의 성공적인 수립률(즉, 수용율(take rate))은 80% (4/5)였다. 오가노이드 발생부터 면역요법 테스트까지의 평균 시간은 7일이었다. 면역요법에 대한 오가노이드 반응은 4명 중 3명의 환자(3/4 patients)에서 환자의 임상적 반응과 유사했다. 4번째 환자의 오가노이드는 니볼루맙에 의해 50% 흑색종 사멸을 보였으나, 그 환자는 그 약물에 대해 임상적으로 진행되었다. MEK 경로를 갖는 흑색종의 BRAF 야생형 환자의 트라메티닙에 대한 반응이 NGS 전에 오가노이드 테스트에 의해 시사되었고, 치료에 따른 임상적 반응에서 입증되었다.

[0192] *결론*: 3D 혼합 면역-강화 종양/림프절 오가노이드의 개발은 실행가능한 플랫폼으로, 맞춤화 면역요법 반응의 연구 및 적응 면역의 생성을 위해 개별 환자 면역계 및 종양 세포가 생존가능한 상태로 유지할 수 있게 한다.

[0193] 림프절 세포에 의해 면역강화된 흑색종 환자 종양 오가노이드를 제조하고 뒤이어 면역 관문 억제제와 같은 테스트 화합물로 테스트했다. 면역 강화 없는 오가노이드(종양 단독의 오가노이드)는 반응하지 않으나, 종양 면역 오가노이드는 반응했다(**도 14a-14c**). 또한, 개별적인 환자에 대한 채혈의 백혈구 분획으로부터의 면역 세포에 의해 면역 강화된 흑색종 환자 종양 오가노이드를 제조하고 뒤이어 면역 관문 억제제와 같은 테스트 화합물로 테스트했다. 면역 강화 없는 오가노이드(종양 단독의 오가노이드)는 반응하지 않으나, 종양 면역 오가노이드는 반응했다(**도 15a-15b**). 티올화 HA, 티올화 젤라틴, 및 PEGDA 가교제, 또는 티올화 HA 및 메타크릴화 콜라겐을 포함하는 히드로겔을 이용하여, 실시예에 기재된 바와 같이, 오가노이드를 제조했다.

[0194] **실시예 8**

[0195] 개별적인 환자에 대한 채혈의 백혈구 분획으로부터의 면역 세포에 의해 면역 강화된 육종 환자 종양 오가노이드를 혈관육종 환자(**도 16a**) 및 융기 피부 섬유육종(DFSP) 환자(**도 16b**)로부터 제조하고, 뒤이어, 면역 관문 억제

제와 같은 테스트 화합물로 테스트했다. 면역 증강 없는 오가노이드(종양 단독 오가노이드)는 반응하지 않는 반면에, 종양 면역 오가노이드는 반응했다. 티올화 HA, 티올화 젤라틴, 및 PEGDA 가교제, 또는 티올화 HA 및 메타크릴화 콜라겐을 포함하는 히드로겔을 이용하여, 실시예에 기재된 바와 같이, 오가노이드를 제조했다.

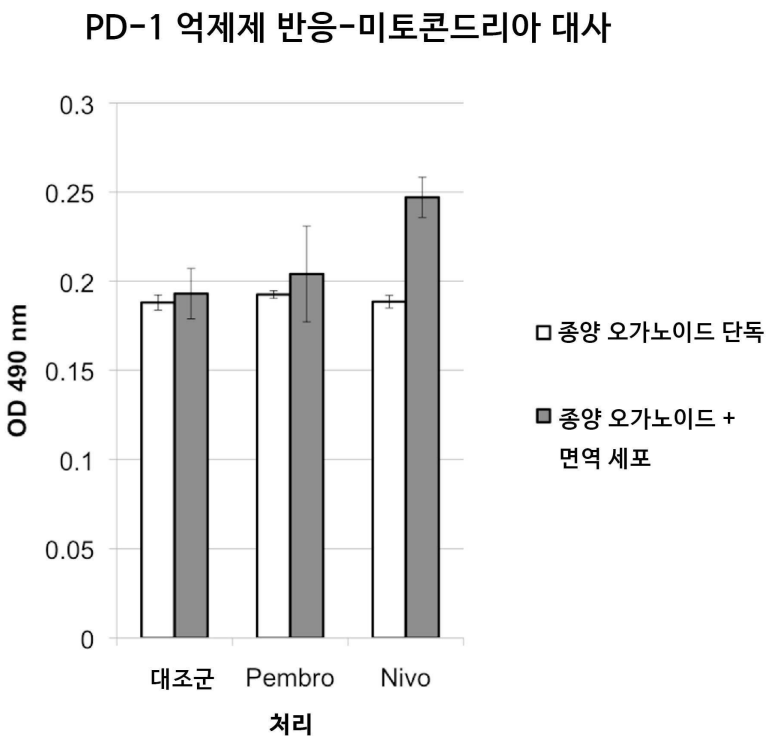
[0196] **실시예 9**

[0197] 환자 자신의 말초 T 세포를 7일 동안 종양 면역 오가노이드에 노출시킨 배지를 포함하는 순환으로 제공했다(**도 11d**). 이러한 노출된 T 세포를 수집하고, 환자로부터의 면역 세포로부터 형성되거나, 이전에 T 세포에 노출되지 않았던, 동일한 환자 종양 생체시료로부터의 종양 오가노이드로 전달하였고, 생존 세포 대 죽은 세포의 시각적 염색에 의해 표시된, 종양의 T 세포 매개 사멸을 관찰하였다 (**도 11e**). 티올화 HA, 티올화 젤라틴, 및 PEGDA 가교제, 또는 티올화 HA 및 메타크릴화 콜라겐을 포함하는 히드로겔을 이용하여, 실시예에 기재된 바와 같이, 오가노이드를 제조했다.

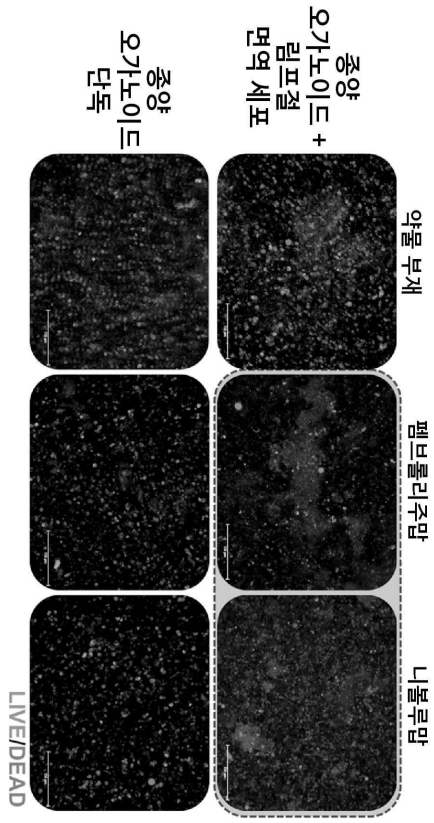
[0198] 전술은 본 발명을 설명하는 것이고, 그를 한정하는 것으로 해석되어서는 안 된다. 본 발명은 하기 청구항에 의해 정의되며, 상기 청구항의 균등물도 본 발명에 포함된다. 본 명세서에서 인용된 모든 공개문헌, 특허 출원, 특허, 특허 공보, 및 기타 참조문헌은 해당 참조문헌이 제시된 문장 및/또는 구와 관련된 교시를 위해 그 전체로 참조에 의해 본 명세서에 포함된다.

도면

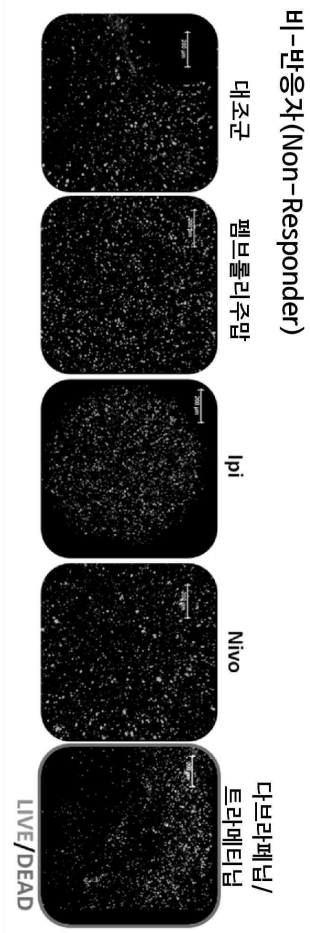
도면1a



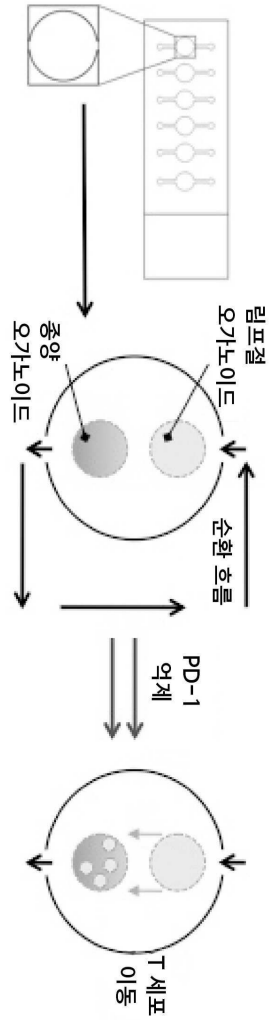
도면1b



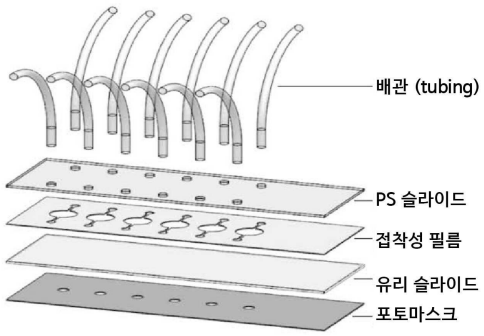
도면1c


비-반응자(Non-Responder)
대조군
펨브롤리주맙
Ipi
Nivo
다브라페닙/
트라메티닙
LIVE/DEAD

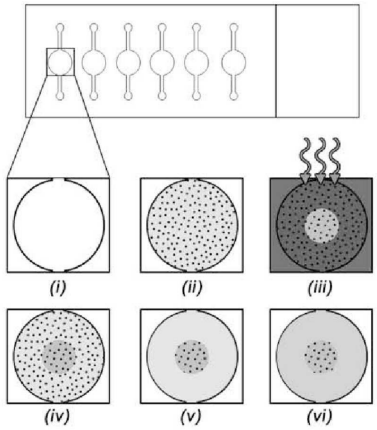
도면2


중앙
오가노이드
림프절
오가노이드
순환 흐름
PD-1
억제
T 세포
이동

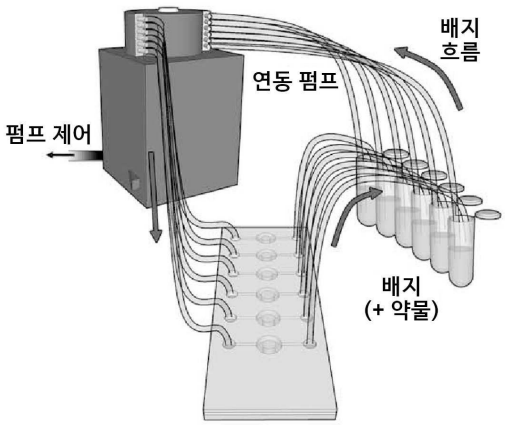
도면3a


배관 (tubing)
PS 슬라이드
접착성 필름
유리 슬라이드
포토마스크

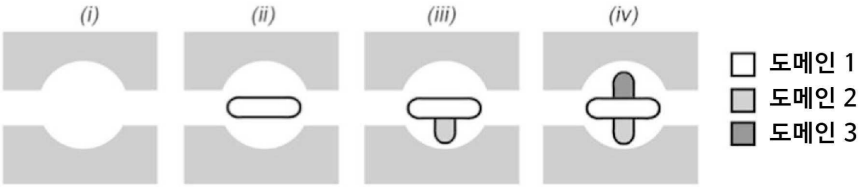
도면3b



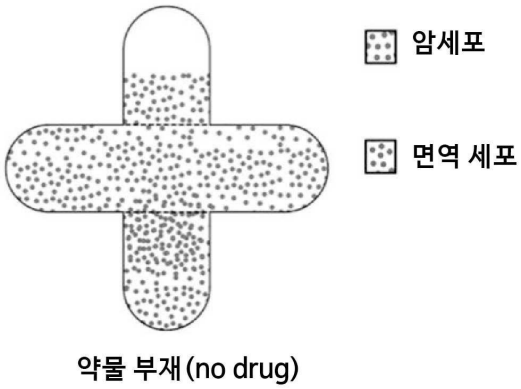
도면3c



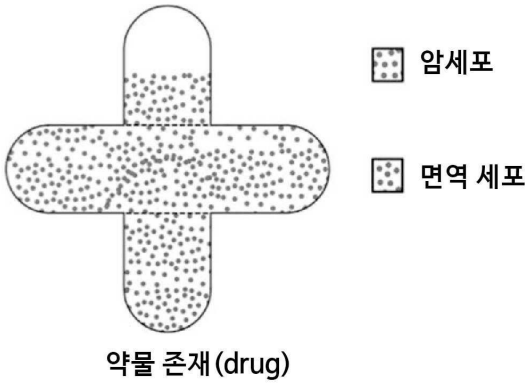
도면4a



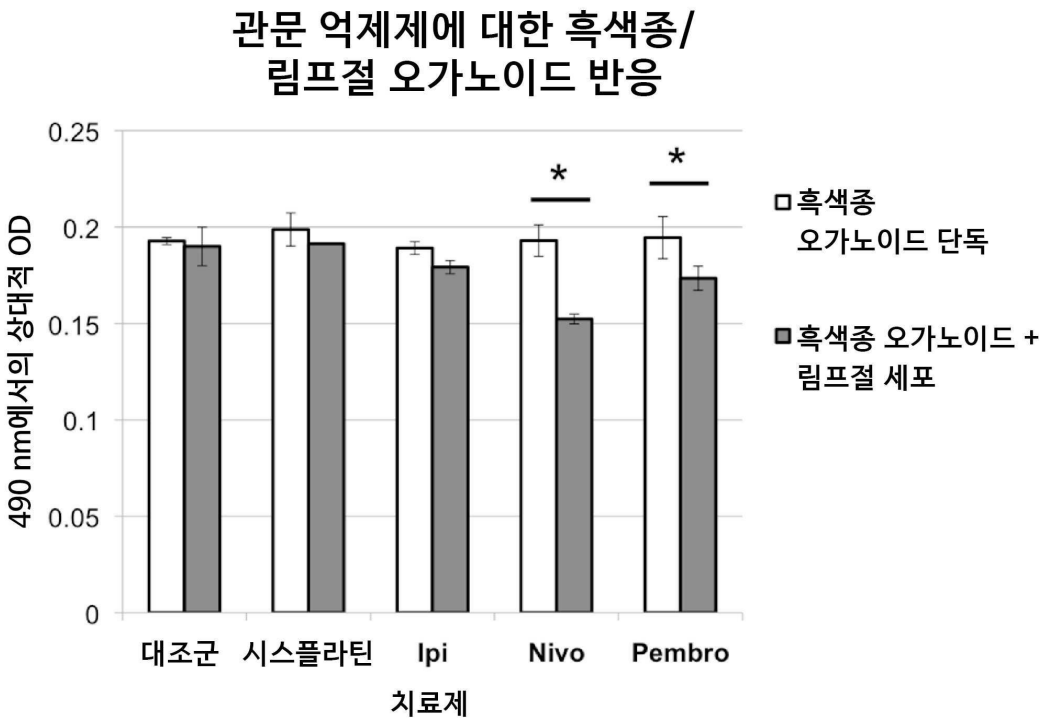
도면4b



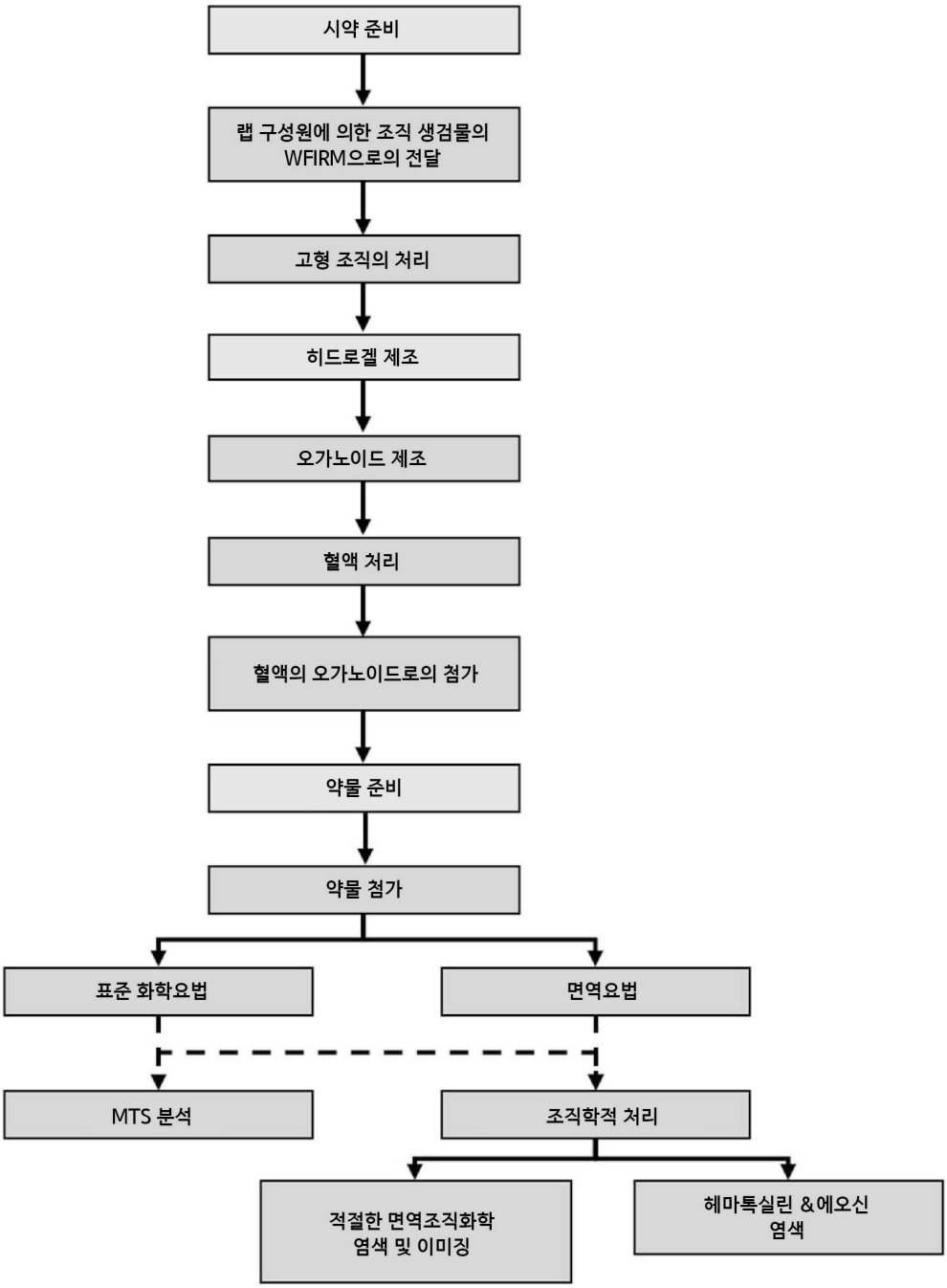
도면4c



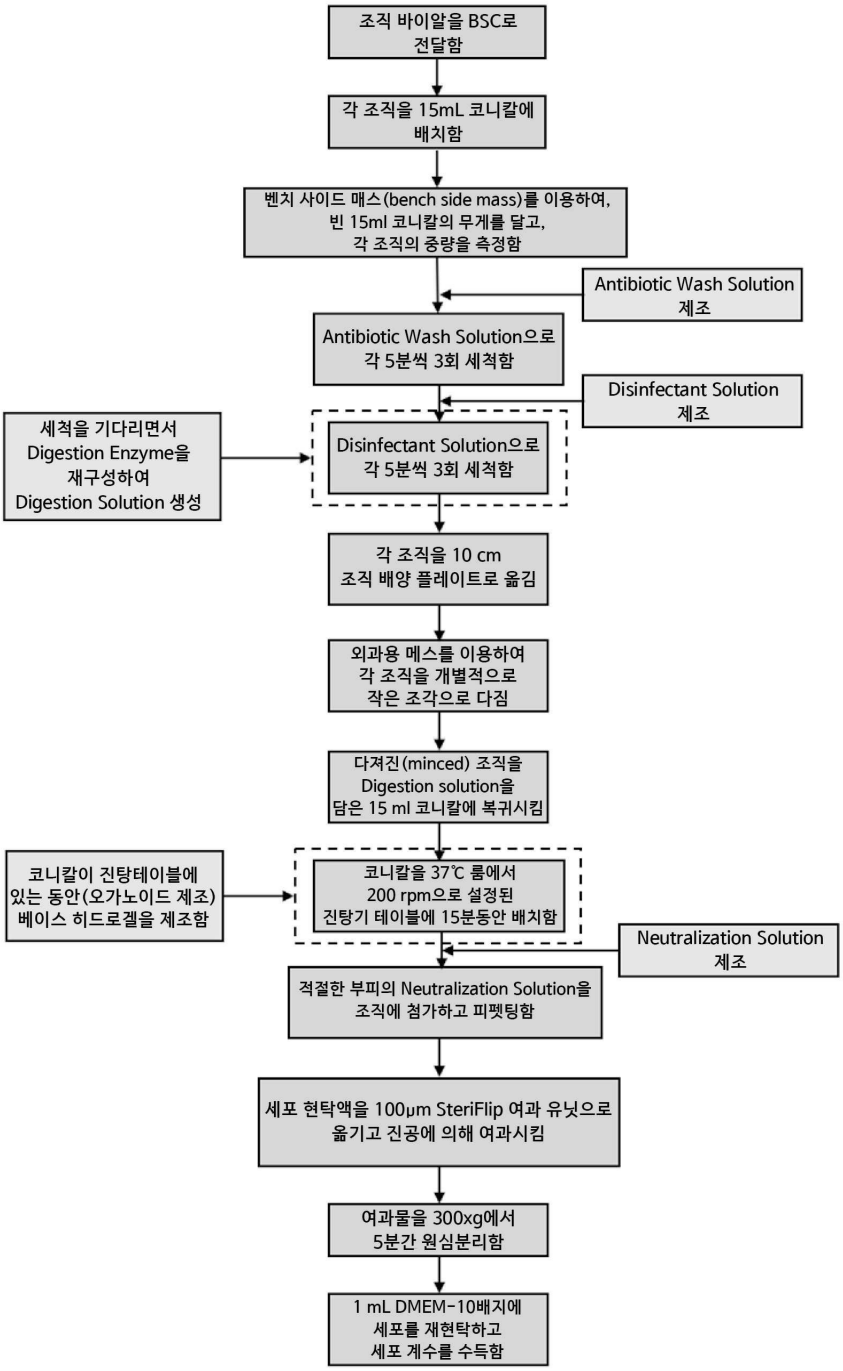
도면5



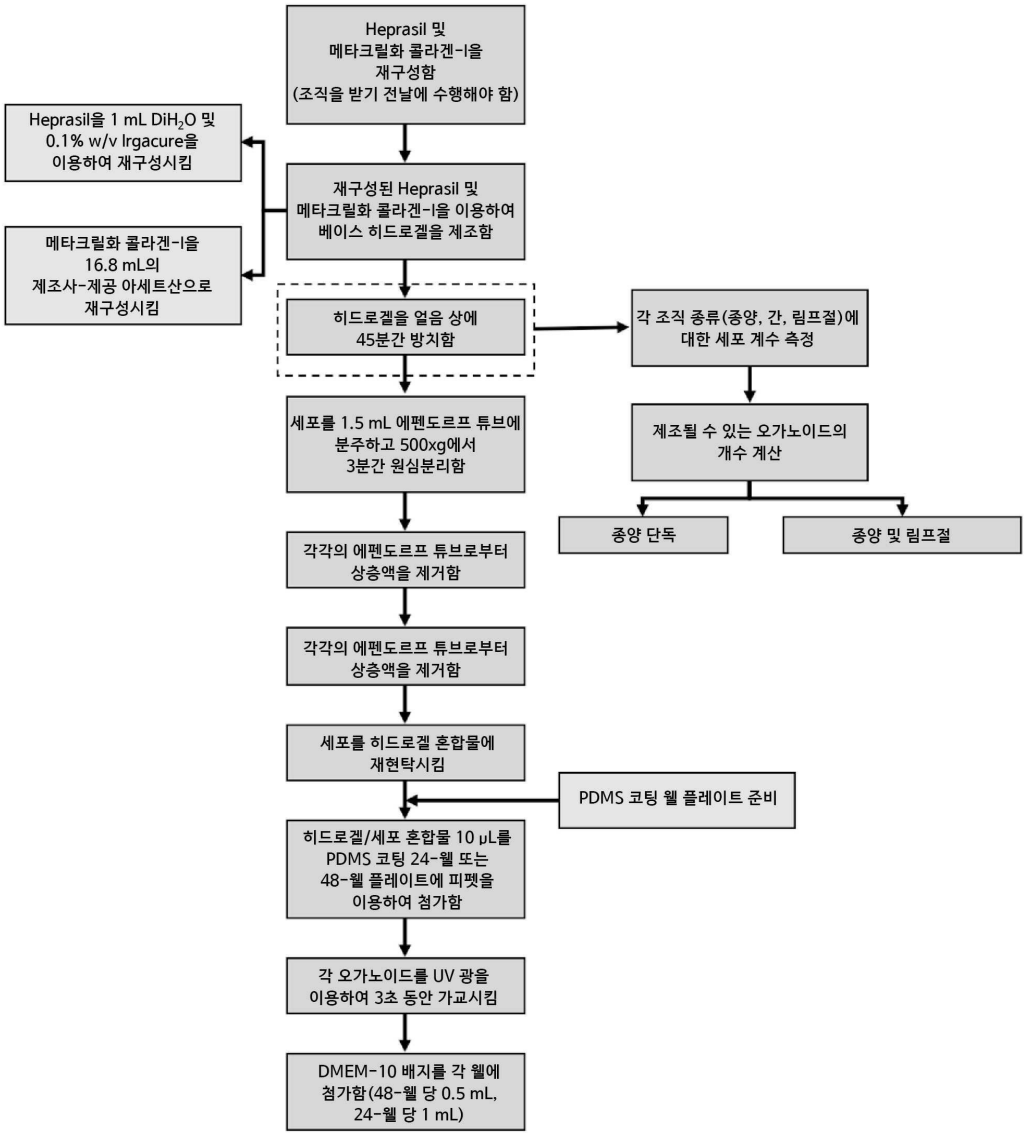
도면6


시약 준비
랩 구성원에 의한 조직 생검물의 WFIRM으로의 전달
고형 조직의 처리
히드로겔 제조
오가노이드 제조
혈액 처리
혈액의 오가노이드로의 첨가
약물 준비
약물 첨가
표준 화학요법
면역요법
MTS 분석
조직학적 처리
적절한 면역조직화학 염색 및 이미징
헤마톡실린 &에오신 염색

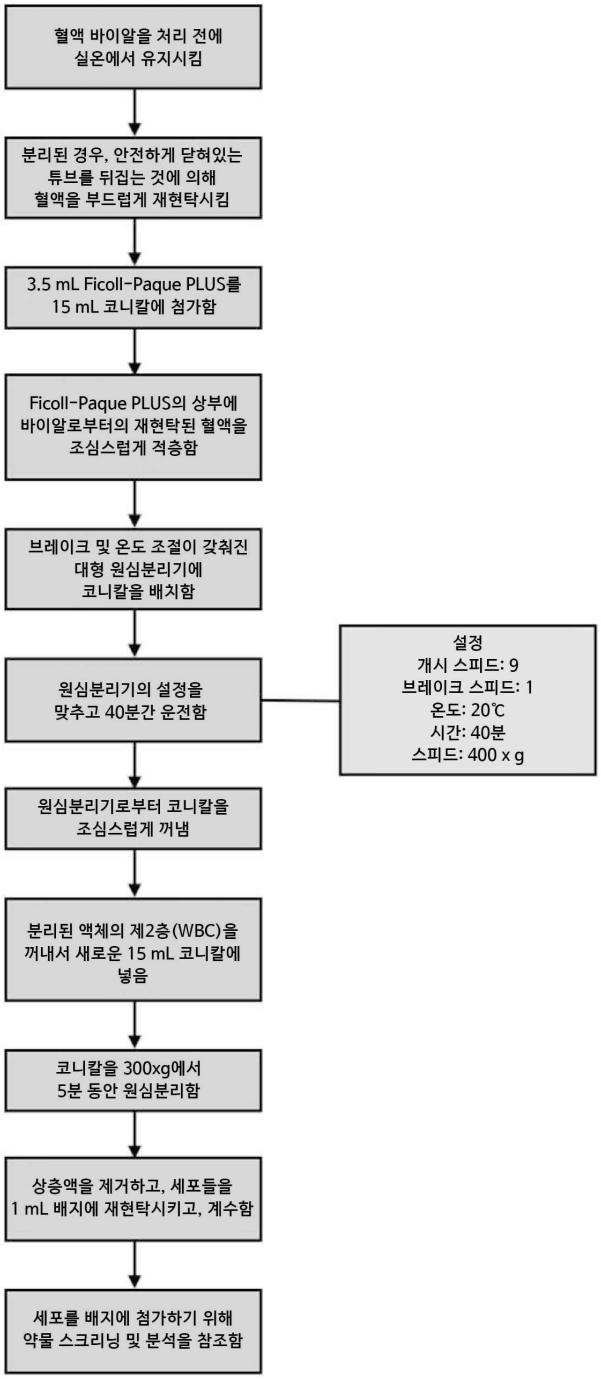
도면7


조직 바이알을 BSC로 전달함
각 조직을 15mL 코니칼에 배치함
벤치 사이드 매스(bench side mass)를 이용하여, 빈 15ml 코니칼의 무게를 달고, 각 조직의 중량을 측정함
Antibiotic Wash Solution 제조
Antibiotic Wash Solution으로 각 5분씩 3회 세척함
Disinfectant Solution 제조
세척을 기다리면서 Digestion Enzyme을 재구성하여 Digestion Solution 생성
Disinfectant Solution으로 각 5분씩 3회 세척함
각 조직을 10 cm 조직 배양 플레이트로 옮김
외과용 메스를 이용하여 각 조직을 개별적으로 작은 조각으로 다짐
다져진(minced) 조직을 Digestion solution을 담은 15 ml 코니칼에 복귀시킴
코니칼이 진탕테이블에 있는 동안(오가노이드 제조) 베이스 히드로겔을 제조함
코니칼을 37℃ 룸에서 200 rpm으로 설정된 진탕기 테이블에 15분동안 배치함
Neutralization Solution 제조
적절한 부피의 Neutralization Solution을 조직에 첨가하고 피펫팅함
세포 현탁액을 100μm SteriFlip 여과 유닛으로 옮기고 진공에 의해 여과시킴
여과물을 300xg에서 5분간 원심분리함
1 mL DMEM-10배지에 세포를 재현탁하고 세포 계수를 수득함

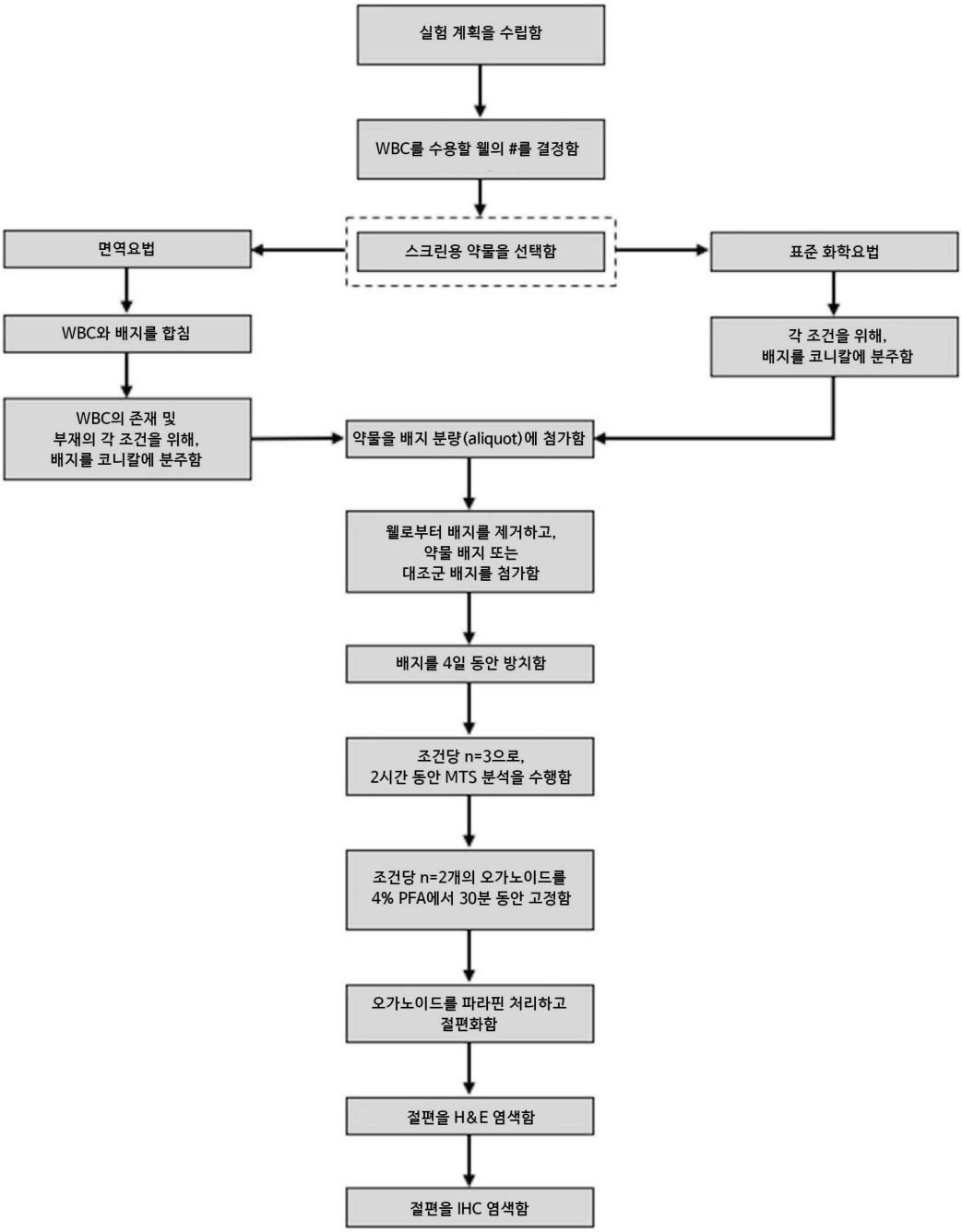
도면8


Heprasil 및
메타크릴화 콜라겐-I을
재구성함
(조직을 받기 전날에 수행해야 함)
Heprasil을 1 mL DiH_2O 및
0.1% w/v Irgacure을
이용하여 재구성시킴
재구성된 Heprasil 및
메타크릴화 콜라겐-I을 이용하여
베이스 히드로겔을 제조함
메타크릴화 콜라겐-I을
16.8 mL의
제조사-제공 아세트산으로
재구성시킴
히드로겔을 얼음 상에
45분간 방치함
각 조직 종류(종양, 간, 림프절)에
대한 세포 계수 측정
제조될 수 있는 오가노이드의
개수 계산
종양 단독
종양 및 림프절
세포를 1.5 mL 에펜도르프 튜브에
분주하고 500xg에서
3분간 원심분리함
각각의 에펜도르프 튜브로부터
상층액을 제거함
각각의 에펜도르프 튜브로부터
상층액을 제거함
세포를 히드로겔 혼합물에
재현탁시킴
PDMS 코팅 웰 플레이트 준비
히드로겔/세포 혼합물 10 μL를
PDMS 코팅 24-웰 또는
48-웰 플레이트에 피펫을
이용하여 첨가함
각 오가노이드를 UV 광을
이용하여 3초 동안 가교시킴
DMEM-10 배지를 각 웰에
첨가함(48-웰 당 0.5 mL,
24-웰 당 1 mL)

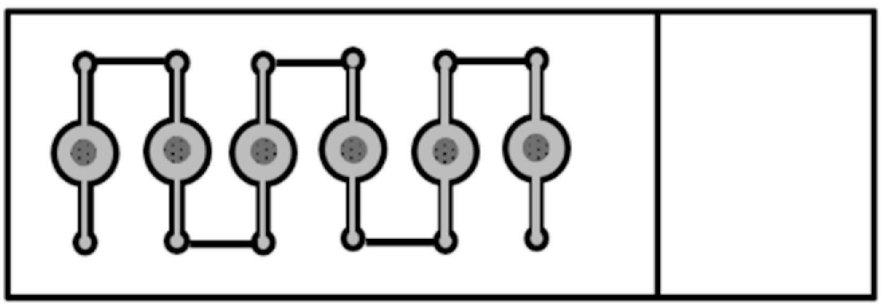
도면9


혈액 바이알을 처리 전에
실온에서 유지시킴
분리된 경우, 안전하게 닫혀있는
튜브를 뒤집는 것에 의해
혈액을 부드럽게 재현탁시킴
3.5 mL Ficoll-Paque PLUS를
15 mL 코니칼에 첨가함
Ficoll-Paque PLUS의 상부에
바이알로부터의 재현탁된 혈액을
조심스럽게 적층함
브레이크 및 온도 조절이 갖춰진
대형 원심분리기에
코니칼을 배치함
원심분리기의 설정을
맞추고 40분간 운전함
설정
개시 스피드: 9
브레이크 스피드: 1
온도: 20℃
시간: 40분
스피드: 400 x g
원심분리기로부터 코니칼을
조심스럽게 꺼냄
분리된 액체의 제2층(WBC)을
꺼내서 새로운 15 mL 코니칼에
넣음
코니칼을 300xg에서
5분 동안 원심분리함
상층액을 제거하고, 세포들을
1 mL 배지에 재현탁시키고, 계수함
세포를 배지에 첨가하기 위해
약물 스크리닝 및 분석을 참조함

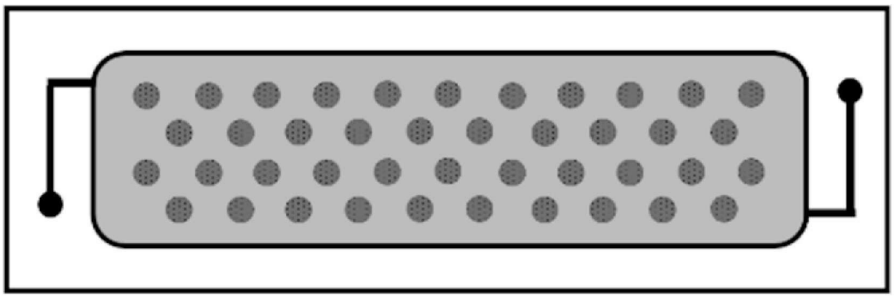
도면10


실험 계획을 수립함
WBC를 수용할 웰의 #를 결정함
스크린용 약물을 선택함
면역요법
표준 화학요법
WBC와 배지를 합침
각 조건을 위해,
배지를 코니칼에 분주함
WBC의 존재 및
부재의 각 조건을 위해,
배지를 코니칼에 분주함
약물을 배지 분량(aliquot)에 첨가함
웰로부터 배지를 제거하고,
약물 배지 또는
대조군 배지를 첨가함
배지를 4일 동안 방치함
조건당 n=3으로,
2시간 동안 MTS 분석을 수행함
조건당 n=2개의 오가노이드를
4% PFA에서 30분 동안 고정함
오가노이드를 파라핀 처리하고
절편화함
절편을 H&E 염색함
절편을 IHC 염색함

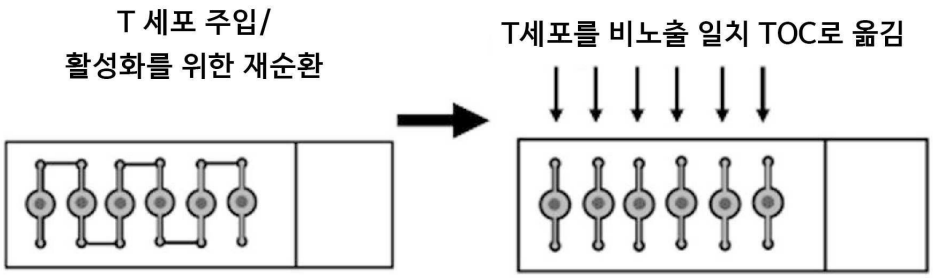
도면11a



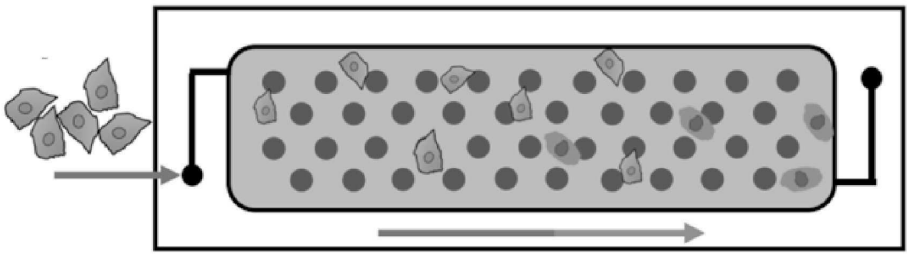
도면11b



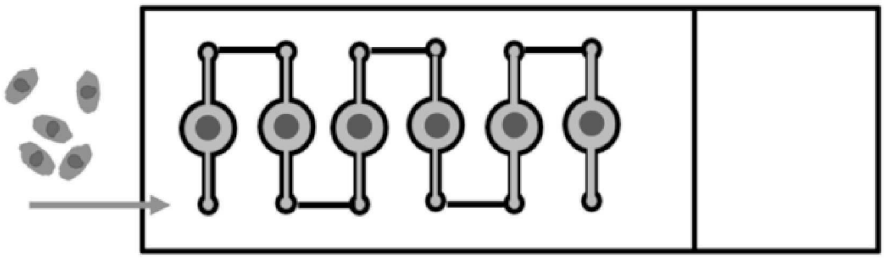
도면11c



도면11d

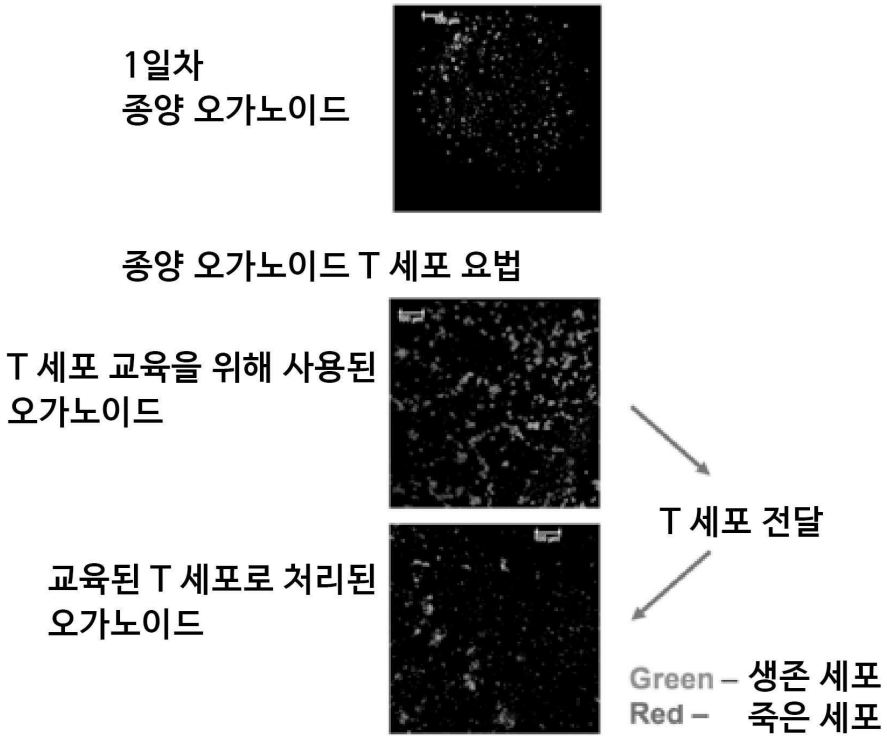


활성화

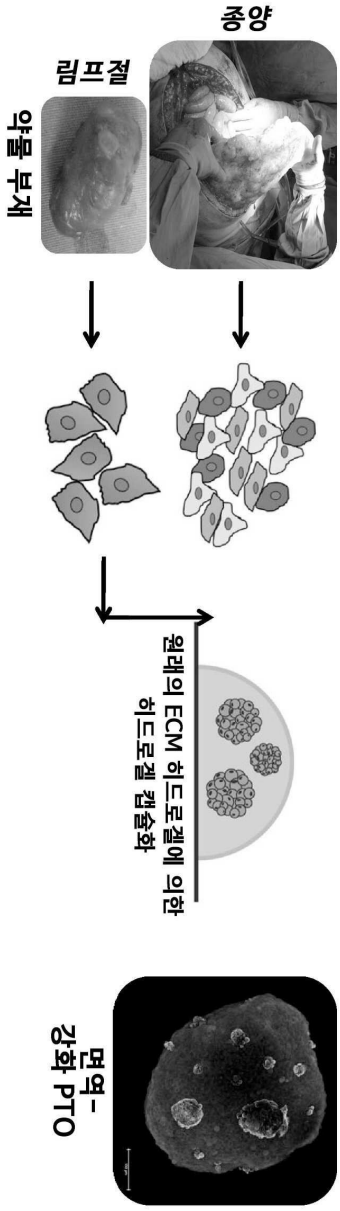


T 세포 호밍 및 종양 세포 사멸

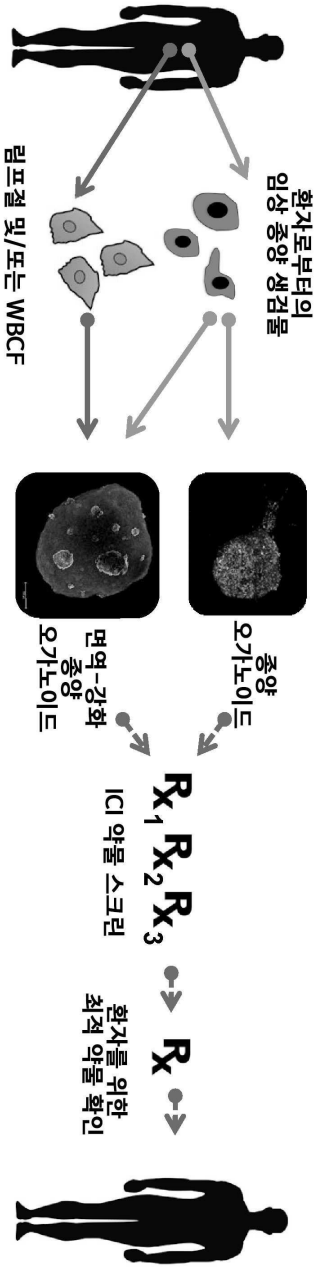
도면11e


1일차
종양 오가노이드
종양 오가노이드 T 세포 요법
T 세포 교육을 위해 사용된
오가노이드
T 세포 전달
교육된 T 세포로 처리된
오가노이드
Green – 생존 세포
Red – 죽은 세포

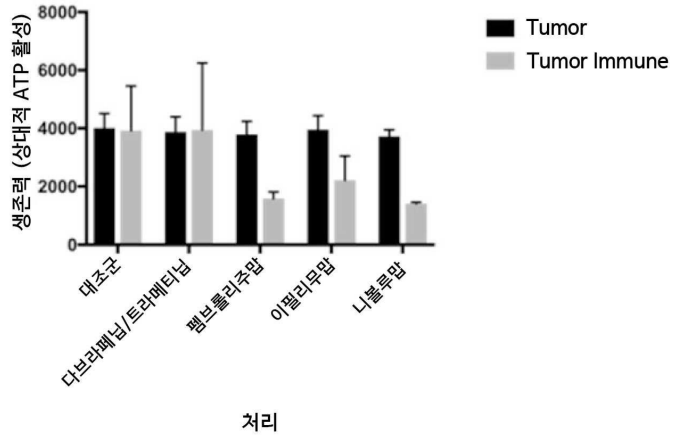
도면12



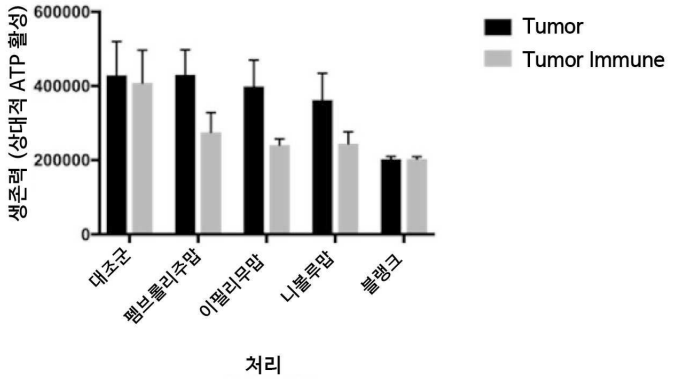
도면13


환자로부터의
임상 종양 생검물
림프절 및/또는 WBCF
종양
오가노이드
면역-강화
종양
오가노이드
Rx1 Rx2 Rx3
ICI 약물 스크린
Rx
환자를 위한
최적 약물 확인

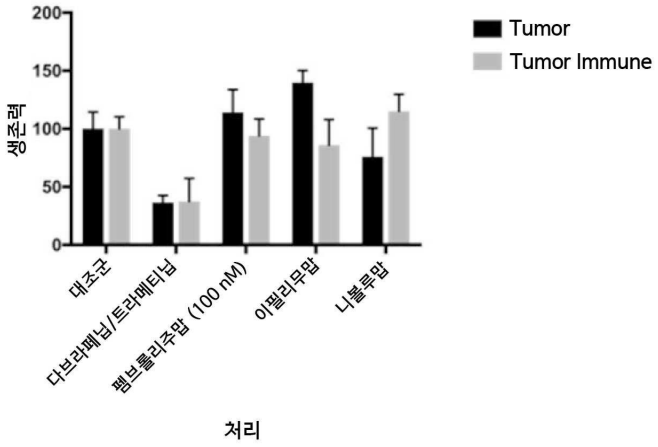
도면14a



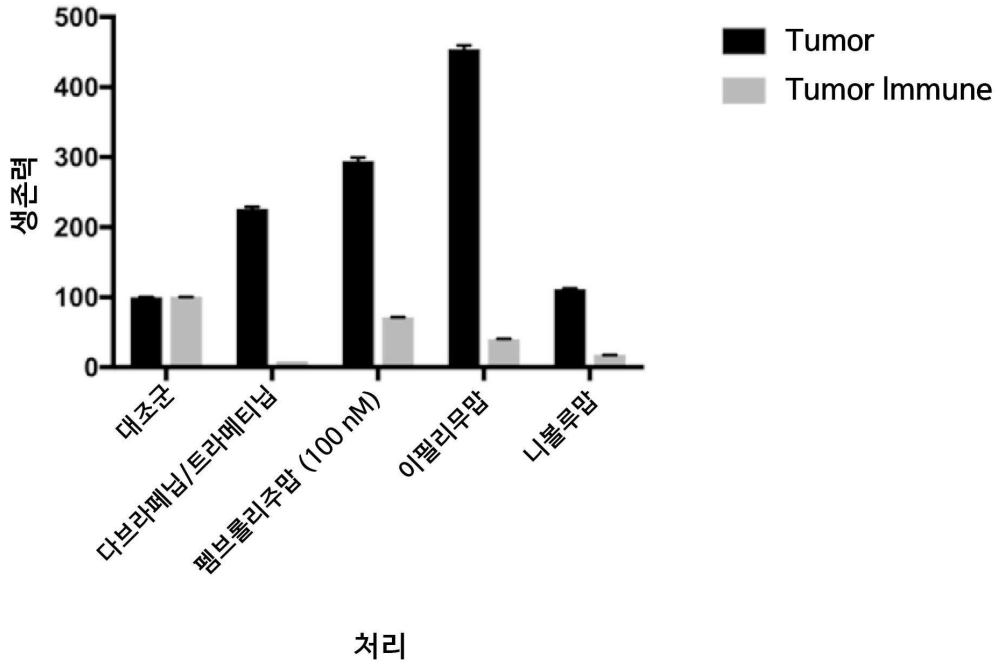
도면14b



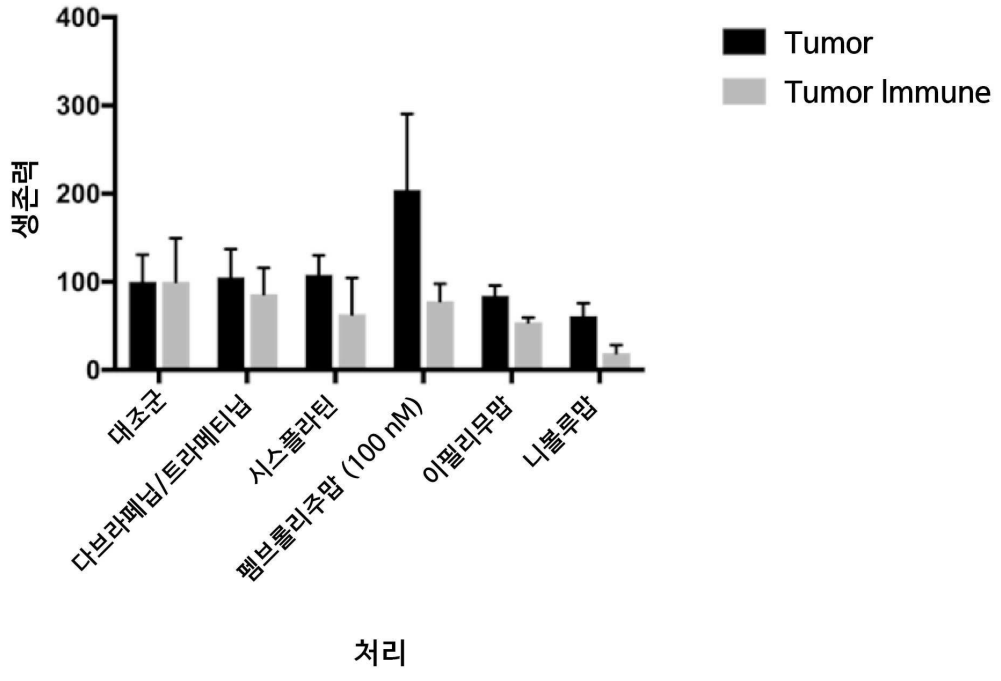
도면14c



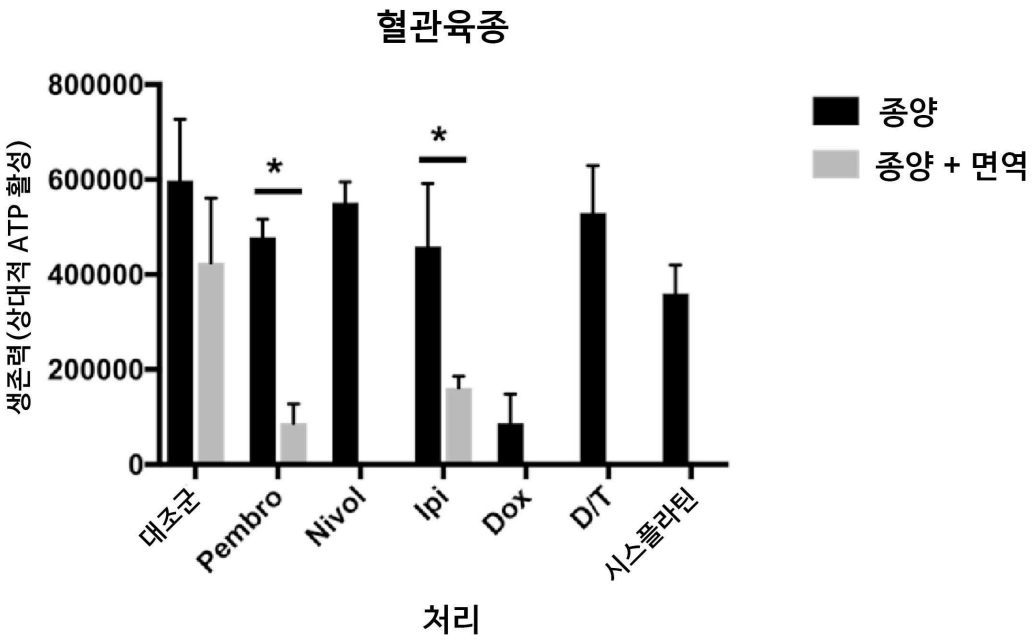
도면15a


500
400
300
200
100
0
생존력
대조군
다브라페닙/트라메티닙
펨브롤리주맙 (100 nM)
이필리무맙
니볼루맙
Tumor
Tumor Immune
처리

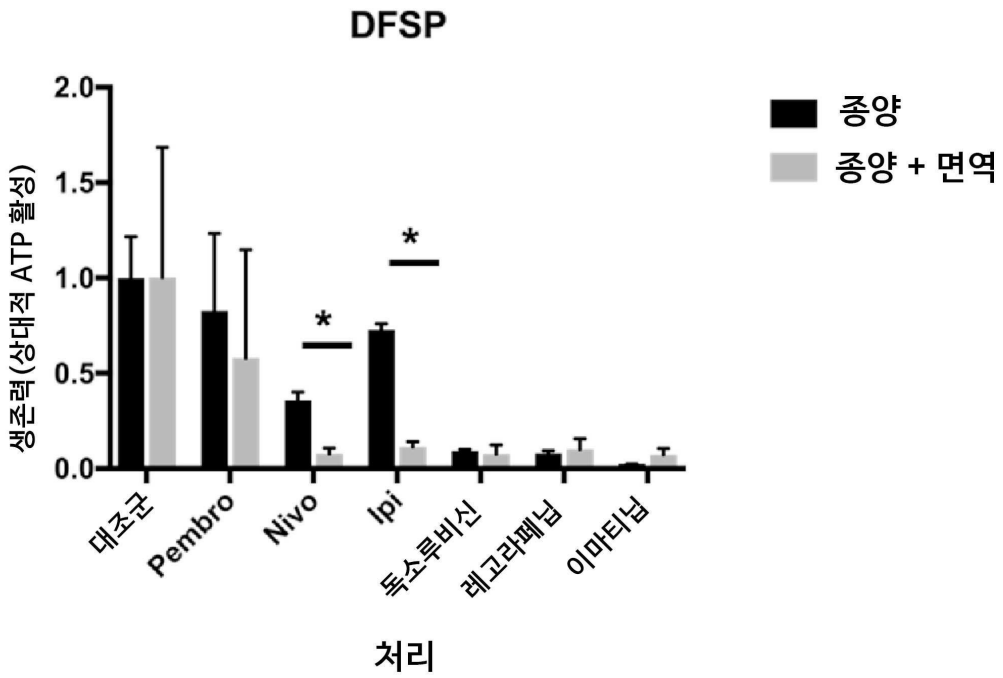
도면15b


400
300
200
100
0
생존력
대조군
다브라페닙/트라메티닙
시스플라틴
펨브롤리주맙 (100 nM)
이필리무맙
니볼루맙
Tumor
Tumor Immune
처리

도면16a


혈관육종
800000
600000
400000
200000
0
생존력(상대적 ATP 활성)
*
*
대조군
Pembro
Nivol
Ipi
Dox
D/T
시스플라틴
처리
종양
종양 + 면역

도면16b


DFSP
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
생존력(상대적 ATP 활성)
*
*
대조군
Pembro
Nivo
Ipi
독소루비신
레고라페닙
이마티닙
처리
종양
종양 + 면역