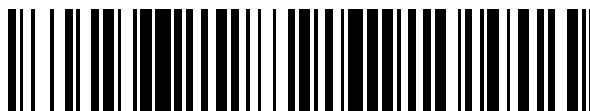


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 735 248**

51 Int. Cl.:

C12N 5/074 (2010.01)

A61K 35/407 (2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.07.2011 PCT/IB2011/002167**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.02.2012 WO12014076**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.07.2011 E 11764293 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.05.2019 EP 2598633**

54 Título: **Organoide hepático, sus utilizaciones, y método de cultivo para su obtención**

30 Prioridad:

10.06.2011 US 201161520569 P

29.07.2010 US 368736 P

29.07.2010 EP 10171265

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.12.2019

73 Titular/es:

**KONINKLIJKE NEDERLANDSE AKADEMIE VAN
WETENSCHAPPEN (100.0%)
Hubrecht Institute, Uppsalalaan 8
3584 CT Utrecht, NL**

72 Inventor/es:

**HUCH ORTEGA, MERITXELL y
CLEVERS, JOHANNES, CAROLUS**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 735 248 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Organoide hepático, sus utilizaciones, y método de cultivo para su obtención

5 CAMPO DE LA INVENCION

[0001] La invención se refiere a un organoide hepático, usos del mismo y un procedimiento para su obtención.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0002] La unidad de arquitectura básica del hígado es el lóbulo del hígado. Cada lóbulo consiste en placas de hepatocitos revestidas por capilares sinusoidales que se irradian hacia una vena eferente central. Los lóbulos hepáticos son aproximadamente hexagonales y cada una de las seis esquinas está demarcada por la presencia de una tríada portal (vena porta, conducto biliar y arteria hepática). Aunque los hepatocitos son el principal tipo de células parenquimatosas del hígado, funcionan en combinación con colangiocitos (células epiteliales biliares), células endoteliales, células endoteliales sinusoidales, células de Kupffer, células asesinas naturales y células estrelladas hepáticas. Esta arquitectura compleja es crucial para la función hepática.

[0003] La existencia de células madre del hígado sigue siendo controvertida. Por un lado, el mantenimiento de los tejidos en el hígado y la regeneración del hígado en ciertos tipos de lesión, no son impulsados por las células madre, sino por la división de las células maduras (hepatocitos o colangiocitos). Sin embargo, los modelos de lesión hepática en los que se inhibió la proliferación de hepatocitos también demostraron la capacidad del órgano para regenerarse en respuesta al daño. Esto sugiere que el hígado puede ser considerado como un órgano con células madre facultativas.

[0004] Hasta el momento, los cultivos de hígado derivados de hepatocitos, o por diferenciación de células madre embrionarias (ES) o células madre pluripotentes inducidas, no se expanden y autorenewan por períodos más largos.

[0005] Recientemente, en el intestino delgado, se identificó el gen *Lgr5* que se expresa específicamente en células en ciclo Cripta Base Columnar (CBC), que son células pequeñas que se intercalan entre las células de Paneth (Barker et al., 2007. *Nature* 449: 1003-1007). Usando un ratón en el que se integró un casete de recombinasa *Cre* inducible por GFP/tamoxifeno en el locus *Lgr5*, se demostró mediante el rastreo de linaje que las células CBC *Lgr5*+ constituyen células madre multipotentes que generan todos los tipos de células del epitelio incluso cuando se evalúan 14 meses después de la inducción de *Cre*.

[0006] Recientemente se ha descubierto que también *Lgr6*, además *Lgr5*, pero no *Lgr4*, es un marcador único para las células madre adultas. Mientras que *Lgr5* se expresa en células madre de cerebro, riñón, hígado, retina, estómago, intestino, páncreas, mama, folículo piloso, ovario, médula suprarrenal y piel, *Lgr6* se expresa en células madre de cerebro, pulmón, mama, folículo piloso, y la piel.

[0007] Aquí hemos desarrollado un método para el cultivo de células progenitoras del hígado adultas y para obtener un organoide hepático que muestra el mantenimiento de vida más larga, son capaces de diferenciarse a ambos, hepatocitos y linajes de colangiocito y preservar la fisiología básica de fragmentos de hígado aislados.

45 RESUMEN DE LA INVENCION

[0008] La invención proporciona un método para obtener un organoide hepático, en el que dicho método comprende: cultivar una o más células madre epiteliales hepáticas, o un fragmento de hígado o un conducto biliar hepático, en contacto con una matriz extracelular en presencia de un medio de expansión, comprendiendo el medio un medio basal para células animales o humanas al que se agrega: factor de crecimiento epidérmico (EGF), un factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) capaz de unirse a FGFR2 o FGFR4, nicotinamida y un agonista de Wnt seleccionado de R-espondina 1, R-espondina 2, R-espondina 3 o R-espondina 4.

[0009] La invención también proporciona un medio de cultivo celular que comprende un medio basal para células de animales o humanas a la que se añade: EGF, FGF una capaz de unirse a FGFR2 o FGFR4, nicotinamida, y un agonista Wnt seleccionado de R-espondina 1, R-espondina 2, R-espondina 3 y R-espondina 4.

[0010] La invención también proporciona un organoide hepático que comprende células que expresan *Lgr5*, que puede obtenerse mediante el cultivo de una o más células madre epiteliales del hígado, o un fragmento del hígado o un conducto biliar del hígado, en contacto con una matriz extracelular en presencia de un medio de expansión, comprendiendo el medio un medio basal para células animales o humanas al que se agrega: factor de crecimiento epidérmico (EGF), un factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) capaz de unirse a FGFR2 o FGFR4, nicotinamida, un agonista de Wnt seleccionado de R-espondina 1, R-espondina 2, R-espondina 3 o R-espondina 4, y HGF, en donde el organoide del hígado puede cultivarse durante al menos 3 meses.

[0011] La invención también proporciona el uso de un organoide hepático de la invención en una pantalla de descubrimiento de fármacos.

[0012] La invención también proporciona el uso de un organoide hepático de la invención en un ensayo de toxicidad.

[0013] La invención también proporciona un organoide hepático de la invención para uso en el tratamiento de un trastorno hepático, afección o enfermedad o para uso en medicina regenerativa.

RESUMEN DE LA DIVULGACIÓN

[0014] La invención se refiere a un procedimiento para la obtención de un organoide hepático, en donde el método comprende el cultivo de células en un primer medio de cultivo de "expansión" (también denominado aquí como EM), seguido preferiblemente por cultivo de las células en un segundo medio de cultivo de "diferenciación" (también denominado aquí DM).

[0015] El organoide hepático se puede obtener mediante el cultivo de una sola célula madre Lgr5+, una población de células que comprende al menos una célula madre Lgr5+, y/o un fragmento de hígado. En este documento, cuando se hace referencia a "células en/del medio de cultivo", el significado incluye una única célula madre Lgr5+, una población de células que comprende al menos una célula madre Lgr5+ y/o un fragmento de hígado.

[0016] En una realización, el medio de expansión comprende EGF, un agonista de Wnt, FGF, y nicotinamida. Preferiblemente, el agonista de Wnt es R-espondina 1, por lo que el medio de expansión se denomina "ERFNic". Un medio de expansión particularmente preferido comprende además HGF y se denomina "ERFHNic".

[0017] En una realización, el medio de diferenciación comprende EGF, un inhibidor de TGF-beta, FGF y un inhibidor de Notch. En una realización, el inhibidor de TGF-beta es A83-01 y/o el inhibidor de Notch es DAPT. Este medio de diferenciación se denomina aquí como "EAFD" y es un medio de diferenciación preferido de la invención. El FGF puede opcionalmente reemplazarse por HGF o, alternativamente, tanto el FGF como el HGF pueden estar presentes o ausentes en el medio de diferenciación. Dexametasona también puede ser agregado.

[0018] En una realización preferida, las células pueden inicialmente ser cultivadas en un medio de expansión que contiene adicionalmente Wnt y Noggin, por ejemplo un medio "ENRW" que contiene EGF, Noggin, R-espondina y Wnt, y, opcionalmente, FGF, HGF y nicotinamida. Los inventores han descubierto que este medio es óptimo para estimular la expansión inicial de las células durante los primeros días. Por lo tanto, este primer medio de expansión a veces se denomina aquí EM1. En algunas realizaciones, Wnt y Noggin se eliminan después de aproximadamente 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días o más, por ejemplo 2 semanas, 1 mes, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 meses o más, 14 meses o más. Las células pueden entonces expandirse en un medio de expansión de la invención, como se describe anteriormente que no contiene Wnt o Noggin. Este segundo medio de expansión a veces se denomina aquí como EM2. En algunas realizaciones, las células se cultivan en EM2 durante aproximadamente 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días o un período de tiempo más largo, como 3, 4, 5, 10, 20 o mas semanas El medio de cultivo puede luego cambiarse a un medio de diferenciación optimizado, como se describe anteriormente, que contiene un inhibidor de TGF-beta y un inhibidor de Notch. Típicamente, el medio de diferenciación no contiene un agonista de Wnt, R-espondina o nicotinamida. Esto fomenta la diferenciación de las células hacia hepatocitos maduros y colangiocitos. Estas células son adecuadas para el trasplante en humanos o animales.

[0019] La invención también se refiere a un organoide hepático. La presente solicitud describe la primera vez que los organoides hepáticos se cultivan *ex vivo*.

DESCRIPCION DE LA INVENCION

[0020] En un primer aspecto, la invención proporciona un método para obtener un organoide hepático, en el que dicho método comprende: cultivar una o más células madre epiteliales del hígado, o un fragmento del hígado o un conducto biliar del hígado en contacto con una matriz extracelular en el presencia de un medio, comprendiendo el medio un medio basal para células animales o humanas al que se agrega: factor de crecimiento epidérmico, un FGF capaz de unirse a FGFR2 o FGFR4, preferiblemente FGF10 como un factor de crecimiento mitogénico, Nicotinamida y un agonista de Wnt, seleccionado de R-espondina 1, R-espondina 2, R-espondina 3 o R-espondina 4 y opcionalmente Wnt-3a. Preferiblemente, también se añade HGF.

[0021] Por ejemplo, en una realización, la invención proporciona un método para obtener un organoide hepático, en el que dicho método comprende: cultivar una o más células madre epiteliales hepáticas, o un fragmento de hígado o una ductina biliar hepática en contacto con una matriz extracelular en presencia de un medio, comprendiendo el medio un medio basal para células animales o humanas al que se agrega un inhibidor de BMP, un agonista de Wnt seleccionado de R-espondina 1, R-espondina 2, R-espondina 3 o R-espondina 4, factor de crecimiento epidérmico, un FGF capaz de unirse a FGFR2 o

FGFR4, preferiblemente FGF10 y HGF como factores de crecimiento mitogénicos, gastrina, nicotinamida, B27, N2 y N-Acetilcisteína.

[0022] Los presentes inventores han descubierto sorprendentemente que un método de la invención permite el cultivo de células madre epiteliales y/o fragmentos aislados del hígado que comprenden dichas células madre, al tiempo que conserva la presencia de células madre que conservan un fenotipo indiferenciado. y capacidades de auto mantenimiento. Aún más sorprendente fue la observación de que un método de la invención permite el crecimiento de una única célula madre epitelial aislada en un organoide hepático en ausencia de un nicho de células madre.

[0023] Las células madre se encuentran en muchos órganos de seres humanos y ratones adultos. Aunque puede haber una gran variación en las características exactas de las células madre adultas en los tejidos individuales, las células madre adultas comparten al menos las siguientes características: conservan un fenotipo no diferenciado; su descendencia puede diferenciarse hacia todos los linajes presentes en el tejido pertinente; conservan las capacidades de auto mantenimiento a lo largo de la vida; y son capaces de regenerar el tejido pertinente después de la lesión. Las células madre residen en una ubicación especializada, el nicho de células madre, que suministra los contactos y las células celulares adecuados para el mantenimiento de dicha población de células madre.

[0024] Las células madre epiteliales son capaces de formar los distintos tipos de células de las que se compone el epitelio. Algunos epitelios, como la piel o el intestino, muestran una rápida renovación celular, lo que indica que las células madre residentes deben estar en continua proliferación. Otros epitelios, como el hígado o el páncreas, muestran una rotación muy lenta en condiciones normales.

[0025] El aislamiento de las células madre epiteliales de hígado puede llevarse a cabo por un número de diferentes protocolos. Aunque los inventores no desean estar limitados por ninguna teoría particular, en este documento se plantea la hipótesis de que existe una población de células madre en el hígado que, en el caso de una lesión tisular, es responsable de la regeneración del hígado. Se cree que la población celular responsable de esta regeneración sensible a la lesión expresa el marcador Lgr5 cuando se activa.

[0026] Mediante la inyección de ratones Lgr5-LacZ knock-in con el compuesto hepatotóxico CC14 para simular daños en el hígado, los inventores han demostrado por primera vez que el daño hepático induce la expresión Lgr5 en el hígado en los sitios de regeneración activa (véase el ejemplo 4). Los inventores también han demostrado que la inyección del agonista de Wnt R-espondina provoca una regulación positiva de la expresión de señalización de Wnt en los conductos hepáticos. Aunque los inventores no desean estar sujetos a ninguna teoría particular, en este documento se plantea la hipótesis de que las células madre/progenitoras regenerativas pueden activarse mediante la señalización Wnt después de una lesión hepática. Las células positivas para Lgr5 pueden luego aislarse del hígado/fragmento de hígado, si es necesario, como se describe en el presente documento. Por lo tanto, la descripción describe un método para obtener/aislar células Lgr5+ del hígado que comprende inducir lesión hepática o estimular la señalización de Wnt, por ejemplo, con R-espondina. Esto es útil porque en algunas realizaciones, las células Lgr5+ son el punto de partida para obtener organoides hepáticos *in vitro* (aunque el uso de un medio de cultivo de la invención permite la generación de una célula Lgr5+ mediante la adición de un agonista Wnt como R-espondina y así es no es esencial obtener una célula Lgr5+ del hígado para practicar la presente invención). También se proporcionan las células Lgr5+ obtenidas por este método. En algunas realizaciones, dichas células preferiblemente no expresan marcadores de células estrelladas, por ejemplo, SMA. En su lugar, dichas células expresan preferiblemente uno o más marcadores progenitores del hígado o marcadores de células madre como Sox9. Preferiblemente, la expresión de uno o más marcadores progenitores del hígado o marcadores de células madre tales como Sox9 está regulada positivamente en dichas células en comparación con el hígado adulto.

[0027] La descripción también describe un método para regenerar el hígado que comprende la estimulación de la señalización de Wnt. Tal método puede ser útil en el tratamiento de trastornos hepáticos. La inducción de la expresión de Lgr5 en células hepáticas por lesión o estimulando la señalización de Wnt puede llevarse a cabo *in vivo*, *ex vivo* en un hígado aislado, o *in vitro* en un fragmento de hígado o población de células hepáticas. En realizaciones en las que la inducción de la expresión de Lgr5 se lleva a cabo *ex vivo* o *in vitro*, las células positivas de Lgr5 pueden administrarse a un paciente que lo necesite por cualquier medio adecuado, por ejemplo, mediante inyección o implantación. En algunas realizaciones, las células implantadas están contenidas en una matriz biocompatible. En algunas realizaciones, las células se expanden *ex vivo* antes de usarse en terapia.

[0028] En un método preferido de la invención, dichas células madre epiteliales se aíslan de un fragmento de hígado o un conducto biliar del hígado, más preferiblemente a partir de tejido del conducto biliar.

[0029] Los métodos para el aislamiento de tejido del conducto biliar son conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, el conducto biliar se puede aislar de un hígado como se describe en los ejemplos adjuntos. Brevemente, un tejido de hígado adulto puede lavarse en un medio de cultivo frío (4-10°C), preferiblemente DMEM/F12 avanzado (Invitrogen) y luego, el tejido puede cortarse en trozos de alrededor de 5 mm y luego lavarse con disociación fría tampón (colagenasa, dispasa, FBS en medio DMEM). Los fragmentos de tejido se incuban preferiblemente con el tampón de disociación durante aproximadamente 2 horas a aproximadamente 37°C. Luego, los fragmentos de tejido

pueden suspenderse vigorosamente en 10 ml de tampón de aislamiento frío (4-10°C) con una pipeta de 10 ml. El primer sobrenadante que contiene células muertas se desecha preferiblemente y el sedimento preferiblemente se suspende con tampón de disociación (por ejemplo, 10-15 ml). Después de una suspensión vigorosa adicional de los fragmentos de tejido, el sobrenadante se enriquece en conductos biliares. De este modo, se puede obtener una suspensión que contiene conductos biliares y los conductos biliares se recogen bajo el microscopio y se retienen en medios fríos (DMEM + 5-10% FBS). Este procedimiento puede repetirse hasta que se recojan al menos 10-20 conductos biliares/pocillo. Entonces, los conductos biliares aislados pueden precipitarse. Los conductos biliares aislados se siembran preferiblemente en 50 µl de matrigel en una proporción aproximada de 20 conductos biliares/pocillo.

[0030] En contraste con hepatocitos maduros, que crecen hasta la confluencia durante un corto período de tiempo, antes de morir, células madre epiteliales de hígado aisladas de acuerdo con la divulgación se auto-renuevan y crecen indefinidamente. Se ha encontrado que la población de células que se renueva espontáneamente son aquellas que son capaces de expresar Lgr5 en su superficie. Las células negativas de Lgr5 no se renuevan por sí mismas. Debe entenderse que el término "auto-renovación" representa la capacidad de una célula para reproducirse mientras se mantienen las propiedades originales de proliferación y diferenciación de las células de la invención. Estas células proliferan al dividirse para formar clones, que se dividen en clones y, por lo tanto, expanden el tamaño de la población celular sin la necesidad de una intervención externa, sin evolucionar hacia células con un potencial de diferenciación más restringido.

[0031] Un método preferido se basa en el hecho de que las células madre del hígado de acuerdo con la invención expresan Lgr5 y/o Lgr6 en su superficie; estas proteínas pertenecen a la gran superfamilia del receptor acoplado a la proteína G (GPCR) (véase, por ejemplo, el documento WO2009/022907, cuyos contenidos se incorporan aquí en su totalidad). La subfamilia Lgr es única en el transporte de un gran ectodominio rico en leucina, importante para la unión del ligando. Por lo tanto, un método preferido comprende preparar una suspensión celular a partir de dicho tejido epitelial como se describe anteriormente, poner en contacto dicha suspensión celular con un compuesto de unión a Lgr5 y/o 6 (como un anticuerpo), aislar el compuesto de unión a Lgr5 y/o 6 y aislar las células madre de dicho compuesto de unión.

[0032] Se prefiere que una suspensión de células que comprende las células madre epiteliales se genera mecánicamente del conducto biliar aislado. Los pequeños fragmentos de organoides generados de esta manera por ruptura mecánica se dividen preferiblemente en una proporción de aproximadamente 1:6. Si es necesario, dichos fragmentos pueden incubarse por un corto tiempo (solo 2 o 3 minutos) en tripsina a una dilución de aproximadamente 1:2. Se ha encontrado que en esta etapa las células madre epiteliales tratadas con tripsina arrojaron tasas de supervivencia más bien bajas: si las células se dividen en células individuales, solo las que expresan Lgr5 sobreviven. Esta fracción es bastante pequeña (aproximadamente el 12% de la población celular total).

[0033] Compuestos de unión Lgr5 y/o 6 preferidos comprenden anticuerpos, tales como anticuerpos monoclonales que reconocen específicamente y se unen al dominio extracelular de cualquiera de Lgr5 o Lgr6, tales como anticuerpos monoclonales, incluyendo anticuerpos monoclonales de ratón y rata (véase, por ejemplo, WO2010/016766, cuyos contenidos se incorporan aquí en su totalidad). Usando dicho anticuerpo, pueden aislarse células madre que expresan Lgr5 y/o Lgr6, por ejemplo, con la ayuda de perlas magnéticas o mediante clasificación de células activadas por fluorescencia, como es evidente para una persona experta. Usando un método de la divulgación, es posible aislar una única célula que exprese Lgr5 y/o Lgr6 y aplicar un método de la invención a la misma. Por lo tanto, un organoide de hígado puede derivarse de una sola célula.

Nicho de células madre

[0034] Las células madre aisladas se cultivan preferiblemente en un microambiente que imita al menos en parte un nicho celular en el que dichas células madre natural residen. Este nicho celular puede imitarse cultivando dichas células madre en presencia de biomateriales, como matrices, andamios y sustratos de cultivo que representan señales reguladoras clave que controlan el destino de las células madre. Dichos biomateriales comprenden biomateriales naturales, semisintéticos y sintéticos, y/o mezclas de los mismos. Un andamio proporciona una red bidimensional o tridimensional. Materiales sintéticos adecuados para tales polímeros de componentes de andamios seleccionados de sólidos porosos, nanofibras e hidrogeles tales como, por ejemplo, péptidos que incluyen péptidos autoensamblables, hidrogeles compuestos de fosfato de polietilenglicol, fumarato de polietilenglicol, poli(acrilamida), poli(hidroxietil) metacrilato, acetato de poliacrilato y/o copolímeros de los mismos (ver, por ejemplo, Saha et al., 2007. Curr Opin Chem Biol. 11 (4): 381-387; Saha et al., 2008. Biophysical Journal 95: 4426-4438; Little et al., 2008. Chem. Rev 108, 1787-1796). Como es conocido por un experto, las propiedades mecánicas tales como, por ejemplo, la elasticidad del andamio, influyen en la proliferación, diferenciación y migración de las células madre. Un andamio preferido comprende (co)polímeros biodegradables que son reemplazados por componentes naturales después del trasplante en un sujeto, por ejemplo, para promover la regeneración de tejidos y/o la cicatrización de heridas. Además, se prefiere que dicho andamio no induzca sustancialmente una respuesta inmunogénica después del trasplante en un sujeto. Dicho andamio se complementa con ligandos naturales, semisintéticos o sintéticos, que proporcionan las señales que se requieren para la proliferación y/o diferenciación, y/o migración de células madre. En una realización preferida,

dichos ligandos comprenden fragmentos de aminoácidos definidos. Los ejemplos de dichos polímeros sintéticos comprenden el tensioactivo de copolímero de bloque Pluronic® F127 (BASF) y Ethisorb® (Johnson and Johnson).

[0035] Un nicho celular es determinada en parte por las células madre y células circundantes, y la matriz extracelular (ECM) que se produce por las células en dicho nicho. En un método preferido de la invención, fragmentos hepáticos aislados o conductos biliares aislados o células madre epiteliales se unen a una ECM. La ECM se compone de una variedad de polisacáridos, agua, elastina y glicoproteínas, en donde las glicoproteínas comprenden colágeno, entactina (nidógeno), fibronectina y laminina. La ECM es secretada por las células del tejido conectivo. Se conocen diferentes tipos de ECM, que comprenden diferentes composiciones que incluyen diferentes tipos de glicoproteínas y/o diferentes combinaciones de glicoproteínas. Dicha ECM puede proporcionarse cultivando células productoras de ECM, tales como, por ejemplo, células de fibroblastos, en un receptáculo, antes de la eliminación de estas células y la adición de fragmentos de hígado aislados o conductos biliares aislados o células madre epiteliales aisladas. Ejemplos de células productoras de matriz extracelular son condrocitos, que producen principalmente colágeno y proteoglicanos, células de fibroblastos, que producen principalmente colágeno de tipo IV, laminina, procolágenos intersticiales y fibronectina, y miofibroblastos de colon que producen principalmente colágenos (tipo I, III y V), condroitina sulfato de proteoglicano, ácido hialurónico, fibronectina y tenascina-C. Alternativamente, dicho ECM se proporciona comercialmente. Ejemplos de matrices extracelulares disponibles comercialmente son proteínas de matriz extracelular (Invitrogen) y preparaciones de membrana basal de células de sarcoma de ratón Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) (por ejemplo, Matrigel™ (BD Biosciences)). Se puede usar un material de matriz extracelular sintético, como ProNectin (Sigma Z378666). Se pueden usar mezclas de materiales de matriz extracelular, si se desea. El uso de una MEC para el cultivo de células madre mejoró la supervivencia a largo plazo de las células madre y la presencia continua de células madre no diferenciadas. En ausencia de una ECM, los cultivos de células madre no pudieron cultivarse durante períodos más prolongados y no se observó una presencia continua de células madre indiferenciadas. Además, la presencia de una ECM permitió el cultivo de organoides tisulares tridimensionales, que no se pudieron cultivar en ausencia de una ECM. El material de la matriz extracelular se recubrirá normalmente sobre un recipiente de cultivo celular, pero puede suministrarse (además o alternativamente) en solución. Se puede usar una solución de fibronectina de aproximadamente 1 mg/ml para recubrir un recipiente de cultivo celular, o entre aproximadamente 1 µg/cm² y aproximadamente 250 µg/cm², o entre aproximadamente 1 µg/cm² y aproximadamente 150 µg/cm². En algunas realizaciones, un recipiente de cultivo celular está recubierto con fibronectina a entre 8 µg/cm² y 125 µg/cm².

[0036] Un ECM preferido para uso en un método de la invención comprende al menos dos glicoproteínas distintas, tales como dos tipos diferentes de colágeno o un colágeno y laminina. La ECM puede ser una matriz extracelular de hidrogel sintético o una ECM natural. Matrigel™ (BD Biosciences) proporciona una ECM preferida adicional, que comprende laminina, entactina y colágeno IV.

[0037] Las composiciones de la invención pueden comprender suero, o pueden estar libres de suero y/o libre de suero de reemplazo, como se describe en este documento. Los medios de cultivo y las preparaciones celulares son preferiblemente procesos GMP en línea con los estándares exigidos por la FDA para productos biológicos y para garantizar la consistencia del producto.

Medios de cultivo

[0038] Un medio de cultivo celular que se utiliza en un método de la invención comprende cualquier medio de cultivo celular adecuado, sujeto a las limitaciones proporcionadas en la presente. Los medios de cultivo celular típicamente contienen una gran cantidad de ingredientes, que son necesarios para apoyar el mantenimiento de las células cultivadas. El experto en la materia puede formular fácilmente combinaciones adecuadas de ingredientes, teniendo en cuenta la siguiente descripción. Un medio de cultivo de acuerdo con la invención será generalmente una solución nutritiva que comprende ingredientes de cultivo celular estándar, tales como aminoácidos, vitaminas, sales inorgánicas, una fuente de energía de carbono y un tampón, como se describe con más detalle en la literatura y más adelante.

[0039] Un medio de cultivo de la invención normalmente se formulará en, agua destilada desionizada. Un medio de cultivo de la invención se esterilizará típicamente antes de su uso para evitar la contaminación, por ejemplo, mediante luz ultravioleta, calentamiento, irradiación o filtración. El medio de cultivo puede congelarse (por ejemplo, a -20°C o -80°C) para su almacenamiento o transporte. El medio puede contener uno o más antibióticos para prevenir la contaminación. El medio puede tener un contenido de endotoxina inferior a 0,1 unidades de endotoxina por ml, o puede tener un contenido de endotoxina inferior a 0,05 unidades de endotoxina por ml. Los métodos para determinar el contenido de endotoxinas de los medios de cultivo son conocidos en la técnica.

[0040] Un medio de cultivo celular preferido es un medio sintético definido que está tamponado a un pH de 7,4 (preferiblemente con un pH 7,2 a 7,6 o al menos 7,2 y no superior a 7,6) con un tampón a base de carbonato, mientras que las células son cultivadas en una atmósfera que comprende entre 5% y 10% de CO₂, o al menos 5% y no más de 10% de CO₂, preferiblemente 5% de CO₂.

[0041] El experto entenderá a partir del conocimiento general común de los tipos de medios de cultivo que podrían ser utilizados para que el medio basal en los medios de cultivo celular de la invención. Los medios de cultivo celular potencialmente adecuados están disponibles comercialmente e incluyen, entre otros, los medios Eagle modificados de Dulbecco (DMEM), medio esencial mínimo (MEM), Knockout-DMEM (KO-DMEM), medio esencial mínimo de Glasgow (G-MEM), Medio Basal de Eagle (BME), DMEM/Ham's F12, Advanced DMEM/Ham's F12, medio modificado de Iscove Dulbecco y medio esencial mínimo (MEM), Ham's F-10, Ham's F-12, Medio 199 y Medio RPMI 1640.

[0042] Un medio de cultivo celular preferido se selecciona de DMEM/F12 y medio RPMI 1640 suplementado con glutamina, insulina, penicilina/estreptomicina y transferrina. En una realización preferida adicional, se utiliza DMEM/F12 avanzado o RPMI avanzado, que está optimizado para el cultivo sin suero y ya incluye insulina. En este caso, dicho medio DMEM/F12 avanzado o RPMI avanzado está preferiblemente suplementado con glutamina y penicilina/estreptomicina

[0043] En algunas realizaciones, el medio basal comprende DMEM F12 avanzada, HEPES, penicilina/estreptomicina, glutamina, cisteína NAcetyl, B27, N2 y gastrina. En algunas realizaciones, el cultivo se inicia con un medio basal que comprende N2 y gastrina y penicilina/estreptomicina, pero estos se retiran más tarde. Por ejemplo, en algunas realizaciones, N2 y gastrina y penicilina/estreptomicina están presentes en un medio EM1 de la invención, pero no en un EM2 o DM. Por ejemplo, en algunas realizaciones, N2 y gastrina y penicilina/estreptomicina están presentes en un medio EM1 y EM2 de la invención, pero no en una DM. En realizaciones particularmente preferidas, el medio basal es DMEM avanzado/F12 o una variante de DMEM suplementada con penicilina/estreptomicina, N2, B27, glutamina y gastrina.

[0044] En realizaciones preferidas, el medio basal comprende gastrina. En algunas realizaciones, el medio basal también comprende NAc y/o B27.

[0045] Se prefiere, además, que dicho medio de cultivo celular se complementa con un factor purificado, natural semi-sintético y/o factor de crecimiento sintético y no comprende un componente indefinido, tal como suero bovino fetal o suero de ternera fetal. Varias formulaciones diferentes de reemplazo de suero están disponibles comercialmente y son conocidas por los expertos. De acuerdo con las técnicas convencionales, cuando se usa un reemplazo de suero, se puede usar entre aproximadamente el 1% y aproximadamente el 30% en volumen del medio.

Medio de expansión (EM2):

[0046] En un aspecto de la presente invención, se proporciona un medio de cultivo celular que comprende o consiste en un medio basal para células de animales o humanas a la que se añade: Factor de crecimiento epidérmico, un FGF capaz de unirse a FGFR2 o FGFR4, preferiblemente FGF10 como factor de crecimiento mitogénico, nicotinamida y agonista de Wnt, seleccionado de R-espondina 1, R-espondina 2, R-espondina 3 y R-espondina 4, preferiblemente R-espondina 1. Este medio se conoce como EM2.

[0047] Preferiblemente, el agonista de Wnt es R-espondina 1. Un medio que comprende EGF, R-espondina 1, FGF y nicotinamida se denomina aquí como ERFN1c.

[0048] En algunas realizaciones, el medio EM2 no comprende noggin, y más preferiblemente no comprende un inhibidor BMP. En algunas realizaciones, el medio EM2 no comprende Wnt, por ejemplo, Wnt-3a.

[0049] En algunas realizaciones, el HGF está presente además de FGF. Un medio preferido que comprende HGF además de FGF es ERFH1c (EGF + R-espondina (preferiblemente R-espondina1) + FGF (preferiblemente FGF10) + HGF + Nicotinamida). Los inventores han descubierto que el medio ERFH1c es el medio óptimo para la expansión de células a largo plazo. En la ausencia de HGF, las células no permanecieron viables en cultivo durante más de tres meses. Además, en ausencia de HGF, después de 10 pases, las células mostraron una desventaja de crecimiento en comparación con las células cultivadas en presencia de HGF como se evidencia por una menor proporción de proliferación. En particular, después de 15 pases, las células no crecían organoides en la misma relación de velocidad en ausencia de HGF que en presencia de HGF. Por lo tanto, se encontró que el HGF es esencial para mantener una buena tasa de proliferación durante el cultivo a largo plazo. Por lo tanto, la invención proporciona el uso de un medio ERFH1c de la invención para el cultivo de células durante al menos 2 semanas, al menos 1 mes, al menos 2 meses, más preferiblemente al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 15, al menos 20, al menos 24, al menos 25, al menos 30 o más meses, por ejemplo, 3 o más años. En la práctica, algunas realizaciones de la invención comprenden el uso de E2 para aproximadamente 20-30 pases de las células. Por ejemplo, las células se pueden dividir de 20 a 30 veces, generalmente una vez a la semana. Preferiblemente, las células se expandirán a una velocidad de aproximadamente 4 veces por semana o dos duplicaciones de población por semana. La invención proporciona además el uso de un medio ERFH1c de la invención para cultivar células durante al menos 10 pases, por ejemplo, al menos 11, al menos 12, al menos 15, al menos 20, al menos 25, al menos 30, al menos 40, al menos 50, al menos 60 pasajes o para entre 15 y 35 pasajes, por ejemplo, aproximadamente 20 a 30 pasajes. En algunas realizaciones, un inhibidor de TGF-beta tal como A83-01 está presente adicionalmente en el medio EM2. Esto es particularmente útil cuando se cultivan células u organoides

humanos. En algunas realizaciones, el A83-01 está presente en una concentración de entre 400-600 nM, por ejemplo, 450-550 nM, 470-530 nM o aproximadamente 500 nM. En realizaciones en las que un inhibidor de TGF-beta está presente en EM2, preferiblemente no está presente un inhibidor de Notch.

5 Medio de expansión (EM1):

[0050] En un aspecto, la descripción describe un medio de cultivo celular que comprende o consiste en un medio basal para células animales o humanas al que se le añade EGF, un inhibidor de BMP, R-espondina y Wnt. Preferiblemente, el inhibidor de BMP es Noggin y el medio EM1 se denomina "ENRW" (EGF, Noggin, R-espondina y Wnt). Este medio se conoce como EM1. Los inventores han descubierto que un medio que contiene Wnt y Noggin es ideal para estimular la expansión inicial de las células. Por lo tanto, en algunas formas de realización, el medio EM1 se usa solo para 1 paso o 1 semana, pero también se prevé que el medio EM1 se pueda usar durante aproximadamente un año porque no es de cultivo para las células. Por lo tanto, en algunas realizaciones, se utiliza un medio EM1 para cultivar células desde el día 0 hasta el día 10, por ejemplo, desde los días 0 a 7, los días 0 a 6, los días 0 a 5, los días 0 a 4, los días 0 a 3, días 0-2, días 0-1, en donde el día 0 es el día en que las células se aíslan de su tejido de origen y el día 1 es el día siguiente o se usa por 1 o más semanas, por ejemplo, 2, 3, 4 o más semanas o 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o más meses. En algunas realizaciones, el medio EM1 se usa solo para el primer día o los dos primeros días de cultivo. En algunas realizaciones, el medio EM1 se usa para 1 o más pasajes, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30 o más pasajes, por ejemplo, 20-30 pasajes. En algunas realizaciones, el medio EM1 se usa después de una etapa de congelación o cualquier otra etapa de transporte que implique un cambio de temperatura o medio que no se combine con el crecimiento óptimo.

[0051] El medio EM1 se complementa con uno o más de los compuestos seleccionados del grupo que consiste en FGF, HGF, nicotinamida, gastrina, B27, N-acetilcisteína y N2. En el caso de comenzar los cultivos a partir de un stock congelado o de una sola célula, el medio EM1 se complementa preferiblemente con un inhibidor de ROCK. Y27632 es el inhibidor de ROCK preferido para uso en la invención.

[0052] Por lo tanto, en una realización, se proporciona un medio de cultivo celular que comprende o consiste en un medio basal para células de animales o humanas a la que se añade: Factor de crecimiento epidérmico, un FGF capaz de unirse a FGFR2 o FGFR4, preferiblemente FGF10 y HGF como factores de crecimiento mitogénico, gastrina, nicotinamida, B27, N2 y N-acetilcisteína, y preferiblemente; un inhibidor de BMP, preferiblemente Noggin; y un agonista de Wnt seleccionado de R-espondina 1, R-espondina 2, R-espondina 3 y R-espondina 4, preferiblemente R-espondina 1, y opcionalmente Wnt-3a.

[0053] B27 (Invitrogen), N-acetilcisteína (Sigma) y N2 (Invitrogen), gastrina (Sigma) y la nicotinamida (Sigma) también se añaden al medio se ha definido anteriormente y se cree que estimulan la proliferación de las células. En el contexto de la invención, la nicotinamida también se denomina en la presente memoria como "Nic".

[0054] El "Suplemento de N2" está disponible en Invitrogen, Carlsbad, CA; www.invitrogen.com; número de catálogo 17502-048; y de PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria; www.paa.com; número de catálogo F005-004; Bottenstein & Sato, PNAS, 76 (1): 514-517, 1979. El suplemento N2 es suministrado por PAA Laboratories GmbH como un concentrado líquido 100x, que contiene 500 µg/ml de transferrina humana, 500 µg/ml de insulina bovina, 0,63 µg/ml de progesterona, 1611 µg/ml de putrescina y 0,52 µg/ml de selenita sódica. El Suplemento de N2 se puede agregar a un medio de cultivo como un concentrado o diluido antes de la adición a un medio de cultivo. Se puede usar en una concentración final de 1x o en otras concentraciones finales. El uso del suplemento N2 es una forma conveniente de incorporar transferrina, insulina, progesterona, putrescina y selenito de sodio en un medio de cultivo de la invención.

[0055] "Suplemento B27" (disponible en Invitrogen, Carlsbad, CA; www.invitrogen.com; actualmente nº de catálogo 17504-044; y desde PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria; www.paa.com; N° de catálogo F01 -002; Brewer et al., J Neurosci Res., 35 (5): 567-76, 1993) se puede usar para formular un medio de cultivo que comprende biotina, colesterol, ácido linoleico, ácido linolénico, progesterona, putrescina, retinol, acetato de retinilo, selenito de sodio, tri-yodotironina (T3), DL-alfa tocoferol (vitamina E), albúmina, insulina y transferrina. El Suplemento B27 es suministrado por PAA Laboratories GmbH como un concentrado líquido 50x, que contiene entre otros ingredientes biotina, colesterol, ácido linoleico, ácido linolénico, progesterona, putrescina, retinol, acetato de retinilo, selenito de sodio, tri-yodotironina (T3), DL-alfa tocoferol (vitamina E), albúmina, insulina y transferrina. De estos ingredientes, al menos el ácido linolénico, el retinol, el acetato de retinilo y la tri-yodotironina (T3) son agonistas de los receptores de hormonas nucleares. El Suplemento B27 se puede agregar a un medio de cultivo como un concentrado o diluido antes de la adición a un medio de cultivo. Se puede usar en una concentración final de 1x o en otras concentraciones finales. El uso del Suplemento B27 es una forma conveniente de incorporar biotina, colesterol, ácido linoleico, ácido linolénico, progesterona, proteína, retinol, acetato de retinilo, selenito de sodio, tri-yodotironina (T3), DL-alfa tocoferol (vitamina E), albúmina, insulina y transferrina en un medio de cultivo de la invención.

65 Inhibidores de BMP

[0056] Un componente que se añade preferiblemente al medio de cultivo basal es un inhibidor de BMP. Las BMP se unen como un ligando dimérico a un complejo receptor que consiste en dos receptores serina/treonina quinasas diferentes, receptores tipo I y tipo II. El receptor tipo II fosforila el receptor tipo I, lo que resulta en la activación de esta quinasa receptora. El receptor tipo I posteriormente fosforila los sustratos de receptores específicos (SMAD), lo que resulta en una vía de transducción de señales que conduce a la actividad transcripcional.

[0057] Un inhibidor BMP se define como un agente que se une a una molécula de BMP para formar un complejo en el que se neutraliza la actividad BMP, por ejemplo, mediante la prevención o inhibición de la unión de la molécula de BMP a un receptor BMP. Alternativamente, dicho inhibidor es un agente que actúa como antagonista o agonista inverso. Este tipo de inhibidor se une con un receptor de BMP y evita la unión de un BMP a dicho receptor. Un ejemplo de un último agente es un anticuerpo que se une a un receptor de BMP y evita la unión de BMP al receptor unido a anticuerpo.

[0058] Un inhibidor de BMP se puede añadir a los medios de comunicación en una cantidad eficaz para inhibir una actividad dependiente de BMP en una célula a un máximo de 90%, más preferiblemente a lo sumo 80%, más preferiblemente a lo sumo 70%, más preferiblemente a lo sumo 50%, más preferido a lo sumo 30%, más preferido a lo sumo 10%, más preferido 0%, en relación con un nivel de actividad de BMP en ausencia de dicho inhibidor, según se evalúa en el mismo tipo de célula. Como es sabido por un experto, una actividad de BMP puede determinarse midiendo la actividad transcripcional de BMP, por ejemplo, como se ejemplifica en Zilberberg et al., 2007. BMC Cell Biol. 8:41.

[0059] Se conocen varias clases de proteínas naturales de unión a BMP, incluyendo Noggin (Peprotech), cordina y proteínas similares a cordina (R & D systems) que comprenden dominios cordina, folistatina y proteínas relacionadas con la folistatina (R & D Systems) que comprende un dominio de folistatina, DAN y proteínas similares a DAN (R & D Systems) que comprenden un dominio de nudo de cisteína DAN, esclerostina/SOST (R & D Systems), decorina (R & D Systems) y macroglobulina alfa-2 (R & D Systems).

[0060] Un inhibidor de BMP preferido para uso en un método de la invención se selecciona de Noggin, DAN, y las proteínas de tipo DAN incluyendo Cerberus y (R & D systems) Gremlin. Estas proteínas difusibles son capaces de unirse a un ligando BMP con diversos grados de afinidad e inhibir su acceso a los receptores de señalización. La adición de cualquiera de estos inhibidores de BMP al medio de cultivo basal evita la pérdida de células madre.

[0061] Un inhibidor de BMP preferido es Noggin. En el contexto de un medio de cultivo de la invención, Noggin también se denomina en este documento como "N". Preferiblemente, se agrega Noggin al medio de cultivo basal a una concentración de al menos 10 ng/ml, más preferiblemente al menos 20 ng/ml, más preferido al menos 50 ng/ml, más preferido al menos 100 ng/ml. Una concentración aún más preferida es aproximadamente 100 ng/ml o exactamente 100 ng/ml. Durante el cultivo de células madre, dicho inhibidor de BMP se puede agregar al medio de cultivo cuando sea necesario, por ejemplo, diariamente o cada dos días. El inhibidor de BMP se agrega preferiblemente al medio de cultivo cada dos días. El medio de cultivo puede refrescarse cuando sea necesario, por ejemplo, diariamente o cada dos días, aunque es preferible que se actualice cada cuatro días.

Agonistas de Wnt

[0062] Un componente adicional que se añade al medio de cultivo basal es un agonista Wnt. En el contexto de un medio de cultivo de la invención, el agonista de Wnt también se denomina en este documento "W". La vía de señalización de Wnt se define por una serie de eventos que ocurren cuando una proteína Wnt se une a un receptor de la superficie celular de un miembro de la familia del receptor Frizzled. Esto resulta en la activación de proteínas de la familia dishevel que inhiben un complejo de proteínas que incluye axina, GSK-3 y la proteína APC para degradar la β -catenina intracelular. La β -catenina nuclear enriquecida resultante mejora la transcripción por los factores de transcripción de la familia TCF/LEF.

[0063] Un agonista Wnt se define como un agente que activa la transcripción mediada por LEF TCF/en una célula. Por lo tanto, los agonistas de Wnt se seleccionan entre los verdaderos agonistas de Wnt que se unen y activan un miembro de la familia del receptor Frizzled, que incluye cualquiera y todas las proteínas de la familia Wnt, un inhibidor de la degradación de la β -catenina intracelular y activadores de TCF/LEF. Dicho agonista de Wnt se agrega a los medios en una cantidad eficaz para estimular una actividad de Wnt en una célula en al menos un 10%, más preferiblemente al menos un 20%, más preferido al menos un 30%, más preferido al menos un 50%, más preferido en menos el 70%, más preferido al menos el 90%, más preferido al menos el 100%, en relación con un nivel de dicha actividad Wnt en ausencia de dicha molécula, según se evalúa en el mismo tipo de célula. Como es conocido por un experto, la actividad de Wnt puede determinarse midiendo la actividad transcripcional de Wnt, por ejemplo, mediante constructos informadores de luciferasa pTOPFLASH y pFOPFLASH (PCcinek et al., 1997. Science 275: 1784-1787).

[0064] Un agonista Wnt puede comprender una glicoproteína secretada incluyendo Wnt-1/Int-1; Wnt-2/Irp (proteína relacionada con Int-1); Wnt-2b/13; Wnt-3/Int-4; Wnt-3a (R & D systems); Wnt-4; Wnt-5a; Wnt-5b; Wnt-6 (Kirikoshi H et al. 2001. Biochem Biophys Res Com 283: 798-805); Wnt-7a (R & D systems); Wnt-7b; Wnt-8a/8d; Wnt-8b; Wnt-9a/14;

Wnt-9b/14b/15; Wnt-10a; Wnt-10b/12; Wnt-11; y Wnt-16. Se proporciona una descripción general de las proteínas Wnt humanas en "LA FAMILIA DE PROTEÍNAS SECRETAS DE WNT", Catálogo de R & D systems, 2004.

[0065] Otros agonistas de Wnt incluyen la familia R-espondina de proteínas secretadas, que está implicada en la activación y regulación de la vía de señalización Wnt y que se compone de 4 miembros (R-espondina 1 (NU206, Nuvelo, San Carlos, CA), R-espondina 2 (R & D systems), R-espondina 3 y R-espondina-4) y Norrin (también llamada Norrie Disease Protein o NDP) (R&D systems), que es una proteína reguladora secretada que funciona como una proteína Wnt en que se une con alta afinidad al receptor Frizzled-4 e induce la activación de la vía de señalización Wnt (Kestutis Planutis et al. (2007) BMC Cell Biol. 8: 12).

[0066] Los compuestos que imitan la actividad de R-espondina se pueden utilizar como agonistas de Wnt de la invención. Recientemente se ha encontrado que R-espondina interactúa con Lgr5. Por lo tanto, los agonistas de Lgr5, tales como los anticuerpos agonistas anti-Lgr5, son ejemplos de agonistas de Wnt que pueden usarse en la invención.

[0067] En el contexto de un medio de cultivo de la invención, R-espondina también se denomina aquí como "R".

[0068] Un agonista de molécula pequeña de la vía de señalización Wnt, un derivado de aminopirimidina, se identificó recientemente y también se incluye expresamente como agonista de Wnt (Liu et al. (2005) Angew Chem Int Ed. Engl. 44, 1987-90).

[0069] Inhibidores GSK conocidos comprenden interferentes pequeños ARN (ARNsi; Cell Signaling), litio (Sigma), kenpaulona (Biomol Internacional; Leost, M. et al (2000) Eur J. Biochem 267, 5983 a 5994), 6-Bromindirubin-30-acetoxima (Meijer, L. et al. (2003) Chem. Biol. 10, 1255-1266), SB 216763 y SB 415286 (Sigma-Aldrich), y miembros de la familia FRAT y péptidos FRAT derivados que impiden la interacción de GSK-3 con axina. Meijer et al. (2004) Trends in Pharmacological Sciences 25, 471-480 proporcionan una descripción general. Los métodos y ensayos para determinar un nivel de inhibición de GSK-3 son conocidos por un experto y comprenden, por ejemplo, los métodos y ensayos descritos en Liao et al 2004, Endocrinology, 145 (6): 2941-9).

[0070] En una realización preferida, dicho agonista Wnt se selecciona de uno o más de una R-espondina 1-4 (por ejemplo, R-espondina 1 o R-espondina 4), y opcionalmente comprende además un miembro de la familia Wnt, Norrina, y/o un inhibidor de GSK. Los inventores descubrieron que la adición de al menos un agonista de Wnt al medio de cultivo basal es importante para la proliferación de las células madre epiteliales del hígado o el conducto biliar aislado o fragmentos de hígado aislados.

[0071] En una realización preferida adicional, dicho agonista Wnt comprende o consiste en R-espondina 1. R-espondina 1 se añade preferiblemente al medio de cultivo basal a una concentración de al menos 200 ng/ml, más preferido al menos 300 ng/ml, más preferido al menos 500 ng/ml. Una concentración aún más preferida de R-espondina 1 es aproximadamente 500 ng/ml o exactamente 500 ng/ml. Durante el cultivo de células madre, dicho miembro de la familia Wnt puede agregarse al medio de cultivo cuando sea necesario, por ejemplo, diariamente o cada dos días. El miembro de la familia Wnt se agrega preferiblemente al medio de cultivo cada dos días. El medio de cultivo puede refrescarse cuando sea necesario, por ejemplo, diariamente o cada dos días, aunque es preferible que se actualice cada cuatro días.

[0072] En una realización preferida, un agonista de Wnt se selecciona del grupo que consiste en: R-espondina, Wnt-3a y Wnt-6. Más preferiblemente, R-espondina y Wnt-3a se usan como agonistas de Wnt. Esta combinación es particularmente preferida ya que esta combinación tiene sorprendentemente un efecto sinérgico en la formación de organoides. Las concentraciones preferidas son 1-500 ng/ml, por ejemplo, 1-10 ng/ml, 10-100 ng/ml, 1-50 ng/ml, 10-200 ng/ml, 200 a 500 ng/ml, 30 ng/ml para R-espondina y de 100 ng/ml a 1000 ng/ml, por ejemplo, 100 ng/ml o 1000 ng/ml para Wnt3a.

[0073] Un agonista Wnt es preferiblemente un ligando Wnt, tal como por ejemplo Wnt3a, y puede ser recién añadido a un medio de cultivo. Alternativamente, un ligando Wnt se expresa en una línea celular transfectando o infectando una línea celular con un constructo de expresión adecuado que expresa dicho ligando Wnt. Dicha línea celular se cultiva y el medio de cultivo que comprende el ligando Wnt secretado se recolecta en intervalos de tiempo adecuados. Por ejemplo, las células producirán Wnt3a tan pronto como alcancen la confluencia y dejen de crecer. El medio de cultivo de células que no fueron transfectadas o infectadas con dicho constructo de expresión se usa como control. El medio condicionado se recolecta y se ensaya, por ejemplo, en un ensayo en el que la expresión de luciferasa se controla mediante elementos sensibles a TCF para ensayar la presencia de un agonista de Wnt como Wnt3a (Korinek et al., 1997. Science 275: 1784-1787). El medio se diluye cuando se usa en los cultivos para regenerar tejido. Como saben los expertos, la adición de un exceso de ligando Wnt a veces es tan perjudicial para el cultivo como la adición de un ligando Wnt demasiado pequeño. Por lo tanto, la dilución real del medio condicionado dependerá de la cantidad de ligando Wnt que se determine en la prueba.

Factores de crecimiento mitogénico

[0074] Sin embargo, un componente adicional que se añade al medio de cultivo basal es una combinación de factores de crecimiento mitogénicos, incluyendo el factor de crecimiento epidérmico (EGF; (preferiblemente de Peprotech), un factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) capaz de unirse a FGFR2 o FGFR4 y, opcionalmente, factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) (también preferiblemente de Peprotech). Un FGF capaz de unirse a FGFR2 (receptor de FGF) o FGFR4 es preferiblemente FGF4, FGF7 o FGF10 (preferiblemente de Peprotech), más preferiblemente FGF10. Se utilizan EGF, un FGF y HGF. En el contexto de un medio de cultivo de la invención, EGF también se denomina en este documento como "E", FGF también se conoce en este documento como "F" y HGF también se denomina en este documento "H". EGF es un potente factor mitogénico para una variedad de células ectodérmicas y mesodérmicas cultivadas y tiene un profundo efecto en la diferenciación de células específicas *in vivo* e *in vitro* y de algunos fibroblastos en cultivo celular. El precursor de EGF existe como membrana de molécula unida que es escindida proteolíticamente para generar la hormona peptídica de 53 aminoácidos que estimula las células. EGF ejerce sus efectos en las células diana al unirse a la membrana plasmática ubicada en el receptor de EGF. El receptor de EGF es una proteína transmembrana tirosina quinasa. La unión de EGF al receptor provoca la activación de la quinasa y posteriormente la autofosforilación del receptor. La autofosforilación es esencial para la interacción del receptor con sus sustratos. Las vías de transducción de señales activadas por EGF incluyen la vía del fosfatidilinositol, que conduce a la activación de la proteína quinasa C y al aumento de la concentración de Ca²⁺ intracelular, y a la vía de ras que conduce a la activación de la MAP quinasa. Estas vías participan en la regulación de la proliferación, diferenciación y supervivencia celular (Herbst, 2004, Int Journal of radiation oncology, 59, 2, S21-S26).

[0075] El EGF se añade preferiblemente al medio de cultivo basal en una concentración de entre 5 y 500 ng/ml o de al menos 5 y no superior a 500 ng/ml. Una concentración preferida es al menos 10, 20, 25, 30, 40, 45 o 50 ng/ml y no superior a 500, 450, 400, 350, 300, 250, 200, 150 o 100 ng/ml. Una concentración más preferida es al menos 50 y no superior a 100 ng/ml. Una concentración aún más preferida es de aproximadamente 50 ng/ml o 50 ng/ml.

[0076] El FGF10 es una proteína que pertenece a la familia de proteínas del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF). Los miembros de la familia FGF poseen amplias actividades mitogénicas y de supervivencia celular, y están involucrados en una variedad de procesos biológicos, que incluyen el desarrollo embrionario, el crecimiento celular, la morfogénesis, la reparación de tejidos, el crecimiento de tumores y la invasión. Los FGF estimulan las células interactuando con los receptores de tirosina quinasa de la superficie celular (FGFR). Se han identificado cuatro receptores estrechamente relacionados (FGFR1-FGFR4). Se ha demostrado que los genes FGFR1-FGFR3 codifican múltiples isoformas, y estas isoformas pueden ser críticas para determinar la especificidad del ligando. La mayoría de los FGF se unen a más de un receptor (Ornitz J Biol Chem. 1998, 27 de febrero; 273 (9): 5349-57). Sin embargo, FGF10 y FGF7 son únicos entre los FGF, ya que interactúan solo con una isoforma específica de FGFR2, denominada FGFR2b que se expresa exclusivamente por las células epiteliales (Igarashi, J Biol Chem. 1998 273 (21): 13230-5). FGF10 es un FGF preferido capaz de unirse a FGFR2 o FGFR4.

[0077] El factor de crecimiento de hepatocitos/factor de dispersión (HGF/SF) es un factor morfogénico que regula el crecimiento celular, la motilidad celular y la morfogénesis mediante la activación de una cascada de señalización de tirosina quinasa después de la unión al receptor proto-oncogénico de c-Met.

[0078] Las mismas concentraciones se pueden usar para FGF10 y HGF. Las concentraciones preferidas para FGF10 son 20, 50, 100, 500 ng/ml, no más de 500ng/ml. Las concentraciones preferidas para HGF son 1, 10, 20, 50 ng/ml, no más altas que 50ng/ml. Durante el cultivo de células madre, dicha combinación de factores de crecimiento mitogénicos (es decir, EGF, FGF10 y HGF) se agrega preferiblemente al medio de cultivo cuando sea necesario, por ejemplo, diariamente o cada dos días. Es preferible que se agregue cada dos días. El medio de cultivo puede refrescarse cuando sea necesario, por ejemplo, diariamente o cada dos días, aunque es preferible que se actualice cada cuatro días.

[0079] En algunas realizaciones, un inhibidor de TGF-beta tales como A83-01 es, además, presente en el medio EM1. Esto es particularmente útil cuando se cultivan células u organoides humanos. En algunas realizaciones, el A83-01 está presente en una concentración de entre 400-600 nM, por ejemplo, 450-550 nM, 470-530 nM o aproximadamente 500 nM. En las realizaciones en las que un inhibidor de TGF-beta está presente en EM1, preferiblemente no está presente un inhibidor de Notch.

Medios de expansión preferidos de la invención

[0080] Medios de comunicación y métodos de uso de estos cultivos preferidos se describen en los Ejemplos.

[0081] Por ejemplo, un medio de cultivo celular puede comprender o consistir en un medio basal al que se añade: EGF y R-espondina 1 suplementada con FGF10, HGF y nicotinamida; por ejemplo, EGF (50 ng/ml) y R-espondina 1 (lug/ml) suplementado con FGF10 (100 ng/ml), HGF (25-50 ng/ml) y nicotinamida (1-10 mM). Los inventores han descubierto que este medio es preferible para la expansión a largo plazo de las células. Por lo tanto, este medio de cultivo celular se prefiere para uso como un EM2 de la invención. El medio basal se complementa preferiblemente con B27, N2 y 200 ng/ml de N-acetilcisteína. En algunas realizaciones, el medio basal es DMEM/F12 avanzado. Sin embargo, se puede usar cualquier otro medio basal adecuado.

[0082] Otro medio de cultivo celular preferido, y método de uso de este medio, se describe en los ejemplos, y comprende o consiste en DMEM/F12 avanzado preferiblemente suplementado con B27, N2, 200 ng/ml de N-acetilcisteína, 50 ng/ml de EGF, 1 µg/ml R-espondina1, gastrina 10 nM, 100 ng/ml FGF10, nicotinamida 10 mM y 50 ng/ml de HGF y 50% de Wnt en medio condicionado y, preferiblemente 10-100 ng/ml de Noggin. Los medios condicionados de Wnt comprenden Advanced DMEM, P/S, B27, N2 y también FCS. Las células 293T transfectadas con el plásmido de expresión Wnt3A producen Wnt. Se toma todo el medio después de unos días (es decir, con Wnt secretado) y se utiliza como fuente Wnt.

[0083] La invención proporciona por lo tanto un medio de cultivo celular, que comprende o que consiste en un medio basal para células de animales o humanas al que se añade:

Factor de crecimiento epidérmico, un FGF capaz de unirse a FGFR2 o FGFR4, preferiblemente FGF10 y HGF como factores de crecimiento mitogénicos,

gastrina, nicotinamida, B27, N2 y N-acetilcisteína, y preferiblemente

un inhibidor de BMP más preferiblemente Noggin y

un agonista de Wnt seleccionado de R-espondina 1, R-espondina 2, R-espondina 3 y R-espondina 4, más preferiblemente R-espondina 1, y opcionalmente Wnt-3a.

[0084] La invención así abarca un primer medio de cultivo preferido que comprende o consiste en un medio basal para células de animales o humanas a las que se añade:

Factor de crecimiento epidérmico, FGF10 y HGF como factores de crecimiento mitogénicos,

gastrina, nicotinamida, B27, N2 y N-acetilcisteína,

un inhibidor de BMP más preferiblemente Noggin y

un agonista de Wnt seleccionó R-espondina 1, R-espondina 2, R-espondina 3 y R-espondina 4, comprendiendo más preferiblemente R-espondina 1 y Wnt-3a.

[0085] Este medio puede ser usado como un medio de cultivo celular EM1 de la invención para estimular la expansión inicial de las células.

[0086] En algunas realizaciones, el medio usado como un medio de cultivo celular EM1 comprende todos los componentes de un medio de cultivo EM2 de la invención y además comprende Wnt-3a y Noggin.

[0087] En realizaciones en las que el medio basal se complementa con N-acetilcisteína, B27 y N2, los siguientes se añaden preferiblemente al medio de cultivo: EGF, R-espondina1, gastrina, FGF10, nicotinamida y HGF y medios condicionados Wnt. Preferiblemente, el medio basal se complementa con N-Acetilcisteína, EGF, R-espondina1, gastrina, FGF10, Nicotinamida y HGF y medios acondicionados con Wnt de acuerdo con las cantidades descritas anteriormente.

[0088] Por ejemplo, en algunas formas de realización el medio basal puede ser suplementado con 150 ng/ml a 250 ng/ml N-acetilcisteína; preferiblemente, el medio basal se complementa con, aproximadamente o exactamente 200 ng/ml de N-acetilcisteína. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el medio basal puede complementarse con 40 ng/ml a 60 ng/ml de EGF; preferiblemente, el medio basal se complementa con aproximadamente o exactamente 50 ng/ml de EGF. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el medio basal puede complementarse con 0,5 µg/ml a 1,5 µg/ml R-espondina1; preferiblemente, el medio basal se complementa con aproximadamente o exactamente 1 µg/ml de R-espondina1. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el medio basal puede complementarse con gastrina de 5 nM a 15 nM; preferiblemente, el medio basal se complementa con aproximadamente o exactamente 10 nM de gastrina. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el medio basal puede complementarse con 25-200 ng/ml de FGF10, por ejemplo, de 70 ng/ml a 130 ng/ml de FGF10; preferiblemente, el medio basal se complementa con aproximadamente o exactamente 100 ng/ml de FGF10. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el medio basal puede complementarse con nicotinamida de 5 mM a 15 mM; preferiblemente, el medio basal se complementa con aproximadamente o exactamente 10 mM de nicotinamida. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el medio basal puede complementarse con 25 ng/ml a 100 ng/ml de HGF, por ejemplo, 35 ng/ml a 65 ng/ml de HGF; preferiblemente, el medio basal se complementa con aproximadamente o exactamente y 50 ng/ml de HGF. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el medio basal puede complementarse con 35% a 65% de medios condicionados con Wnt; preferiblemente, el medio basal se complementa con aproximadamente o exactamente el 50% de medios acondicionados con Wnt.

[0089] En algunas realizaciones uno o ambos de gastrina y N2 no están presentes en el medio de cultivo celular.

[0090] Preferiblemente, el medio basal es avanzado-DMEM/F12.

5 [0091] Este primer medio de cultivo (por ejemplo, EM1, EM2 o ambos EM1 y EM2) se utiliza preferentemente durante las dos primeras semanas del método de cultivo de la invención. Sin embargo, se puede usar durante un período de tiempo más corto, como por ejemplo 1, 2, 3, 5, 7 o 10 días, o un período de tiempo más largo, como 3, 4, 5, 10, 20 o más semanas. 5 meses o más, por ejemplo, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 meses o más.

10 Medio de diferenciación (DM):

[0092] En algunas realizaciones, el método de la invención implica un segundo medio de cultivo de células que comprende o consiste en un medio basal para células animales o humanas al que se agrega: EGF, un inhibidor de TGF-beta y un inhibidor de Notch. Los inventores han descubierto que este medio es útil para diferenciar células. El medio utilizado para diferenciar las células puede denominarse en el presente documento como DM.

[0093] Preferiblemente, el segundo medio de cultivo celular también comprende FGF y/o HGF.

20 [0094] En una realización, el segundo medio de cultivo comprende o consiste en un medio basal para células animales o humanas a las que se agrega:

factor de crecimiento epidérmico, FGF10 y HGF como factores de crecimiento mitogénicos;

un inhibidor de Notch; y

un inhibidor de TGF-beta.

[0095] En una realización, el inhibidor de TGF-beta es A83-01 y/o el inhibidor de Notch es DAPT. En otra realización, el medio de cultivo celular de DM comprende adicionalmente Dexametasona.

[0096] Un segundo medio de cultivo celular preferido, y método de uso de este medio, se describe en los ejemplos, y comprende o consiste en un medio basal al que se añade: 50 ng/ml de EGF, 100 FGF10 ng/ml, 50 nM A8301 y 10 uM DAPT. DMEM/F12 avanzado se puede usar como medio basal como puede ser cualquier otro medio basal adecuado.

[0097] En algunas realizaciones, el segundo medio de cultivo celular no comprende R-espondina o Wnt. En algunas realizaciones, el segundo medio de cultivo celular no comprende un agonista de Wnt. En algunas realizaciones, el segundo medio de cultivo celular no comprende nicotinamida. En algunas realizaciones, el segundo medio de cultivo celular no comprende un inhibidor de BMP.

[0098] Los inventores han descubierto que R-espondina1 y nicotinamida tanto inhiben la expresión del marcador maduro Cyp3a11 de hepatocitos y, sin embargo promueven la expresión de la albúmina de marcador de hepatoblasto. Por lo tanto, para aumentar la diferenciación de las células a destinos de hígado más maduros, los inventores eliminaron R-espondina y nicotinamida del cultivo celular. Los inventores también han descubierto que la expresión de factores de transcripción biliar específicos está altamente regulada al alza en los cultivos de expansión que contienen R-espondina1, lo que indica que la expresión del gen de cultivo fue desequilibrada hacia un destino celular más biliar. Notch y las rutas de señalización de TGF-beta se han implicado en el destino de las células biliares *in vivo*. De hecho, la eliminación de Rbpj (esencial para lograr una señalización activa de Notch) da como resultado una tubulogénesis anormal (Zong Y. Development 2009) y la adición de TGF-beta a los explantes de hígado facilita la diferenciación biliar *in vitro* (Clotman F. Genes and Development 2005). Dado que tanto la vía de señalización de Notch como la de TGF-beta estaban altamente reguladas en los cultivos de hígado (Figura 9), los inventores razonaron que la inhibición del destino de las células biliares podría desencadenar la diferenciación de las células hacia un fenotipo más hepatocítico. Se encontró que la adición de un inhibidor de TGF-beta (como A8301) y un inhibidor de Notch (como DAPT) a un medio de diferenciación que preferiblemente no contiene R-espondina o Wnt, aumenta la expresión de marcadores de hepatocitos maduros y aumenta el número de células similares a hepatocitos (por ejemplo, ver ejemplo 2).

[0099] Notch es un receptor de superficie de transmembrana que se puede activar a través de múltiples escisiones proteolíticas, siendo una de ellas la escisión por un complejo de proteínas con actividad de proteasa, denominada gamma-secretasa. La gamma-secretasa es una proteasa que realiza su actividad de escisión dentro de la membrana. La gamma-secretasa es una enzima multicomponente y está compuesta de al menos cuatro proteínas diferentes, a saber, presenilinas (presenilina 1 o 2), nicastrina, PEN-2 y APH-I. La presenilina es el centro catalítico de la gamma-secretasa. En la unión del ligando, el receptor Notch sufre un cambio conformacional que permite que el ectodominio se desprenda a través de la acción de una proteasa ADAM que es una metaloproteasa. Esto es seguido inmediatamente por la acción del complejo gamma-secretasa que resulta en la liberación del dominio intracelular Notch

(NICD). La NICD se traslada al núcleo en el que interactúa con CSL (factor de unión al promotor C/proteína de unión a la secuencia de señal recombinante Jk/Suppressor-of-Hairless/Lagl). La unión de NICD convierte CSL de un represor transcripcional a un activador que resulta en la expresión de los genes diana de Notch. Ejemplos de inhibidores de Notch preferidos que se pueden usar en el contexto de esta invención son: inhibidores de gamma-secretasa, tales como DAPT o dibenzazepina (DBZ) o benzodiazepina (BZ) o LY-411575, un inhibidor capaz de disminuir la activación mediada por ligandos de Notch (por ejemplo, mediante un ligando negativo dominante de Notch o mediante un Notch negativo dominante o mediante un anticuerpo capaz de al menos en parte bloquear la interacción entre un ligando de Notch y Notch), o un inhibidor de las proteasas ADAM.

[0100] La señalización de TGF-beta está implicada en muchas funciones celulares, incluido el crecimiento celular, el destino celular y la apoptosis. La separación típicamente comienza con la unión de un ligando de la superfamilia de TGF-beta a un receptor de tipo II que recluta y fosforila un receptor de tipo I. El receptor tipo I luego fosforila las SMAD, que actúan como factores de transcripción en el núcleo y regulan la expresión del gen diana. Alternativamente, la señalización de TGF-beta puede activar las vías de señalización de la MAP quinasa, por ejemplo, a través de la p38 MAP quinasa. Los ligandos de la superfamilia de TGF-beta comprenden proteínas morfogénicas óseas (BMP), factores de crecimiento y diferenciación (GDF), hormona anti-mülleriana (AMH), activina, nodal y TGF-betas.

[0101] Un inhibidor de TGF-beta es un agente que reduce la actividad de la vía de señalización de TGF-beta. Existen muchas formas de interrumpir la vía de señalización de TGF-beta que se conocen en la técnica y que se pueden usar junto con esta invención. Por ejemplo, la señalización de TGF-beta puede verse interrumpida por: la inhibición de la expresión de TGF-beta por una pequeña estrategia de ARN interferente; inhibición de furina (una proteasa activadora de TGF-beta); inhibición de la ruta por inhibidores fisiológicos, como la inhibición de BMP por proteínas similares a Noggin, DAN o DAN; neutralización de TGF-beta con un anticuerpo monoclonal; inhibición con inhibidores de molécula pequeña del receptor de quinasa TGF-beta 1 (también conocida como quinasa similar al receptor de activina, ALK5), ALK4, ALK6, ALK7 u otras quinasas receptoras relacionadas con TGF-beta; inhibición de la señalización de Smad 2 y Smad 3 mediante la sobreexpresión de su inhibidor fisiológico, Smad 7, o mediante el uso de tioredoxina como un Smad que desactiva la activación de Smad (Fuchs, O. Inhibición de la señalización de TGF para el tratamiento de metástasis tumoral y enfermedades fibróticas). Terapia de transducción de señal actual, volumen 6, número 1, enero de 2011, págs. 29-43 (15)).

[0102] Se conocen varios métodos para determinar si una sustancia es un inhibidor de TGF-beta y podrían usarse en conjunción con la invención. Por ejemplo, se puede usar un ensayo celular en el que las células se transfectan de manera estable con una construcción informadora que comprende el promotor PAI-1 humano o los sitios de unión de Smad, lo que conduce a un gen indicador de luciferasa. La inhibición de la actividad de la luciferasa en relación con los grupos de control se puede usar como una medida de la actividad del compuesto (De Gouville et al., Br J Pharmacol. 2005 Mayo; 145 (2): 166-177).

[0103] Un inhibidor de TGF-beta según la presente invención puede ser una proteína, péptido, moléculas pequeñas, ARN pequeñas interferentes, oligonucleótido antisentido, aptámero o anticuerpo. El inhibidor puede ser natural o sintético. Los ejemplos de inhibidores de TGF-beta de molécula pequeña preferidos que se pueden usar en el contexto de esta invención incluyen los inhibidores de molécula pequeña enumerados en la tabla 1:

Tabla 1: Inhibidores de TGF-beta de molécula pequeña que se dirigen a las quinasas receptoras

Inhibidor	Dianas	CI50 (nM)	Peso Mol	Nombre	Fórmula
A83-01	ALK5 (TGF- β R1)	12	421,52	3-(6-Metil-2-piridinil)-N-fenil-4-(4-quinolinil)-1H-pirazol-1-carbotioamida	C25H19N5S
	ALK4	45			
	ALK7	7.5			
SB-431542	ALK5	94	384,39	4-[4-(1,3-benzodioxol-5-il)-5-(2-piridinil)-1H-imidazol-2-il]benzamida	C22H16N4O3
	ALK4				
	ALK7				
SB-505124	ALK5	47	335,4	Hidrato de hidrocloreto de 2-(5-benzo[1,3]dioxol-5-il-2-terc-butil-3Himidazol-4-il)-6-metilpiridina	C20H21N3O2
	ALK4	129			
SB-525334	ALK5	14.3	343,42	6-[2-(1,1-Dimetiletil)-5-(6-metil-2-piridinil)-1H-imidazol-4-il] quinoxalina	C21H21N5
SD-208	ALK5	49	352,75	2-(5-cloro-2-fluorofenil)-4-[(4-piridil)amino]pteridina	C17H10C1FN6
LY-36494	TGR- β RI	59	272,31	4-[3-(2-Piridinil)-1H-pirazol-4-il]-quinolina	C17H12N4
	TGF- β RII	400			
	MLK-7K	1400			
SJN-2511	ALK5	23	287,32	2-(3-(6-metilpiridina-2-il)-1H-pirazol-4-il)-1,5-naftiridina	C17H13N5

[0104] Un método de la invención puede comprender el uso de uno o más de cualquiera de los inhibidores indicados en la tabla 1. Un método de la invención puede comprender el uso de cualquier combinación de un inhibidor con otro inhibidor enumerado. Por ejemplo, un método de la invención puede comprender el uso de SB-525334 o SD-208 o A83-01; o un método de la invención puede comprender el uso de SD-208 y A83-01; o un método de la invención puede comprender el uso de SD-208 y A83-01. La persona experta apreciará que existen otros inhibidores de moléculas pequeñas que están diseñados principalmente para atacar a otras quinasas, pero a altas concentraciones también pueden inhibir las quinasas receptoras de TGF-beta. Por ejemplo, el SB-203580 es un inhibidor de la p38 MAP quinasa que, en concentraciones altas (por ejemplo, aproximadamente 10 μ M o más) se cree que inhibe ALK5. Cualquier inhibidor que inhiba la vía de señalización de TGF-beta también se puede usar en el contexto de esta invención.

[0105] A83-01 puede añadirse al medio de cultivo a una concentración de entre 10 nM y 10 μ M, o entre 20 nM y 5 μ M, o entre 50 nM y 1 μ M. Por ejemplo, A83-01 se puede agregar al medio de cultivo a aproximadamente 500 nM. Cuando se usa en una EM, se puede agregar A83-01 al medio de cultivo a una concentración de entre 350-650 nM, por ejemplo, 450-550 nM, más preferiblemente aproximadamente 500 nM. Cuando se utiliza en la DM, se puede agregar A83-01 al medio de cultivo en una concentración de entre 25 y 75 nM, por ejemplo, 40 a 60 nM o aproximadamente 50 nM.

[0106] El SB-431542 se puede agregar al medio de cultivo a una concentración de entre 80 nM y 80 μ M, o entre 100 nM y 40 μ M, o entre 500 nM y 10 μ M. Por ejemplo, SB-431542 se puede agregar al medio de cultivo a aproximadamente 1 μ M.

[0107] El SB-505124 se puede agregar al medio de cultivo a una concentración de entre 40 nM y 40 μ M, o entre 80 nM y 20 μ M, o entre 200 nM y 1 μ M. Por ejemplo, SB-505124 se puede agregar al medio de cultivo a aproximadamente 500 nM.

[0108] El SB-525334 se puede agregar al medio de cultivo a una concentración de entre 10 nM y 10 μ M, o entre 20 nM y 5 μ M, o entre 50 nM y 1 μ M. Por ejemplo, SB-525334 se puede agregar al medio de cultivo a aproximadamente 100 nM.

[0109] LY 364947 se puede agregar al medio de cultivo a una concentración de entre 40 nM y 40 μ M, o entre 80 nM y 20 μ M, o entre 200 nM y 1 μ M. Por ejemplo, LY 364947 se puede agregar al medio de cultivo a aproximadamente 500 nM.

[0110] El SD-208 se puede agregar al medio de cultivo a una concentración de entre 40 nM y 40 μ M, o entre 80 nM y 20 μ M, o entre 200 nM y 1 μ M. Por ejemplo, SD-208 se puede agregar al medio de cultivo a aproximadamente 500

nM.

[0111] El SJN 2511 se puede agregar al medio de cultivo a una concentración de entre 20 nM y 20 uM, o entre 40 nM y 10 uM, o entre 100 nM y 1 uM. Por ejemplo, A83-01 se puede agregar al medio de cultivo a aproximadamente 200 nM.

[0112] En un aspecto adicional, la invención implica un segundo medio de cultivo alternativo que comprende o que consiste en un medio basal para células de animales o humanas a la que se añade:

Factor de crecimiento epidérmico, FGF10 y HGF como factores de crecimiento mitogénicos;

Gastrina, nicotinamida, B27, N2 y N-acetilcisteína.

[0113] Este segundo medio de cultivo alternativo es útil como un medio de diferenciación (DM). Este segundo medio de cultivo alternativo se usa preferiblemente después de las dos primeras semanas de cultivo. En esta etapa, parece que ya no se necesitan un inhibidor de BMP y un ligando Wnt. Por lo tanto, en algunas realizaciones, el segundo medio de cultivo alternativo no comprende un inhibidor de BMP o un ligando de Wnt. En algunas realizaciones, el segundo medio de cultivo alternativo no comprende un inhibidor de BMP o un agonista de Wnt.

[0114] Al igual que con el primer medio de cultivo (EM, es decir, EM1 y EM2 o EM1 o EM2), el medio basal puede en algunas realizaciones puede complementar con N-acetilcisteína, EGF, gastrina, FGF10, nicotinamida y HGF de acuerdo con las cantidades descrito anteriormente en este documento. Por ejemplo, preferiblemente, el medio basal se complementa con aproximadamente o exactamente 200 ng/ml de N-acetilcisteína. Preferiblemente, el medio basal se complementa con aproximadamente o exactamente 50 ng/ml de EGF. Preferiblemente, el medio basal se complementa con aproximadamente o exactamente 10 nM de gastrina. Preferiblemente, el medio basal se complementa con aproximadamente o exactamente 100 ng/ml de FGF10. Preferiblemente, el medio basal se complementa con aproximadamente o exactamente 10 mM de nicotinamida. Preferiblemente, el medio basal se complementa con aproximadamente o exactamente HGF de 50 ng/ml.

[0115] Un primer y un segundo medio de cultivo celular usado de acuerdo con la invención permite la supervivencia y/o proliferación y/o diferenciación de células epiteliales madre o células madre epiteliales del hígado o del conducto biliar aislados o los fragmentos de hígado aisladas en una matriz extracelular.

[0116] Un medio de lo que permite la supervivencia y/o proliferación es un medio que induce o promueve la supervivencia y/o proliferación de las células durante preferiblemente al menos 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200 días de cultivo. La proliferación puede evaluarse utilizando técnicas conocidas en la técnica, tales como la tinción con BrdU, la tinción con Edu, la tinción con Ki67 y el análisis de uso de curvas de crecimiento. Por ejemplo, hemos demostrado que, a partir de 10 conductos biliares, es posible después de 6 días para diluir a 6 pocillos con 10 organoides por pocillo (60 nuevos organoides). En cada paso de 6 días podemos generar alrededor de 360 organoides. Al realizar 1 pasaje/semana durante 32 semanas, podemos generar más de 11.000 (11520) nuevas estructuras organoides en solo 7 meses. Esto es importante para la industria, ya que la disponibilidad de células y organoides para trasplantes plantea un problema importante. Para un trasplante de ratón, por ejemplo, se requiere un mínimo de 10^5 células. Posiblemente se requieren 10^6 , o 10×10^6 para un trasplante humano, para que un injerto tenga éxito.

[0117] Dicho de otro modo, los medios utilizados de acuerdo con la invención son capaces de expandir una población de células madre para formar organoides hepáticos durante por lo menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 20, al menos 30, al menos 40, al menos 50, al menos 60, al menos 70, al menos 80, al menos 90 o al menos 100, pasajes bajo condiciones apropiadas.

[0118] El segundo medio como se identifica anteriormente induce preferentemente o promueve una diferenciación específica de las células durante al menos cinco días de cultivo. La diferenciación puede medirse detectando la presencia de un marcador específico asociado con el linaje hepático como se define aquí. La diferenciación puede medirse detectando la presencia de un marcador específico asociado con el linaje hepático como se define aquí. Dependiendo de la identidad del marcador, la expresión de dicho marcador puede evaluarse mediante RTPCR o inmunohistoquímica después de al menos 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 días de cultivo en un primer medio o en un primer posteriormente en un segundo medio como se define en el presente documento.

[0119] Un medio de diferenciación es un medio que induce o promueve una diferenciación específica de las células durante al menos cinco días de cultivo preferiblemente. La diferenciación puede medirse detectando la presencia de un marcador específico asociado con el linaje hepático como se define aquí.

[0120] En el contexto de la invención, el medio de cultivo celular término es sinónimo de medio, medio de cultivo o medio celular o medio basal o medio celular basal o medio de cultivo celular basal o medio de expansión o medio de diferenciación.

[0121] De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona un recipiente sellado herméticamente que contiene un medio de cultivo de la invención. En algunas realizaciones, el medio de cultivo es un medio de expansión. En algunas realizaciones, el medio de cultivo es un medio de diferenciación. Los recipientes herméticamente sellados pueden ser preferidos para el transporte o almacenamiento de los medios de cultivo, para prevenir la contaminación. El recipiente puede ser cualquier recipiente adecuado, tal como un matraz, un plato, una botella, un frasco, o una bolsa.

Métodos para obtener y/o cultivar células madre

[0122] El método para la obtención y/o el cultivo de un fragmento del hígado o un organoide hepático, comprende células madre de cultivo epiteliales, y/o fragmentos de tejido aislados que comprenden dichas células madre epiteliales en contacto con una matriz extracelular en presencia de uno o más medios de cultivo de células según la invención.

[0123] En algunas realizaciones, un método para obtener y/o el cultivo de un fragmento de hígado o un hígado organoide comprende el cultivo de células madre epiteliales, y/o fragmentos de tejido aislados que comprenden dichas células madre epiteliales en contacto con una matriz extracelular en presencia de medio EM1 y luego medio EM2 y luego medio DM.

[0124] En algunas realizaciones, un método para obtener y/o el cultivo de un fragmento de hígado o un hígado organoide comprende el cultivo de células madre epiteliales, y/o fragmentos de tejido aislados que comprenden dichas células madre epiteliales en contacto con una matriz extracelular en presencia de medio EM2 y luego medio DM sin el uso de medio EM1.

[0125] En algunas realizaciones, un método para obtener y/o el cultivo de un fragmento de hígado o un hígado organoide comprende el cultivo de células madre epiteliales, y/o fragmentos de tejido aislados que comprenden dichas células madre epiteliales en contacto con una matriz extracelular en presencia de medio EM1 y luego medio DM sin el uso de medio EM2.

[0126] El método para la obtención y/o el cultivo de un fragmento del hígado o un organoide hepático, puede comprender:

i) cultivo de células madre epiteliales y/o fragmentos de tejido aislado que comprenden dichas células madre epiteliales en contacto con una matriz extracelular en presencia de un medio, comprendiendo el medio un medio basal para células animales o humanas al que se agrega: factor de crecimiento epidérmico, un FGF capaz de unirse a FGFR2 o FGFR4, preferiblemente FGF10 y HGF como factores de crecimiento mitogénicos, nicotinamida, y preferiblemente, un agonista de Wnt, preferiblemente uno cualquiera de R-espondina 1-4; y posteriormente

ii) cultivar las células madre y/o los fragmentos de tejido aislado que comprenden dichas células madre epiteliales en contacto con una matriz extracelular en presencia de un segundo medio de cultivo celular como se define aquí (un medio DM).

[0127] En algunas realizaciones, antes de la etapa i), el método comprende cultivar las células madre epiteliales, y/o fragmentos de tejido aislados que comprenden dichas células madre epiteliales en contacto con una matriz extracelular en presencia de un medio que comprende o que consiste en un medio basal para células animales o humanas al que se agrega EGF, un inhibidor de BMP, R-espondina y Wnt. Preferiblemente, el inhibidor de BMP es Noggin y el medio EM1 se denomina "ENRW" (EGF, Noggin, R-espondina y Wnt).

[0128] En una realización, se proporciona un método para obtener y/o el cultivo de un fragmento del hígado o un organoide hepático, en el que dicho método comprende:

el cultivo de células madre epiteliales, y/o fragmentos de tejido aislados que comprenden dichas células madre epiteliales en contacto con una matriz extracelular en un medio de cultivo EM2 como se describe en este documento, por ejemplo, un medio que comprende un agonista Wnt, como R-espondina, factor de crecimiento epidérmico, un FGF capaz de unirse a FGFR2 o FGFR4, preferiblemente FGF10, y nico-tinamida. Preferiblemente, el medio también comprende HGF.

[0129] En una realización adicional, se proporciona un método para obtener y/o el cultivo de un fragmento del hígado o un organoide hepático, en el que dicho método comprende:

el cultivo de células madre epiteliales, y/o fragmentos de tejido aislados que comprenden dichas células madre epiteliales en contacto con una matriz extracelular en un medio que comprende un inhibidor de BMP, un agonista de Wnt, un factor de crecimiento epidérmico, un FGF capaz de unirse a FGFR2 o FGFR4, preferiblemente FGF10 y HGF como factores de crecimiento mitogénicos, gastrina, nicotinamida, B27, N2 y N-acetilcisteína.

[0130] En otro método preferido, después de al menos dos semanas de cultivo en un medio EM1 como se define

anteriormente, el cultivo se continúa en un medio que no comprende un inhibidor de BMP y un agonista Wnt. En algunas realizaciones, este cultivo continúa en un EM2 de la invención. En realizaciones alternativas, el cultivo continúa en un segundo medio de la invención (DM), que comprende adicionalmente un inhibidor de TGF-beta, tal como A83-01, y un inhibidor de Notch, tal como DAPT. En algunas realizaciones, este cultivo continúa en un EM2 y luego en un medio DM de la invención.

[0131] Por tanto, en un método preferido para la obtención y/o el cultivo de un organoide hepático, células madre epiteliales, y/o fragmentos aislados de tejido del hígado que comprenden dichas células madre epiteliales se cultivan en un primer paso en el primer medio (EM), a continuación, posteriormente en un segundo paso discreto en el segundo medio (DM). El primer paso de cultivo puede tener una duración de al menos dos semanas y puede ser más largo, por ejemplo, 3 semanas o más, 4 semanas o más, o 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 meses o más. El segundo paso tiene preferiblemente una duración de 6 semanas o menos, más preferiblemente 1 mes o menos, por ejemplo, 3 semanas o menos, 2 semanas o menos, 1 semana o menos. Se ha encontrado que muchas células comienzan a morir después de 2 semanas en DM y, por lo tanto, preferiblemente, el segundo paso es de 2 semanas o menos o como máximo 1 mes. Por lo tanto, solo en realizaciones menos preferidas, el segundo paso puede tener una duración de 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 días o 3 semanas o 1, 2, 3, 4, 5, 6 meses o más. Cada paso se lleva a cabo preferiblemente usando una matriz extracelular como se define aquí, y usando los medios de cultivo descritos en detalle en este documento.

[0132] Alternativamente, en otra realización, dicho método se lleva a cabo en el primer medio, sin interruptor para el segundo medio. Este método puede tener una duración de 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 días o 3 semanas o 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 meses o más.

[0133] En algunas realizaciones, la etapa de cultivo en el primer medio de la invención comprende tanto el cultivo en medio EM1 y luego cultivando en medio EM2. Por lo tanto, los períodos descritos anteriormente pueden referirse al período total en el que las células o fragmentos se cultivan en el EM1 y posteriormente en el medio EM2. En algunas realizaciones, la etapa de cultivo en el medio de cultivo EM1 puede tener una duración de menos de 10 días, por ejemplo, menos de 9, menos de 8, menos de 7, menos de 6, menos de 5, menos de 4, menos de 3, menos de 2 o menos de 1 día. En algunas realizaciones, la etapa de cultivo en el medio de cultivo EM1 puede tener una duración de entre 1 y 10 días, por ejemplo, 1-7 días, 2-6 días, 3-5 días, por ejemplo, 4 o 5 días. En algunas realizaciones, la etapa de cultivo en el medio EM2 puede tener una duración de 10 días o más, por ejemplo, 11, 12, 13, 14, 15, 16 días o más, o 1-3 semanas o 2-4 semanas. o 3-6 semanas o 1, 2, 3, 4, 5, 6 meses o más.

[0134] Las concentraciones preferidas de cada compuesto presente en cada medio ya se han definido en el presente documento en la descripción o en los ejemplos.

[0135] Los métodos descritos en este documento para la obtención y/o el cultivo de un fragmento del hígado o un organoide hepático también puede ser utilizada para obtener y/o cultivo de una población de células que expresan Lgr5 y tales métodos son abarcados por la invención. Por lo tanto, también se describe una población de células que expresan Lgr5 obtenida por un método de la invención.

[0136] Como será evidente para el lector experto, los métodos de cultivo preferidos de la invención son ventajosos porque no se requieren células alimentadoras. Las capas de células alimentadoras a menudo se usan para apoyar el cultivo de células madre e inhibir su diferenciación. Una capa de células alimentadoras es generalmente una monocapa de células que se co-cultiva y que proporciona una superficie adecuada para el crecimiento de las células de interés. La capa de células de alimentación proporciona un entorno en el que las células de interés pueden crecer. Las células alimentadoras a menudo se inactivan de forma mitótica (por ejemplo, mediante irradiación o tratamiento con mitomicina C) para prevenir su proliferación. El uso de células alimentadoras es indeseable, ya que complica el paso de las células (las células deben separarse de las células alimentadoras en cada paso, y se requieren nuevas células alimentadoras en cada paso). El uso de células alimentadoras también puede conducir a la contaminación de las células deseadas con las células alimentadoras. Esto es claramente problemático para cualquier aplicación médica, e incluso en un contexto de investigación, complica el análisis de los resultados de cualquier experimento realizado en las células. Como se indica en otra parte del presente documento, los medios de cultivo de la invención son particularmente ventajosos porque pueden usarse para cultivar células sin contacto de células alimentadoras, es decir, los métodos de la invención no requieren una capa de células alimentadoras para soportar las células cuyo crecimiento está siendo patrocinado.

[0137] Por consiguiente, las composiciones de la invención pueden ser composiciones alimentadoras libres de células. Se considera convencionalmente que una composición está libre de células alimentadoras si las células hepáticas en la composición se han cultivado durante al menos un pase en ausencia de una capa de células alimentadoras. Una composición libre de células alimentadoras de la invención contendrá normalmente menos de aproximadamente el 5%, menos de aproximadamente el 4%, menos de aproximadamente el 3%, menos de aproximadamente el 2%, menos de aproximadamente el 1% de células alimentadoras (expresado como un % del número total de células en la composición) o preferiblemente ninguna célula de alimentación en absoluto.

[0138] En una realización preferida, por ejemplo, si se va a usar un organoide hepático para medicina regenerativa, el

método puede comenzar a partir de células epiteliales o de un fragmento de hígado aislado. Las células o el fragmento de hígado pueden ser autólogos o alogénicos. Las células "autólogas" son células que se originan en el mismo organismo en el que se reintroducen para la terapia celular, por ejemplo, para permitir la regeneración de tejidos. Una célula autóloga no requiere, en principio, que coincida con el paciente para superar los problemas de rechazo inmune, y/o reduce la necesidad de intervenciones de supresión inmune en el trasplante. Las células "alogénicas" son células que se originaron de un individuo que es diferente del individuo en el que se están introduciendo las células para la terapia celular, por ejemplo, para permitir la regeneración de tejidos, aunque de la misma especie. Es posible que aún se requiera cierto grado de compatibilidad con el paciente para prevenir los problemas de rechazo. Los expertos en la técnica conocerán técnicas para minimizar el rechazo de tejidos.

[0139] Un método preferido de la invención abarca un método para cultivar un fragmento de hígado aislado que comprende dichas células madre epiteliales.

[0140] Otro método preferido comprende un procedimiento para la obtención de un organoide hepático a partir de células madre epiteliales y/o fragmentos de hígado aislado que comprende dichas células madre epiteliales.

[0141] Otro método preferido comprende un procedimiento para la obtención y el cultivo de un organoide hepático a partir de células madre epiteliales y/o fragmentos de hígado aislado que comprende dichas células madre epiteliales.

[0142] En un método preferido como anteriormente identificados en la presente, el inhibidor de BMP se selecciona de Noggin, DAN, y gro como proteínas incluyendo Cerberus y Gremlin, preferiblemente comprende o es Noggin, y/o dicho agonista Wnt se selecciona de uno o más de Wnt, preferiblemente Wnt-3a, R-espondina 1-4, Norrina y un inhibidor de GSK, más preferiblemente comprende o es Wnt-3a y/o R-espondina.

[0143] En otro método preferido, un organoide hepático se origina a partir de una sola célula, preferiblemente una célula que expresa Lgr5, más preferiblemente en el que la célula individual comprende una construcción de ácido nucleico que comprende una molécula de ácido nucleico de interés. La célula también puede expresar marcadores específicos del hígado, como Hnf1 α y Hnf4.

[0144] El aislamiento de ciertos tipos de células que expresan Lgr5 ya se ha descrito previamente (véase, por ejemplo, WO2009/022907 y WO2010/016766). Sin embargo, las células madre específicas del hígado que expresan Lgr5 del tipo descrito aquí no se han descrito previamente. Por consiguiente, la invención proporciona un organoide que comprende una población de células madre adultas caracterizadas por la expresión natural de al menos Lgr5 y uno o más de los siguientes marcadores Hnf1 α , Hnf4a, Sox9, KRT7 y KRT19 a un nivel significativo. Esta población celular también expresa marcadores de poblaciones progenitoras comunes al intestino delgado y el estómago, como Cd44 y Sox9 (Barker & Huch et al Cell stem cell 2010). Estos se expresan altamente en las células madre de acuerdo con la invención, pero no se expresan en el hígado adulto, lo que refuerza la capacidad de auto renovación de los cultivos de hígado descritos en este documento. Las células de acuerdo con este aspecto de la invención también pueden regular por incremento los genes diana de Wnt, incluyendo, por ejemplo, MMP7, Sp5 y Tnfrs19. Esto proporciona una fuerte evidencia del requisito de una actividad de señalización Wnt canónica activa y robusta para mantener la capacidad de auto renovación de estas culturas.

[0145] Por "expresión natural" se entiende que las células no se han manipulado de forma recombinante de ninguna manera, es decir, las células no se han inducido artificialmente para expresar estos marcadores o para modular la expresión de estos marcadores mediante la introducción de material genético exógeno, como como introducción de promotores heterólogos (no naturales) o más fuertes u otras secuencias reguladoras operativamente vinculadas a los genes endógenos o a formas de los genes introducidas de forma exógena. La expresión natural proviene del ADN genómico dentro de las células, incluidos los intrones entre las secuencias codificantes del exón donde existen. La expresión natural no es de ADNc. La expresión natural puede, si es necesario, probarse por cualquiera de varios métodos, como la secuenciación desde dentro del marco de lectura del gen para verificar que no haya una secuencia heterogénea extraña. "Adulto" significa post-embionario. Con respecto a las células madre de la presente invención, el término "célula madre adulta" significa que la célula madre está aislada de un tejido u órgano de un animal en una etapa de crecimiento posterior a la etapa embrionaria.

[0146] Esta población de células madre también se puede caracterizar por una falta de expresión natural de ciertos marcadores en cualquier nivel significativo, muchos de los cuales están asociados con la diferenciación celular. Específicamente, las células de la población de células madre adultas aisladas no expresan naturalmente uno o más de Cd11b, CD13, CD14, AFP, Pdx1, cualquier miembro de CYP (por ejemplo, CYP3A11, CYP 11A1) a un nivel significativo. Como se define aquí, se dice que estos marcadores son marcadores negativos.

[0147] El término "expresado" se utiliza para describir la presencia de un marcador dentro de una célula. Para ser considerado como expresado, un marcador debe estar presente en un nivel detectable. Por "nivel detectable" se entiende que el marcador puede detectarse utilizando una de las metodologías de laboratorio estándar, como la PCR, la transferencia o el análisis FACS. Se considera que un gen es expresado por una célula de la población de la invención si la expresión se puede detectar razonablemente después de 30 ciclos de PCR, lo que corresponde a un

nivel de expresión en la célula de al menos aproximadamente 100 copias por célula. Los términos "expresado" y "expresión" tienen significados correspondientes. En un nivel de expresión por debajo de este umbral, se considera que un marcador no se expresa. La comparación entre el nivel de expresión de un marcador en una célula de la invención y el nivel de expresión del mismo marcador en otra célula, como por ejemplo una célula madre embrionaria, se puede realizar comparando los dos tipos de células que se han utilizado, aislados de la misma especie. Preferiblemente, esta especie es un mamífero, y más preferiblemente esta especie es humana. Dicha comparación puede realizarse convenientemente usando un experimento de reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR).

[0148] Cualquiera de una serie de métodos físicos de separación conocidos en la técnica puede usarse para seleccionar las células de este aspecto de la invención y distinguirlas de otros tipos de células. Dichos métodos físicos pueden involucrar FACS y varios métodos de inmunofluorescencia basados en marcadores expresados específicamente por las células. Como se describió anteriormente, Lgr5, Hnf1 α y Hnf4 son 3 de los marcadores celulares expresados en niveles altos en las células. Por lo tanto, solo a modo de ilustración, las células pueden aislarse mediante una serie de métodos físicos de separación, que se basan en la presencia de estos marcadores.

[0149] En una realización, las células pueden ser aisladas por FACS utilizando un anticuerpo, por ejemplo, contra uno de estos marcadores. Como será evidente para un experto en la técnica, esto puede lograrse a través de un anticuerpo marcado fluorescente, o a través de un anticuerpo secundario marcado fluorescente con especificidad de unión para el anticuerpo primario. Los ejemplos de etiquetas fluorescentes adecuadas incluyen, entre otros, FITC, Alexa Fluor® 488, GFP, CFSE, CFDA-SE, DyLight 488, PE, PerCP, PE-Alexa Fluor® 700, PE-Cy5 (TRI-COLOR®), PE-Cy5.5, PI, PE-Alexa Fluor® 750 y PE-Cy7. Esta lista se proporciona solo a modo de ejemplo, y no pretende ser limitante.

[0150] Será evidente para un experto en la materia que el análisis FACS que usa un anticuerpo anti-Lgr5 proporcionará una población celular purificada. Sin embargo, en algunas realizaciones, puede ser preferible purificar aún más la población celular realizando una ronda adicional de análisis FACS utilizando uno o más de los otros marcadores identificables, preferiblemente Hnf1 α y Hnf4, pero también se pueden usar otros.

[0151] En otra realización, las células pueden aislarse por purificación de inmunofluorescencia, que es un método de separación conocido en la técnica. Solo a modo de ilustración, las células pueden aislarse mediante purificación por inmunofluorescencia dirigida hacia c-kit. Como será evidente para un experto en la técnica, este método se basa en la inmovilización de anticuerpos en una columna de purificación. La muestra de células se carga en la columna, lo que permite que las células apropiadas se unan a los anticuerpos y, por lo tanto, se unan a la columna. Después de una etapa de lavado, las células se eluyen de la columna utilizando un competidor que se une preferentemente al anticuerpo anti-c-kit inmovilizado, y permite que las células se liberen de la columna.

[0152] Será evidente para un experto en la materia que la purificación por inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo inmovilizado proporcionará una población celular purificada. Sin embargo, en algunas realizaciones, puede ser preferible purificar aún más la población celular realizando una ronda adicional de purificación por inmunofluorescencia utilizando uno o más de los otros marcadores identificables, por ejemplo, Hnf4, y usar una alícuota de los clones aislados para determinar la expresión de otros marcadores intracelulares relevantes.

[0153] Será evidente para un experto en la materia que las etapas de purificación secuencial no tienen necesariamente que implicar el mismo método físico de separación. Por lo tanto, quedará claro que, por ejemplo, las células se pueden purificar a través de una etapa FACS utilizando un anticuerpo anti-Lgr5, seguido de una etapa de purificación por inmunofluorescencia utilizando una columna de afinidad SSEA-1. En ciertas realizaciones, las células pueden cultivarse después del aislamiento durante al menos aproximadamente 15, al menos aproximadamente 20 días, al menos aproximadamente 25 días, o al menos aproximadamente 30 días. En ciertos aspectos, las células se expanden en el cultivo por más tiempo para mejorar la homogeneidad del fenotipo celular en la población celular.

[0154] Otras características de este método se definen en la parte de la descripción dedicada a las definiciones. Las suspensiones unicelulares o pequeños grupos de células (2-50 células/grupo) normalmente se sembrarán, en lugar de grandes grupos de células, como se conoce en la técnica. A medida que se dividen, dichas células se sembrarán en un soporte a una densidad que promueva la proliferación celular. Típicamente, cuando se aíslan células individuales, se usa la densidad de placas de al menos 1-500 células/pozo, siendo la superficie del pozo 0,32 cm². Cuando se siembran agrupaciones, la densidad del recubrimiento es preferiblemente de 250-2500 células/cm². Para repeler, se puede usar una densidad de entre aproximadamente 2500 células/cm² y aproximadamente 5,000 células/cm². Durante la reposición, normalmente se sembrarán suspensiones de una sola célula o un pequeño grupo de células, en lugar de grandes grupos de células, como se conoce en la técnica.

Organoides de la invención

[0155] Las células descritas anteriormente se convierten en cuerpos que están en el presente documento denominado "organoides". Por consiguiente, un organoide de hígado obtenible por un método de la invención es un aspecto adicional de la invención. Según nuestro conocimiento, esta es la primera vez que se obtiene un organoide hepático

que es funcional y está vivo después de un período de tiempo tan prolongado (es decir, al menos 7 meses de cultivo; consulte los ejemplos incluidos aquí). La funcionalidad se caracteriza preferiblemente por la presencia de un marcador hepático como se define en el presente documento y/o por la estructura de dicho organoide como se define en el presente documento. Dado que la cantidad final de organoides hepáticos obtenida se correlaciona con la duración del cultivo, el experto entenderá que la invención es una invención pionera y, potencialmente, abre nuevas posibilidades en, por ejemplo, la medicina regenerativa.

[0156] Por ejemplo, un organoide de acuerdo con la presente invención puede comprender una población de células de al menos 1×10^3 células, al menos 1×10^4 células, al menos 1×10^5 células, al menos 1×10^6 células, al menos 1×10^7 células o más. En algunas realizaciones, cada organoide comprende entre aproximadamente 1×10^3 células y 5×10^3 células; en general, 10-20 organoides se pueden cultivar juntos en un pocillo de una placa de 24 pocillos.

[0157] Las células y los organoides de acuerdo con la presente invención pueden ser animales o humanos no humanos. Los inventores han demostrado, por primera vez, que es posible cultivar y mantener organoides de hígado tanto humanos como animales *in vitro*, utilizando los medios de cultivo y los métodos de la invención.

[0158] Los ejemplos ilustrativos de organoides generados de acuerdo con la invención se dan en las figuras adjuntas. Se puede observar que los organoides de acuerdo con la invención pueden poseer una estructura quística, con en el exterior, una capa de células con al menos una yema y una luz central. Los organoides en el exterior del matrigel tienden a ser más grandes que los organoides en el centro del matrigel, tal vez porque tienen mejor acceso a los factores de crecimiento necesarios. Estructuralmente, los organoides de acuerdo con la invención a menudo tienen forma alargada. Pueden incluir una o más estructuras en ciernes: una capa epitelial de una sola célula que tiene una estructura no muy diferente de un conducto biliar. Bajo microscopía confocal, las estructuras pueden teñirse positivamente para la queratina. Pueden incluir células con núcleos polarizados y citoplasma pequeño. Los organoides pueden tener una sección que está formada por múltiples capas; tales células a menudo tienden a tener sus núcleos más centrales a las células, es decir, no polarizadas. Las células en la sección multicapa pueden organizarse para incluir un espacio o luz entre las células.

[0159] Un organoide hepático comprende preferiblemente un hepatocito y una célula colangiocito, más preferiblemente en el que al menos uno de los siguientes marcadores se pudo detectar: al menos un marcador de hepatocitos tales como albúmina, transthyretin, B-1 integrina y glutamina sintetasa y/o al menos uno de los fabricantes de CYP3A11, FAH, tbx3, TAT y Gck y/o al menos un colangeocito como la queratina 7 y 19. El experto sabe cómo detectar cada uno de estos marcadores (es decir, RT-PCR y/o inmunohistoquímica). Preferiblemente, la expresión de cada uno de estos marcadores se evalúa como llevada a cabo en la parte experimental. Cada uno de estos marcadores se expresa generalmente después de al menos dos semanas, tres semanas o un mes de cultivo utilizando un método de la invención. El análisis de micromatrizs de los organoides en ambas condiciones de cultivo mostró que los organoides del hígado se parecen al tejido hepático adulto.

[0160] En algunas realizaciones, aproximadamente el 35% de las células en un organoide hepático expresan un marcador de superficie de hepatocitos, por ejemplo, 25-45%, 30-40%, 33-37%, 35% o menos, o 15-35 % de células.

[0161] Preferiblemente, las células y los organoides generado de acuerdo con la invención también poseen funciones de hepatocitos, tales como la expresión o la tinción positiva para los marcadores madura de albúmina hepática, B-1 integrina, CK-8, CK-18, transtiretina (TTR), glucosa 6P, Met, glutamina sintasa (Glul), transferrina, Fahd1, Fahd2a, K7, K19 y citocromo P450 isoformas 3A13 (CYP3A13), 51 (CYP51) 2D10 (CYP2D10), 2j6 (CYP2j6), 39A1 (CYP39) CYP4A10), 4F13 (CYP4F13) 4F16 (CYP4F16), CYP4B1 y 20A1 (CYP20A1). Además, la AFP del gen del hígado embrionario no se detecta en ninguna de las dos condiciones de cultivo, como en el hígado adulto. En algunas realizaciones, la expresión de la proteína fetal alfa está justo por encima de la expresión del gen de fondo.

[0162] Además, los bien conocidos factores de transcripción depática como HNF1a, HNF1B y HNF4A son altamente expresados en ambas condiciones.

[0163] Dado que el hígado y el páncreas son órganos estrechamente relacionados, investigamos si nuestros cultivos de hígado también expresaban genes específicos del páncreas. El páncreas se divide funcionalmente en páncreas endocrino y exocrino. El páncreas endocrino se caracteriza principalmente por la expresión de insulina, glucagón y somatostatina. La expresión de estas hormonas está estrechamente regulada por un conjunto de factores de transcripción específicos del páncreas endocrino, siendo los más importantes Pdx1 y NeuroD. El páncreas exocrino está formado por compartimentos acinares y ductales responsables de producir las enzimas digestivas amilasa, lipasa pancreática y quimotripsina, entre otras. La expresión de estos genes también está regulada por genes pancreáticos exocrinos específicos como Ptf1.

[0164] Los genes específicos al páncreas Ptf1a, amilasa pancreática (Amy2a4), la lipasa pancreática (Pnlip), insulina (ins1 y INS2), glucagón (GCG), quimotripsina (cela1), Pdx1 y NeuroD estaban ausentes en los cultivos de hígado aquí descritos.

[0165] En algunas realizaciones, uno o más o todos los siguientes genes se expresan en los organoides del hígado a un nivel similar al gen correspondiente en hepatocitos de hígado adultos: Aqp1, Bmp2, Apo3, Apol7a, Sord, C3, Ppara, Pparg, tbx3, Igf1, Il17rb, Il1b, Tgfb1, Apoa1, Apoa4, Apob, Cyp26b1, Cyp27a1, Cyp2b13, Cyp2b9, Cyp2c37, Cyp2f2, Cyp2j13, Cyp3a11, Cypa2 Por ejemplo, vea la Figura 16A.

[0166] En algunas realizaciones, uno o más de los siguientes genes se expresan en los organoides del hígado a un nivel similar en comparación con el gen correspondiente en hepatocitos de hígado adultos: Ccl2, Osmr, Icam1 y Cxcl2.

[0167] En algunas realizaciones, uno o ambos de los siguientes genes se expresan diferencialmente tanto en un organoide hepático como en el recién nacido: mKi67 y cdkn3.

[0168] En algunas realizaciones, uno, dos o todos de los siguientes genes se expresan en un nivel similar en un organoide hepático y un hígado recién nacido: cyp2j6, olfm4 y Lefty 1. Por ejemplo, véase la Figura 16B.

[0169] En algunas realizaciones, un organoide hepático de la invención tiene un fenotipo ductal cuando se cultivan en medio de expansión de la invención (por ejemplo, EM1 o EM2).

[0170] En algunas realizaciones, un organoide hepático de la invención expresa marcadores de hígado adultos cuando se cultivan en un medio de diferenciación de la invención.

[0171] En una realización, un organoide hepático de la invención tiene un perfil de expresión génica, como se muestra en la Figura 16C.

[0172] En una realización particularmente preferida, una población de células de hígado de ratón u organoide de la invención tiene el perfil de expresión genética como se muestra en la Figura 18. Por ejemplo, en una realización preferida, una población de células de hígado de ratón u organoide de la invención:

a) expresa al menos uno (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11), preferiblemente todos los siguientes marcadores de células madre: Lgr5, Lgr4, epcam, Cd44, Tnfrsf19, Sox9, Sp5, Cd24a, Prom1, Cdca7 y Elf3; y/o

b) no expresa el siguiente marcador de células madre: Lgr6; y/o

c) expresa al menos uno (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19), preferiblemente todos los siguientes marcadores de hepatocitos o colangiocitos cuando se cultivan en el medio de expansión de la invención: Hnf1a, Hnf1b, Hnf4a, Hhex, Onecut1, Onecut2, Prox1, Cdh1, Foxa2, Gata6, Gata6, Cebpa, Cebp, Cebp, Jpg, Glul, Krt7; y/o

d) no expresa al menos uno (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17) de los siguientes genes cuando se cultiva en el medio de expansión de la invención: afg, Ins1, Ins2, Gcg, Ptfla, Cela1, Cela2a, Cela3b, Neurod1, Neurod2, Neurog1, Neurog2, Neurog3, Amy2a4, Igflr, Igf2 y Cd34; y/o

e) expresa al menos uno (por ejemplo, 1, 2 o 3) de los siguientes genes de reprogramación: Klf4, Myc y Pou5f1 y/o

f) no expresa el siguiente gen de reprogramación: Sox2.
en el que la expresión de los genes se detecta preferiblemente midiendo la expresión a nivel de ARNm, por ejemplo, utilizando una micromatriz.

[0173] Más preferiblemente, una población de células de hígado de ratón u organoide de la invención tiene todas las características a) a f) anteriores.

[0174] En algunas realizaciones, el perfil de expresión génica descrito anteriormente para una población de células de ratón o un organoide de la invención es para una población de células de ratón o un organoide cultivado en medio de expansión de la invención.

[0175] En algunas realizaciones, se proporciona una población de células hepáticas humanas u organoides de la invención que tiene la firma de expresión génica mostrada en la Figura 19. Por ejemplo, una población de células hepáticas humanas o organoides cultivadas en EM1 de la invención preferiblemente expresa los genes indicados en la Figura 19 como se expresan en medio de cultivo de células EM1. Por ejemplo, una población de células hepáticas humanas u organoides cultivadas en EM2 de la invención expresan preferiblemente los genes indicados en la Figura 19 como se expresan en medio de cultivo de células EM2. Por ejemplo, una población de células hepáticas humanas u organoides cultivadas en DM expresa preferiblemente los genes indicados en la Figura 19 como expresados en medio de cultivo de células DM.

[0176] Por ejemplo, en una realización preferida, una población de células de hígado humano u organoide de la invención:

- 5 a) expresa al menos uno (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9), preferiblemente todos los siguientes genes distintivos de células madre: Lgr4, TACSTD1/Epcam, CD44, SOX9, SP5, CD24, PROM1, CDCA7 y ELF3; y/o
- 10 b) expresa al menos uno (por ejemplo, 1, 2, 3, 4), preferiblemente todos los siguientes genes de reprogramación: KLF4, MYC, POU5F1 y SOX2; y/o
- 15 c) expresa al menos uno (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19), preferiblemente todos los siguientes genes específicos de hepatocito/colangiocito: HNF1A, HNF1B, HNF4A, HHEX, ONECUT1, ONECUT2, PROX1, CDH1, FOXA2, GATA6, FOXM1, CEBPA, CEBPB, CEBPG, CEBPG, GLB, KRT) y/o
- 20 d) no expresa al menos uno (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6), preferiblemente todos los siguientes genes específicos de hepatocitos/colangiocitos: NEUROG2, IGF1R y CD34, AFP, GCG y PTF1A, por ejemplo, no expresa NEUROG2, IGF1R y CD34; y/o
- 25 e) expresa al menos uno (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18), preferiblemente todos los siguientes específicos de hepatocitos genes: TTR, ALB, FAH, TAT, CYP3A7, APOA1, HMGCS1, PPARG, CYP2B6, CYP2C18, CYP2C9, CYP2J2, CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7, CYP4F8, CYP4V2 y SCP1.12;
- en donde la expresión de los genes se detecta preferiblemente midiendo la expresión a nivel de ARNm, por ejemplo, utilizando una micromatriz.

[0177] Más preferiblemente una población de células de hígado humano o organoide de la invención tiene todas las características de a) a e) anterior.

- 30 **[0178]** En algunas realizaciones, los genes en una población de células hepáticas humanas u organoides de la invención están regulados al alza o regulados a la baja en relación con la expresión de un ARN de referencia como se muestra en la Figura 19. Preferiblemente, el ARN de referencia es el ARN de referencia humana universal (Stratagene, número de catálogo 740000). En algunas realizaciones, un gen se regula al alza o a la baja en relación
- 35 con el ARN de referencia si también se muestra en la Figura 19 como al alza o a la baja en relación con el ARN de referencia, pero la extensión o la regulación a la baja no tienen por qué ser iguales. En otras realizaciones, el grado de regulación ascendente o descendente es de +/- 35%, +/- 30%, +/- 25%, +/- 20%, +/- 20%, +/- 15%, +/- 10%, +/- 5%, +/- 3 o aproximadamente lo mismo que se muestra en la Figura 19. En otras realizaciones, el nivel absoluto de expresión de los genes en un organoide humano de la invención es +/- 35%, +/- 30%, +/- 25%, +/- 20%, +/- 15%, +/- 10%, +/- 5%, +/- 3% o aproximadamente lo mismo que se muestra en la Figura 19.
- 40

- [0179]** La población de células de hígado humano o organoides de la invención también expresan preferentemente Lgr5 y/o Tnfrsf19, preferiblemente ambos. En algunas realizaciones, la población de células hepáticas humanas u organoides, cuando se cultivan en un medio de expansión de la invención, expresan Lgr5 y/o Tnfrsf19, preferiblemente
- 45 ambos. Preferiblemente, la expresión de Lgr5 y/o Tnfrsf19 se detecta por RT PCR. En algunas realizaciones, Lgr5 y/o Tnfrsf19 están presentes en niveles mucho más bajos de expresión en organoides o células cuando se cultivan en el medio de diferenciación en comparación con su nivel de expresión de organoides o células cuando se cultivan en el medio de expansión (por ejemplo, al menos 2 veces, al menos 3 veces, al menos 4 veces, al menos 5 veces, al menos 10 veces, al menos 15 veces menos).
- 50

- [0180]** Las células y los organoides de acuerdo con la presente invención pueden ser capaces de secretar albúmina, por ejemplo, a una velocidad de entre aproximadamente 1 µg por hora por 10⁶ células y 10 µg por hora por 10⁶ células, preferiblemente entre 2 µg y 6 µg por hora por 10⁶ células.

- 55 **[0181]** Además, tales células y organoides pueden secretar urea. Por ejemplo, en una placa de 35 mm de células, la actividad de la síntesis de urea puede estar entre 1 µg y 50 µg en 48 horas, preferiblemente entre 5 µg y 30 µg.

- [0182]** Las células y los organoides acuerdo con la invención pueden mostrar las reservas de glucógeno visibles, por ejemplo, cuando se tiñen. La capacidad de las células y los organoides de acuerdo con la invención para sintetizar glucógeno activamente se puede ensayar cambiando los medios de cultivo de medios de diferenciación de bajo contenido de glucosa a DMEM de alto contenido de glucosa suplementado con FBS al 10% y dexametasona 0,2 µM durante dos días.
- 60

[0183] Las células y los organoides de acuerdo con la invención pueden poseer actividad citocromo P450 inducible

(por ejemplo, CYP1A). Dicha actividad se puede probar, por ejemplo, utilizando un ensayo de etoxiresorufina-O-deetilasa (EROD) (Cancer Res, 2001, 61: 8164-8170). Por ejemplo, las células o los organoides pueden exponerse a un sustrato P450 como el 3-metilcolantreno y los niveles de actividad EROD en comparación con las células de control.

5 **[0184]** Morfológicamente, las células parecen hepatocitos.

[0185] Un organoide hepático preferido comprende o consiste en una estructura quística con en el exterior una capa de células con yemas y un lumen central como se muestra en la Figura 2. Este organoide hepático puede tener una o más (por ejemplo, 2, 3 o las 4) de las siguientes características: (a) que tiene una densidad celular de $>5 \times 10^5$ células/cm³, preferiblemente $>10 \times 10^5$ células/cm³; (b) tener un grosor equivalente a 2-30 capas de células, preferiblemente un grosor equivalente a 2-15 capas de células; (c) las células se contactan mutuamente en tres dimensiones, (d) demuestran una función inherente al tejido hepático sano, (e) tienen una forma alargada, con 2 dominios definidos, es decir, un dominio epitelial de una sola capa donde se detectan células altamente polarizadas y queratina los marcadores se expresan (este dominio se parece al dominio del conducto biliar) y el otro dominio constituye el cuerpo principal del organoide y está formado por un epitelio multicapa con células no polarizadas en las que se puede detectar la expresión de albúmina. Está claro para el experto en la materia que un organoide de hígado de este tipo no es preferiblemente un fragmento de hígado y/o no comprende un vaso sanguíneo, y/o no comprende un lóbulo de hígado o un conducto biliar.

20 **[0186]** En el contexto de la invención, un fragmento de hígado es una parte de un hígado adulto, preferiblemente un hígado adulto humano. Preferiblemente, un organoide de hígado como se identifica en este documento, por lo tanto, no es un fragmento de hígado. Un organoide de hígado se obtiene preferiblemente usando una célula de un hígado adulto, preferiblemente una célula madre epitelial de un hígado adulto, más preferiblemente una célula madre epitelial de un hígado adulto que expresa Lgr5.

25 **[0187]** En algunas realizaciones, un organoide hepático comprende células que expresan Lgr5. Por ejemplo, en algunas realizaciones, al menos el 2%, más preferiblemente al menos el 5%, al menos el 10%, al menos el 20%, al menos el 30%, al menos el 40%, al menos el 50%, al menos el 60%, a al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90%, al menos el 95% de las células en el organoide del hígado expresan Lgr5. De manera similar, la invención proporciona una célula o una población de células que expresan Lgr5, en donde dichas células se obtienen de un organoide hepático de la invención. La progenie de tales células también está abarcada por la invención.

35 **[0188]** En una realización, un organoide hepático es un organoide hepático que todavía está siendo cultivado utilizando un método de la invención y es por lo tanto en contacto con una matriz extracelular. Preferiblemente, un organoide de hígado está incrustado en una matriz extracelular no mesenquimal. En el contexto de la invención, "en contacto" significa un contacto físico o mecánico o químico, lo que significa que para separar dicho organoide hepático de dicha matriz extracelular se necesita una fuerza.

40 **[0189]** En una realización preferida, un organoide hepático se puede cultivarse durante al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 semanas o 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 meses o más.

[0190] En otra realización preferida, un hígado organoide origina a partir de una sola célula, preferiblemente expresando Lgr5, más preferiblemente en el que la célula individual comprende una construcción de ácido nucleico que comprende una molécula de ácido nucleico de interés.

45 **[0191]** La invención proporciona además el uso de un medio de cultivo de acuerdo con la invención para el cultivo de células madre epiteliales o estructuras organoides aislados que comprenden estas células madre en una matriz extracelular, en el que dichas células madre preferiblemente no comprenden células madre embrionarias humanas. Se prefieren las células madre adultas humanas. Además, las células madre epiteliales del hígado seleccionadas también pueden iniciar estos organoides tridimensionales en un medio de cultivo de acuerdo con la invención. La invención proporciona además el uso de un medio de cultivo de acuerdo con la invención para cultivar fragmentos de hígado que comprenden células madre.

55 **[0192]** Se prefiere que dichas células madre son células madre de hígado, o células madre epiteliales. Un medio de cultivo de acuerdo con la invención permitió el establecimiento de condiciones de cultivo a largo plazo en las que se forma un organoide hepático en el que están presentes todos los tipos de células diferenciadas. El uso de un método de cultivo de acuerdo con la invención permitió períodos de cultivo de al menos siete meses, al menos ocho meses, al menos nueve meses, al menos diez meses.

60 **[0193]** La invención proporciona además un organoide hepático, que comprende preferiblemente al menos 50% de células viables, células viables más preferido al menos 60%, las células viables más preferido al menos 70%, las células viables más preferido al menos 80%, más preferido al menos 90% de células viables. La viabilidad de las células se puede evaluar utilizando la tinción de Hoechst o la tinción con yoduro de propidio en FACS.

65 **[0194]** Las células viables poseen preferiblemente las funciones hepáticas, o características de los hepatocitos, como

se describe anteriormente.

Usos de las células y organoides de la invención

[0195] En un aspecto adicional, la invención proporciona el uso de una célula hepática u organoide de acuerdo con la invención como se describe anteriormente en una pantalla de descubrimiento de fármacos, ensayo de toxicidad o en medicina regenerativa. La invención además proporciona el uso de la progenie de los organoides hepáticos de la invención, en ensayos de toxicidad. Dichos ensayos de toxicidad pueden ser ensayos *in vitro* utilizando una célula derivada de un organoide hepático o un organoide hepático o parte de él. Dicha progenie y organoides hepáticos son fáciles de cultivar y se parecen más a las células epiteliales primarias que, por ejemplo, las líneas celulares epiteliales como Caco-2 (ATCC HTB-37), I-407 (ATCC CCL6) y XBF (ATCC CRL 8808) que se utilizan actualmente en ensayos de toxicidad. Se anticipa que los resultados de toxicidad obtenidos con los organoides hepáticos se asemejan más a los resultados obtenidos en pacientes. Se utiliza una prueba de toxicidad basada en células para determinar la citotoxicidad específica del órgano. Los compuestos que se prueban en dicha prueba comprenden agentes quimiopreventivos para el cáncer, químicos para el medio ambiente, complementos alimenticios y tóxicos potenciales. Las células están expuestas a múltiples concentraciones de un agente de prueba durante un cierto período de tiempo. Los rangos de concentración para los agentes de prueba en el ensayo se determinan en un ensayo preliminar utilizando una exposición de cinco días y diluciones logarítmicas de la concentración soluble más alta. Al final del período de exposición, los cultivos se evalúan para determinar la inhibición del crecimiento. Los datos se analizan para determinar la concentración que inhibe el punto final en un 50 por ciento (TC50).

[0196] Por ejemplo, la inducción de las enzimas del citocromo P450 en hepatocitos del hígado es un factor clave que determina la eficacia y la toxicidad de los fármacos. En particular, la inducción de P450s es un mecanismo importante de interacciones problemáticas entre medicamentos y también es un factor importante que limita la eficacia del medicamento y gobierna la toxicidad del medicamento. Los ensayos de inducción del citocromo P450 han sido difíciles de desarrollar, ya que requieren hepatocitos humanos intactos. Estas células han demostrado ser intratables a la producción en cantidades suficientes para sostener la producción en masa de ensayos de alto rendimiento.

[0197] Por ejemplo, de acuerdo con este aspecto de la invención, un compuesto candidato puede ponerse en contacto con células u organoides como se describe en el presente documento, y cualquier cambio en las células o en la actividad de las células puede monitorizarse. Los ejemplos de otros usos no terapéuticos de las células u organoides de la presente invención incluyen la investigación de embriología hepática, linajes de células hepáticas y vías de diferenciación; estudios de expresión génica que incluyen expresión génica recombinante; mecanismos implicados en la reparación y lesión hepática; investigación de enfermedades inflamatorias e infecciosas del hígado; estudios de mecanismos patogénicos; y estudios de mecanismos de transformación de células hepáticas y etiología del cáncer de hígado.

[0198] Para fines de alto rendimiento, dichos organoides hepáticos se cultivan en placas de múltiples pocillos como, por ejemplo, placas de 96 pocillos o placas de 384 pocillos. Las bibliotecas de moléculas se utilizan para identificar una molécula que afecta a dichos organoides. Las bibliotecas preferidas comprenden bibliotecas de fragmentos de anticuerpos, bibliotecas de presentación de fagos peptídicos, bibliotecas de péptidos (por ejemplo, LOPAP™, Sigma Aldrich), bibliotecas de lípidos (BioMol), bibliotecas de compuestos sintéticos (por ejemplo, LOP AC™, Sigma Aldrich) o bibliotecas de compuestos naturales (Specs, TimTec). Además, se pueden usar bibliotecas genéticas que inducen o reprimen la expresión de uno o más genes en la progenie de las células de adenoma. Estas bibliotecas genéticas comprenden bibliotecas de ADNc, bibliotecas antisentido y ARNsi u otras bibliotecas de ARN no codificantes. Las células se exponen preferiblemente a concentraciones múltiples de un agente de prueba durante un cierto período de tiempo. Al final del período de exposición, se evalúan los cultivos. El término "afectar" se usa para cubrir cualquier cambio en una célula, que incluye, entre otros, una reducción o pérdida de la proliferación, un cambio morfológico y la muerte celular. Dichos organoides hepáticos también se pueden usar para identificar medicamentos que se dirigen específicamente a las células del carcinoma epitelial, pero no a dichos organoides hepáticos.

[0199] Los organoides hepáticos de acuerdo con la invención pueden reemplazar además el uso de líneas celulares tales como células Caco-2 en ensayos de toxicidad de posibles fármacos nuevos o de complementos alimenticios conocidos o novedosos.

[0200] Además, tales organoides hepáticos se pueden utilizar para el cultivo de un patógeno.

[0201] Los cultivos que comprenden organoides hepáticos son útiles en medicina regenerativa, por ejemplo, en post-radiación y/o reparación postoperatoria del epitelio hepático, en la reparación del epitelio en pacientes con insuficiencia hepática crónica o aguda o enfermedad. Las enfermedades hepáticas incluyen, pero no se limitan a, carcinoma hepatocelular, síndrome de Alagille, deficiencia de alfa-1-antitripsina, hepatitis autoinmune, atresia biliar, hepatitis crónica, cáncer de hígado, cirrosis, quistes hepáticos, hígado graso, galactosemia, síndrome de Gilbert, cirrosis biliar primaria, Hepatitis A, Hepatitis B, Hepatitis C, colangitis esclerosante primaria, síndrome de Reye, sarcoidosis, tirosinemia, enfermedad de almacenamiento de glucógeno tipo I, enfermedad de Wilson, hepatitis neonatal, esteato no alcohólico, hepatitis, porfiria y hemocromatosis.

[0202] Las condiciones genéticas que conducen a la insuficiencia hepática podrían beneficiarse de la terapia basada en células en forma de reemplazo celular parcial o completo usando células cultivadas de acuerdo con los medios de comunicación y/o métodos de la invención. Una lista no limitante de afecciones genéticas que conducen a insuficiencia hepática incluye: colestasis intrahepática familiar progresiva, enfermedad por almacenamiento de glucógeno tipo III, tirosinemia, deficiencia de desoxiguanosina quinasa, deficiencia de piruvato carboxilasa, disfunción congénita diseritropoyética, enfermedad poliquística del hígado, enfermedad poliquística del riñón, deficiencia de antitripsina alfa-1, defectos del ciclo del urea, acidemias orgánicas, enfermedades de almacenamiento lisosomal y trastornos de oxidación de ácidos grasos. Otras afecciones que también pueden beneficiarse de la terapia basada en células incluyen la Enfermedad de Wilson y la Amiloidosis Hereditaria (FAP).

[0203] Otras causas no relacionadas con hepatocitos de insuficiencia hepática que requerirían un trasplante de hígado completo para alcanzar un efecto terapéutico completo, todavía pueden beneficiarse de algún restablecimiento temporal de la función utilizando una terapia basada en células utilizando células cultivadas según los medios y/o métodos de la invención. Una lista no limitante de ejemplos de tales afecciones incluye: cirrosis biliar primaria, colangitis esclerosante primaria, síndrome de Aglaile, hipercolesterolemia familiar homocigótica, hepatitis B con cirrosis, hepatitis C con cirrosis, síndrome de Budd-Chiari, hiperoxaluria primaria, hepatitis autoinmune y enfermedad hepática alcohólica.

[0204] Los organoides de hígado de la invención pueden ser utilizados en un método de tratamiento de una enfermedad hereditaria que implica que hepatocitos funcionen mal. Tales enfermedades pueden ser de inicio temprano o de inicio tardío. Las enfermedades de inicio temprano incluyen insuficiencia orgánica relacionada con el metabolito (por ejemplo, deficiencia de alfa-1-antitripsina), enfermedades por almacenamiento de glucógeno (por ejemplo, GSD II, enfermedad de Pompe), tirosinemia, DGUOK leve, CDA tipo I, defectos del ciclo del útero (por ejemplo, deficiencia de OTC), academia orgánica y trastornos de la oxidación de ácidos grasos. Las enfermedades de inicio tardío incluyen hiperoxaluria primaria, hipercolesterolemia familiar, enfermedad de Wilson, amiloidosis hereditaria y enfermedad hepática poliquística. El reemplazo parcial o total con hepatocitos sanos que surgen de los organoides hepáticos de la invención se puede usar para restaurar la función hepática o para posponer la insuficiencia hepática.

[0205] Los organoides de hígado de la invención pueden ser utilizados en un método de tratamiento de la insuficiencia hepática crónica que surge debido a la enfermedad metabólica hereditaria o como resultado de la infección de los hepatocitos. El tratamiento de una enfermedad metabólica hereditaria puede implicar la administración de organoides hepáticos autólogos genéticamente modificados de la invención. El tratamiento de las infecciones de hepatocitos puede implicar la administración de organoides hepáticos alogénicos de la invención. En algunas realizaciones, los organismos hepáticos se administran durante un período de 2 a 3 meses.

[0206] Los organoides de hígado de la invención pueden ser utilizados para tratar la insuficiencia hepática aguda, por ejemplo, como resultado de la intoxicación hepática que puede resultar del uso de paracetamol, medicamentos o alcohol. En algunas realizaciones, la terapia para restaurar la función hepática comprenderá inyectar suspensión de hepatocitos de congelados, listos para usar hepatocitos alogénicos obtenidos de organoides de la invención. La capacidad de congelar los organoides adecuados significa que los organoides pueden estar disponibles para su administración inmediata y, por lo tanto, no es necesario esperar una transfusión de sangre.

[0207] En el caso de sustitución o corrección de la función hepática deficiente, puede ser posible construir una estructura de matriz celular a partir de uno o más organoides hepáticas generadas de acuerdo con la presente invención. Se cree que solo alrededor del 10% de la masa celular hepática es necesaria para una función adecuada. Esto hace que la implantación de composiciones de unidades de organoides en niños sea especialmente preferible al trasplante de órganos completos, debido a la disponibilidad relativamente limitada de donantes y al menor tamaño de los órganos juveniles. Por ejemplo, un niño de 8 meses tiene un hígado normal que pesa aproximadamente 250 g. Ese niño por lo tanto necesitaría unos 25 g de tejido. Un hígado adulto pesa aproximadamente 1500 g; por lo tanto, el implante requerido sería solo alrededor del 1.5% del hígado adulto. Cuando se implantan unidades organoides de acuerdo con la invención, unidas opcionalmente a un andamio polimérico, se producirá la proliferación en el nuevo huésped, y la masa celular hepática resultante reemplaza la función deficiente del huésped. Los inventores han demostrado, por primera vez, que es posible generar hepatocitos maduros a partir de células madre hepáticas adultas o fragmentos de tejido hepático que comprenden células madre que son adecuadas para el trasplante en animales o humanos no humanos. Usando el primer medio de cultivo de acuerdo con la invención, los inventores han demostrado que es posible mantener y expandir una población de células madre de hígado. Usando el segundo medio de cultivo de acuerdo con la invención, los inventores han demostrado que los hepatoblastos pueden diferenciarse *in vivo* a hepatocitos maduros adecuados para fines de trasplante. Por lo tanto, los inventores proporcionan una nueva fuente de hepatocitos para la regeneración hepática, reemplazo o corrección de la función hepática deficiente.

[0208] Los inventores también han demostrado el trasplante con éxito de los organoides, cultivados por métodos de la presente invención, en ratones inmunodeficientes (véase el Ejemplo 7), con células-organoides derivado trasplantados generar ambos colangiocitos y hepatocitos *in vivo*. Por lo tanto, en una realización, la invención proporciona organoides o células derivadas de organoides de la invención para el trasplante en seres humanos o

animales.

[0209] El uso de organoides de hígado humano con fines de trasplante es ventajoso sobre el uso de hepatocitos fetales o adultos para un número de razones. En primer lugar, los métodos de cultivo de la invención proporcionan una expansión ilimitada de las células y, por lo tanto, un suministro ilimitado. En particular, los inventores han demostrado que bajo las condiciones de cultivo correctas (por ejemplo, utilizando el medio de cultivo de expansión de la invención), las células Lgr5+ pueden sufrir más de 1000 divisiones *in vitro*. Por lo tanto, las células Lgr5+ pueden extraerse de los organoides del hígado y volver a administrarse, lo que proporciona una fuente continua de auto-renovación de hepatocitos trasplantables y células generadoras de colangiocitos. Por el contrario, los hepatocitos fetales o adultos se derivan de hígados de donantes que solo proporcionan una sola ronda de trasplante. Además, las células del donante solo pueden mantenerse vivas por unos pocos días, pero pierden sus propiedades de hepatocitos. Esto significa que los trasplantes deben realizarse tan pronto como el donante esté disponible. Las células derivadas de organoides, por otro lado, conservan su fenotipo en múltiples divisiones y durante largos períodos de tiempo, lo que significa que están listas y disponibles para el trasplante en cualquier etapa. Esto también podría permitir que las células derivadas de organoides se utilicen como un tratamiento hepático temporal para extender la vida útil de los pacientes para los pacientes en lista de espera para trasplantes de hígado. Una ventaja adicional de los organoides hepáticos de la invención es que pueden congelarse y posteriormente descongelarse sin pérdida de función. Esto permite banca celular, fácil almacenamiento y rápida disponibilidad para uso agudo. Esto podría ser útil, por ejemplo, en la preparación de un producto "listo para usar" que podría usarse para el tratamiento de la toxicidad hepática aguda. Los organoides también se pueden cultivar a partir de células o fragmentos de tejido tomados como pequeñas biopsias de donantes vivos, minimizando cualquier objeción ética al tratamiento. El donante puede ser incluso del paciente que se va a tratar, lo que podría reducir los efectos secundarios negativos asociados con el trasplante de células y órganos extraños y reducir la necesidad de medicamentos inmunosupresores.

[0210] Por consiguiente, se incluyen dentro del alcance de la invención los organoides para uso en procedimientos de tratamiento de un paciente humano o animal mediante terapia celular. El término "animal" aquí denota a todos los animales mamíferos, preferiblemente pacientes humanos. También incluye un animal individual en todas las etapas de desarrollo, incluidas las etapas embrionarias y fetales. Por ejemplo, el paciente puede ser un adulto o la terapia puede ser para uso pediátrico (por ejemplo, recién nacidos, niños o adolescentes). Dicha terapia celular abarca la administración de células u organoides generados de acuerdo con la invención a un paciente a través de cualquier medio apropiado. Específicamente, tales métodos de tratamiento implican la regeneración de tejido dañado. El término "administración", tal como se usa en el presente documento, se refiere a formas de administración bien reconocidas, como la intravenosa o la inyección, así como a la administración por trasplante, por ejemplo, trasplante por cirugía, injerto o trasplante de hígado manipulado con tejido derivado de células u organoides. De acuerdo con la presente invención. En el caso de las células, la administración sistémica a un individuo puede ser posible, por ejemplo, mediante infusión en la arteria mesentérica superior, la arteria celíaca, la vena subclavia a través del conducto torácico, infusión en el corazón a través de la vena cava superior o infusión en la cavidad peritoneal con posterior migración de las células a través de sistemas linfáticos subdiafragmáticos, o directamente a los sitios del hígado mediante infusión en el suministro de sangre de la arteria hepática o en la vena porta.

[0211] Entre 10^4 y 10^{13} células por persona de 100 kg pueden administrarse por infusión. Preferiblemente, entre aproximadamente $1-5 \times 10^4$ y $1-5 \times 10^7$ células pueden infundirse por vía intravenosa por persona de 100 kg. Más preferiblemente, entre aproximadamente 1×10^4 y 10×10^6 células pueden infundirse por vía intravenosa por persona de 100 kg. En algunas realizaciones, se proporciona una administración única de células u organoides. En otras realizaciones, se usan administraciones múltiples. Se pueden proporcionar administraciones múltiples durante un régimen de tratamiento inicial, por ejemplo, de 3 a 7 días consecutivos, y luego se pueden repetir en otros momentos.

[0212] En algunas realizaciones, es deseable repoblar/reemplazar el 10-20% del hígado de un paciente con hepatocitos sanos que surgen de un organoide hepático de la invención.

[0213] También es posible reconstituir un organoide hepático a partir de una sola célula que expresa Lgr5 como se define en el presente documento. Esta única célula puede haber sido modificada por la introducción de una construcción de ácido nucleico como se define aquí, por ejemplo, para corregir una deficiencia o mutación genética. También sería posible ablacionar específicamente la expresión, según se desee, por ejemplo, utilizando ARNsi. Los polipéptidos potenciales a expresar podrían ser cualquiera de aquellos que son deficientes en enfermedades metabólicas del hígado, incluyendo, por ejemplo, AAT (alfa antitripsina). Para dilucidar la fisiología del hígado, también podríamos expresar o inactivar los genes implicados en la vía Wnt, EGF, FGF, BMP o notch. Además, para la detección de la toxicidad del fármaco, la expresión o inactivación de los genes responsables del metabolismo del fármaco hepático (por ejemplo, los genes de la familia CYP) sería de gran interés.

[0214] En una realización, las células madre epiteliales expandidas pueden reprogramarse en destinos relacionados con tejidos tales como, por ejemplo, células hepáticas que incluyen un hepatocito y una célula colangiocítica. Hasta ahora, no ha sido posible regenerar células hepáticas a partir de células madre adultas. Los métodos de cultivo de la presente invención permitirán analizar los factores que trans-diferencian la célula madre epitelial estrechamente relacionada a una célula hepática, que incluye un hepatocito y una célula colangiocítica.

[0215] Quedará claro para una persona experta que la terapia génica puede usarse adicionalmente en un método dirigido a reparar tejido dañado o enfermo. Se puede hacer uso, por ejemplo, de un vehículo de suministro de genes adenovirales o retrovirales para suministrar información genética, como ADN y/o ARN a células madre. Una persona experta puede reemplazar o reparar genes particulares dirigidos a la terapia génica. Por ejemplo, un gen normal puede insertarse en una ubicación no específica dentro del genoma para reemplazar un gen no funcional. En otro ejemplo, una secuencia génica anormal puede reemplazarse por una secuencia génica normal mediante recombinación homóloga. Alternativamente, la mutación inversa selectiva puede devolver un gen a su función normal. Otro ejemplo es alterar la regulación (el grado en que un gen se activa o desactiva) de un gen en particular. Preferiblemente, las células madre se tratan *ex vivo* mediante un enfoque de terapia génica y se transfieren posteriormente al mamífero, preferiblemente un ser humano que necesita tratamiento. Por ejemplo, las células derivadas de organoides pueden modificarse genéticamente en el cultivo antes del trasplante en pacientes.

[0216] Los inventores han encontrado que Lgr5 no es detectable en el hígado sano, aunque Lgr5 residual se puede detectar. Por lo tanto, la descripción describe además un método para diagnosticar la lesión hepática que comprende detectar si se expresa Lgr5, en donde la expresión de la proteína Lgr5 indica lesión hepática. La descripción también describe un método para monitorear la reparación o regeneración del hígado al monitorear la expresión de Lgr5 en el hígado. La expresión de Lgr5 puede detectarse mediante cualquier método adecuado, por ejemplo, citometría de flujo, inmunohistoquímica o mediante el uso de métodos de PCR.

[0217] La invención también proporciona un recipiente de composición o cultivo celular que comprende células y/o organoides de acuerdo con una cualquiera de los aspectos de la invención descritos anteriormente, y un medio de cultivo de acuerdo con una cualquiera de los aspectos de la invención descritos anteriormente. Por ejemplo, tal composición o vaso de cultivo celular puede comprender cualquier número de células u organoides cultivados de acuerdo con un método de la invención, en un medio de cultivo como se describe anteriormente. Por ejemplo, un medio de cultivo preferido comprende o consiste en DMEM/F12 avanzado complementado con B27, N2, 200 ng/ml de N-acetilcisteína, 50ng/ml de EGF, 1 µg/ml de R-espondina1, 10 nM de gastrina, 100 ng/ml de FGF10, nicotinamida 10 mM y 50 ng/ml de HGF y 50% de medios acondicionados con Wnt.

Definiciones

[0218] Una construcción de ácido nucleico comprende una molécula de ácido nucleico de interés y asegurará la expresión de la molécula de ácido nucleico dada en las células en las que se había introducido. Una construcción de ácido nucleico particularmente preferida es un vector de expresión en el que una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido está unida operativamente a un promotor capaz de dirigir la expresión de dicha molécula de ácido nucleico (es decir, una secuencia de codificación) en dichas células. La frase "vector de expresión" generalmente se refiere a una molécula de ácido nucleico que es capaz de efectuar la expresión de una molécula de gen/ácido nucleico que contiene en una célula compatible con tales secuencias. Estos vectores de expresión incluyen típicamente al menos secuencias promotoras adecuadas y, opcionalmente, señales de terminación de la transcripción. Una secuencia de ácido nucleico o ADN o nucleótido que codifica un polipéptido se incorpora en una construcción de ADN/ácido nucleico capaz de introducirse y expresarse en un cultivo celular *in vitro* como se identifica en un método de la invención. Un constructo de ADN preparado para la introducción en una célula particular incluye típicamente un sistema de replicación reconocido por dicha célula, un segmento de ADN deseado que codifica un polipéptido deseado, y secuencias reguladoras de la iniciación y terminación de la transcripción y la traducción operativamente vinculadas al segmento de codificación del polipéptido. Un segmento de ADN está "unido operativamente" cuando se coloca en una relación funcional con otro segmento de ADN. Por ejemplo, un promotor o potenciador está unido operativamente a una secuencia de codificación si estimula la transcripción de la secuencia. El ADN para una secuencia señal está unido operativamente al ADN que codifica un polipéptido si se expresa como una preproteína que participa en la secreción de un polipéptido. Generalmente, una secuencia de ADN que está operativamente unida es contigua y, en el caso de una secuencia de señal, tanto contigua como en fase de lectura. Sin embargo, los potenciadores no necesitan ser contiguos con una secuencia de codificación cuya transcripción controlan. El enlace se logra mediante la ligadura en sitios de restricción convenientes o en adaptadores o enlazadores insertados en lugar de los mismos.

[0219] La selección de una secuencia promotora apropiada generalmente depende de la célula huésped seleccionada para la expresión de un segmento de ADN. Los ejemplos de secuencias promotoras adecuadas incluyen promotores eucariotas bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook y Russell, 2001, *supra*). Una secuencia reguladora de la transcripción típicamente incluye un potenciador o promotor heterólogo reconocido por la célula. Los promotores adecuados incluyen el promotor de CMV. Un vector de expresión incluye el sistema de replicación y pueden emplearse secuencias reguladoras de la transcripción y la traducción junto con el sitio de inserción para el segmento de codificación del polipéptido. Ejemplos de combinaciones viables de líneas celulares y vectores de expresión se describen en Sambrook y Russell (2001, *supra*) y en Metzger et al. (1988) Nature 334: 31-36.

[0220] La invención no se limita a un polipéptido específico o molécula de ácido nucleico de interés que debe expresarse en una célula que expresa Lgr5 como se identifica en el presente documento. Dependiendo del objetivo

del método, se puede prever expresar un polipéptido en una célula hepática y/o inactivar la expresión de un polipéptido en una célula hepática. Los polipéptidos potenciales a expresar podrían ser todos aquellos que son deficientes en enfermedades metabólicas del hígado, como por ejemplo AAT (alfa antitripsina). Para dilucidar la fisiología del hígado, también podríamos expresar o inactivar los genes implicados en la ruta Wnt, EGF, FGF, BMP o notch. Además, para la detección de la toxicidad del fármaco, la expresión o inactivación de los genes responsables del metabolismo del fármaco hepático (por ejemplo, genes de la familia CYP) sería de gran interés.

[0221] Algunos aspectos de la invención se refieren al uso de una construcción de ácido nucleico o vector de expresión que comprende una secuencia de nucleótidos como se definió anteriormente, en donde el vector es un vector que es adecuado para la terapia génica. Los vectores que son adecuados para la terapia génica se describen en Anderson 1998, Nature 392: 25-30; Walther y Stein, 2000, Drugs 60: 249-71; Kay et al., 2001, Nat. Medicina. 7: 33-40; Russell, 2000, J. Gen. Virol. 81: 2573-604; Amado y Chen, 1999, Science 285: 674-6; Federico, 1999, Curr. Opin. Biotechnol. 10: 448-53; Vigna y Naldini, 2000, J. Gene Med. 2: 308-16; Marin et al., 1997, Mol. Medicina. Hoy 3: 396-403; Peng y Russell, 1999, Curr. Opin. Biotechnol. 10: 454-7; Sommerfelt, 1999, J. Gen. Virol. 80: 3049-64; Reiser, 2000, Gene Ther. 7: 910-3; y referencias citadas en el mismo. Los ejemplos incluyen vectores integradores y no integradores, como los basados en retrovirus, adenovirus (AdV), virus adenoasociados (AAV), lentivirus, virus de la viruela, alfavirus y virus del herpes.

[0222] Un vector de terapia génica particularmente adecuado incluye un adenovirus (Ad) y el virus de vector (AAV) asociado-Adeno. Estos vectores infectan un gran número de tipos de células en división y sin división, incluidas las células hepáticas. Además, los vectores adenovirales son capaces de altos niveles de expresión transgénica. Sin embargo, debido a la naturaleza episomal de los vectores adenovirales y AAV después de la entrada celular, estos vectores virales son más adecuados para aplicaciones terapéuticas que requieren solo la expresión transitoria del transgén (Russell, 2000, J. Gen. Virol. 81: 2573-2604; Goncalves, 2005, Virol J. 2 (1): 43) como se indicó anteriormente. Los vectores adenovirales preferidos se modifican para reducir la respuesta del huésped según lo examinado por Russell (2000, *supra*). La seguridad y la eficacia de la transferencia de genes de AAV se han estudiado ampliamente en humanos con resultados alentadores en el hígado, los músculos, el SNC y la retina (Manno et al Nat Medicine 2006, Stroes et al ATVB 2008, Kaplitt, Feigin, Lancet 2009; Maguire, Simonelli et al NEJM 2008; Bainbridge et al NEJM 2008). AAV2 es el serotipo mejor caracterizado para estudios de transferencia de genes tanto en humanos como en modelos experimentales. AAV2 presenta tropismo natural hacia los músculos esqueléticos, neuronas, células del músculo liso vascular y hepatocitos. Por lo tanto, AAV2 es una buena elección de vector para atacar tejidos del hígado. Otros ejemplos de vectores no integrativos basados en virus adeno-asociados incluyen AAV1, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11 y AAV pseudotipados. El uso de serotipos no humanos, como AAV8 y AAV9, puede ser útil para superar estas respuestas inmunológicas en sujetos, y los ensayos clínicos acaban de comenzar (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00979238). Para la transferencia de genes a una célula hepática, se ha demostrado que un serotipo 5 de adenovirus o un serotipo 2, 7 u 8 de AAV son vectores efectivos y, por lo tanto, un serotipo de Ad o AAV preferido (Gao, Molecular Therapy (2006) 13, 77-87).

[0223] Un vector retroviral preferido para aplicación en la presente invención es un constructo de expresión basado en lentiviral. Los vectores lentivirales tienen la capacidad única de infectar células que no se dividen (Amado y Chen, 1999 Science 285: 674-6). Los métodos para la construcción y el uso de construcciones de expresión basadas en lentivirales se describen en las patentes de EE. UU. 6.165.782, 6.207.455, 6.218.181, 6.277.633 y 6.323.031 y en Federico (1999, Curr Opin Biotechnol 10: 448-53) y Vigna et al. (2000, J Gene Med 2000; 2: 308-16).

[0224] En general, los vectores de terapia génica serán los vectores de expresión descritos anteriormente en el sentido de que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de la invención a expresar, por lo que una secuencia de nucleótidos está operativamente unida a las secuencias reguladoras apropiadas como se indicó anteriormente.. Dicha secuencia reguladora comprenderá al menos una secuencia promotora. Los promotores adecuados para la expresión de una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de vectores de terapia génica incluyen, por ejemplo, citomegalovirus (CMV), promotor temprano intermedio, promotores de repetición terminal larga viral (LTR), como los del virus del sarcoma roso del virus de la mielina (MMLV), o HTLV-1, el promotor temprano del virus de simio 40 (SV 40) y el promotor de la timidina quinasa del virus del herpes simple. Los promotores adecuados se describen a continuación.

[0225] Varios sistemas de promotores inducibles se han descrito que pueden ser inducidos por la administración de compuestos orgánicos o inorgánicos pequeños. Dichos promotores inducibles incluyen aquellos controlados por metales pesados, como el promotor de metalotionina (Brinster et al. 1982 Nature 296: 39-42; Mayo et al. 1982 Cell 29: 99-108), RU-486 (un antagonista de progesterona). (Wang et al. 1994 Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 91: 8180-8184), esteroides (Mader y White, 1993 Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 90: 5603-5607), tetraciclina (Gossen y Bujard 1992 Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 89: 5547-5551; Patente de Estados Unidos Nº 5.464.758; Furth et al. 1994 Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 91: 9302-9306; Howe y otros 1995 J Biol. Chem. 270: 14168-14174; Resnitzky et al. 1994 Mol. Cell. Biol. 14: 1669-1679; Shockett et al., 1995 Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 92: 6522-6526) y El sistema tTAER que se basa en el compuesto transactivador multi-quimérico por un polipéptido tetR, como dominio de activación de VP16, y un dominio de unión a ligando de un receptor de estrógeno (Yee et al., 2002, US 6,432,705).

[0226] Los promotores adecuados para las secuencias de nucleótidos que codifican ARN pequeños para Knock abajo de genes específicos por interferencia de ARN (véase más adelante) incluyen, además de los mencionados promotores de la polimerasa II anterior, polimerasa III promotores. La ARN polimerasa III (pol III) es responsable de la síntesis de una gran variedad de ARN pequeños no codificantes nucleares y citoplásmicos, incluidos 5S, U6, adenovirus VA1, bóveda, ARN de telomerasa y ARNt. Las estructuras promotoras de un gran número de genes que codifican estos ARN se han determinado y se ha encontrado que los promotores de ARN pol III se dividen en tres tipos de estructuras (para una revisión, véase Geiduschek y Tocchini-Valentini, 1988 Annu. Rev. Biochem. 57) : 873-914; Willis, 1993 Eur. J. Biochem. 212: 1-11; Hernández, 2001, J. Biol. Chem. 276: 26733-36). Particularmente adecuados para la expresión de los ARNip son el tipo 3 de los promotores de ARN pol III, por lo que la transcripción es dirigida por elementos que actúan en cis que se encuentran solo en la región flanqueante 5', es decir, corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción. Los elementos de secuencia ascendente incluyen una caja TATA tradicional (Mattaj et al., 1988 Cell 55, 435-442), elemento de secuencia proximal y un elemento de secuencia distal (DSE; Gupta y Reddy, 1991 Nucleic Acids Res. 19, 2073-2075). Ejemplos de genes bajo el control del promotor pol III de tipo 3 son los genes U6 ARN pequeño ARN (U6 snRNA), 7SK, Y, MRP, HI y telomerasa ARN (véase, por ejemplo, Myslinski et al., 2001, Nucl. Acids Res. 21 : 2502-09).

[0227] Un vector de terapia génica puede comprender opcionalmente un segundo o uno o más secuencia de nucleótidos que codifica para un segundo o más polipéptido. Un segundo o más polipéptido puede ser un polipéptido marcador (seleccionable) que permita la identificación, selección y/o selección de células que contienen el constructo de expresión. Las proteínas marcadoras adecuadas para este propósito son, por ejemplo, la proteína fluorescente GFP y los genes marcadores seleccionables HSV timidina quinasa (para selección en medio HAT), higromicina B fosfotransferasa bacteriana (para selección en higromicina B), aminoglucósido fosfotransferasa Tn5 (para selección en G418), y dihidrofolato reductasa (DHFR) (para selección en metotrexato), CD20, el gen del factor de crecimiento nervioso de baja afinidad. Las fuentes para obtener estos genes marcadores y los métodos para su uso se encuentran en Sambrook y Russel (2001), "Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3ª edición), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York.

[0228] Alternativamente, una segunda secuencia de nucleótidos o más puede codificar un polipéptido que proporciona un mecanismo a prueba de fallas que permite que un sujeto de las células transgénicas se cure, si se considera necesario. Dicha secuencia de nucleótidos, a menudo denominada gen suicida, codifica un polipéptido que es capaz de convertir un profármaco en una sustancia tóxica que puede matar las células transgénicas en las que se expresa el polipéptido. Los ejemplos adecuados de dichos genes suicidas incluyen, por ejemplo, el gen de la citosina desaminasa de *E. coli* o uno de los genes de la timidina quinasa del virus del herpes simple, el citomegalovirus y el virus Varicella-Zoster, en cuyo caso se puede usar ganciclovir como profármaco para matar el transgénico IL-10 células en el sujeto (véase, por ejemplo, Clair et al., 1987, Antimicrob. Agents Chemother. 31: 844-849).

[0229] Para reducir la expresión de un polipéptido específico, se utiliza un vector de terapia génica u otro constructo de expresión para la expresión de una secuencia de nucleótidos deseada que codifica preferiblemente un agente de ARNi, es decir, una molécula de ARN que es capaz de interferencia de ARN o que es parte de una molécula de ARN que es capaz de interferencia de ARN. Dichas moléculas de ARN se denominan ARNsi (ARN de interferencia corta, que incluye, por ejemplo, un ARN de horquilla corta). Alternativamente, una molécula de ARNip puede directamente, por ejemplo, en una composición farmacéutica que se administra dentro o en la vecindad de una célula que expresa Lgr5, o de una célula hepática (es decir, hepatocito o colangiocito) o de un organoide hepático.

[0230] Una secuencia de nucleótidos deseada comprende un ADN que codifica código antisentido para el ARN antisentido dirigido contra una región del ARNm del gen diana, y/o un ADN que codifica código de sentido para el ARN de sentido dirigido contra la misma región del ARNm del gen diana. En un constructo de ADN de la invención, un ADN codificado con sentido y antisentido está unido operativamente a uno o más promotores como se define aquí anteriormente, que son capaces de expresar un antisentido y ARNs de sentido, respectivamente. "ARNip" significa preferiblemente un ARN pequeño de interferencia que es un ARN de doble cadena de longitud corta que no es tóxico en células de mamíferos (Elbashir et al., 2001, Nature 411: 494-98; Caplen et al., 2001, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 98: 9742-47). La longitud no está necesariamente limitada a 21 a 23 nucleótidos. No hay una limitación particular en la longitud del ARNsi siempre que no muestre toxicidad. Los "ARNip" pueden tener, por ejemplo, al menos 15, 18 o 21 nucleótidos y hasta 25, 30, 35 o 49 nucleótidos de longitud. Alternativamente, la porción de ARN de doble cadena de un producto de transcripción final de siARN que debe expresarse puede tener, por ejemplo, al menos 15, 18 o 21 nucleótidos y hasta 25, 30, 35 o 49 nucleótidos de longitud.

[0231] "ARN antisentido" es preferiblemente una cadena de ARN que tiene una secuencia complementaria a un ARNm del gen diana, y se piensa que induce ARNi mediante la unión al ARNm del gen diana. "ARN sentido" tiene una secuencia complementaria al ARN antisentido, y se recuece a su ARN antisentido complementario para formar ARNsi. El término "gen diana" en este contexto se refiere preferiblemente a un gen cuya expresión debe silenciarse debido a que el ARNsi debe expresarse por el presente sistema, y puede seleccionarse arbitrariamente. Como este gen diana, por ejemplo, los genes cuyas secuencias se conocen pero cuyas funciones aún no se han dilucidado, y los genes cuyas expresiones se cree que causan enfermedades se seleccionan preferiblemente. Un gen diana puede ser uno cuya secuencia genómica no se haya aclarado completamente, siempre y cuando una secuencia parcial de ARNm

del gen tenga al menos 15 nucleótidos o más, que sea una longitud capaz de unirse a una de las cadenas (cadena de ARN antisentido).) de siRNA, se ha determinado. Por lo tanto, los genes, las etiquetas de secuencia expresada (EST) y las porciones de ARNm, de las cuales alguna secuencia (preferiblemente al menos 15 nucleótidos) se han dilucidado, pueden seleccionarse como el "gen diana" incluso si no se han determinado sus secuencias de longitud completa.

[0232] Las porciones de ARN bicatenario de los ARNip en las que dos cadenas de ARN se emparejan no se limitan a las pareadas completamente, y pueden contener porciones no apareadas debido a un desajuste (los nucleótidos correspondientes no son complementarios), abombamiento (no presente en el correspondiente nucleótido complementario en una hebra), y similares. Se pueden contener partes que no se emparejan en la medida en que no interfieran con la formación de ARNip. La "protuberancia" usada en el presente documento comprende preferiblemente de 1 a 2 nucleótidos no emparejados, y la región de ARN bicatenario de los ARNip en los que dos pares de cadenas de ARN contienen preferiblemente de 1 a 7, más preferiblemente de 1 a 5 protuberancias. Además, la "falta de coincidencia" utilizada en el presente documento está contenida preferiblemente en la región de ARN bicatenario de los ARNip, en la que dos cadenas de ARN se emparejan, preferiblemente de 1 a 7, más preferiblemente de 1 a 5, en número. En un desajuste preferible, uno de los nucleótidos es guanina, y el otro es uracilo. Tal desajuste se debe a una mutación de C a T, G a A, o mezclas de las mismas en el ADN que codifica el ARN sentido, pero no se limita particularmente a ellos. Además, una región de ARN de doble cadena de ARNsi en la que dos cadenas de ARN se emparejan puede contener tanto protuberancia como no coincidentes, que suman, preferiblemente de 1 a 7, más preferiblemente de 1 a 5 en número. Dichas partes no emparejadas (desajustes o protuberancias, etc.) pueden suprimir la recombinación descrita a continuación entre los ADN codificados con sentido y antisentido y hacer que el sistema de expresión de ARNip como se describe a continuación sea estable. Además, aunque es difícil secuenciar el ADN del bucle de tallo que no contiene una porción no emparejada en la región de ARN bicatenario de los ARNip en los que se emparejan dos cadenas de ARN, la secuenciación se habilita introduciendo desajustes o protuberancias como se describió anteriormente. Además, los ARNip que contienen desajustes o protuberancias en el emparejamiento de la región del ARN de doble cadena tienen la ventaja de ser estables en *E. coli* o en células animales.

[0233] La estructura de la terminal de ARNsi puede ser roma o cohesiva (en voladizo), siempre que ARNsi permite que se silencie la expresión del gen diana debido a su efecto de ARNi. La estructura del extremo cohesivo (sobresaliente) no se limita solo al voladizo 3', y la estructura sobresaliente 5' puede incluirse siempre que sea capaz de inducir el efecto ARNi. Además, el número de nucleótidos que sobresalen no se limita a los 2 o 3 ya informados, sino que puede ser cualquier número siempre que el saliente sea capaz de inducir el efecto ARNi. Por ejemplo, el saliente consiste en 1 a 8, preferiblemente 2 a 4 nucleótidos. En este documento, la longitud total de ARNsi que tiene una estructura de extremo cohesivo se expresa como la suma de la longitud de la porción de doble hebra emparejada y la de un par que comprende cadenas simples colgantes en ambos extremos. Por ejemplo, en el caso de una porción de ARN de doble cadena de 19 pb con 4 sobresalientes de nucleótidos en ambos extremos, la longitud total se expresa como 23 pb. Además, dado que esta secuencia que sobresale tiene una baja especificidad para un gen diana, no es necesariamente complementaria (antisentido) o idéntica (sentido) a la secuencia del gen diana. Además, siempre que el ARNsi sea capaz de mantener su efecto de silenciamiento génico en el gen objetivo, el ARNsi puede contener un ARN de bajo peso molecular (que puede ser una molécula de ARN natural, como ARNt, ARNr o ARN viral, o una molécula de ARN artificial), por ejemplo, en la parte sobresaliente en su un extremo.

[0234] Además, la estructura terminal del "ARNip" es necesariamente la estructura recortada en ambos extremos como se describió anteriormente, y puede tener una estructura tallo-bucle en la que los extremos de un lado del ARN bicatenario están conectados por una ARN enlazador (un "ARNsh"). La longitud de la región de ARN de doble cadena (porción tallo-bucle) puede ser, por ejemplo, al menos 15, 18 o 21 nucleótidos y hasta 25, 30, 35 o 49 nucleótidos de longitud. Alternativamente, la longitud de la región de ARN de doble cadena que es un producto de transcripción final de los ARNip a expresar es, por ejemplo, de al menos 15, 18 o 21 nucleótidos y hasta 25, 30, 35 o 49 nucleótidos de longitud. Además, no hay ninguna limitación particular en la longitud del enlazador siempre que tenga una longitud que no impida el emparejamiento de la parte del vástago. Por ejemplo, para el emparejamiento estable de la porción del tallo y la supresión de la recombinación entre los ADN que codifican la porción, la porción del enlazador puede tener una estructura de ARNt de hoja de trébol. Aunque el enlazador tiene una longitud que dificulta el emparejamiento de la porción del tallo, es posible, por ejemplo, construir la porción del enlazador para incluir intrones de modo que los intrones se eliminen durante el procesamiento del ARN precursor en el ARN maduro, permitiendo así el emparejamiento del ARN. parte del tallo En el caso de un ARNip de tallo-bucle, cualquiera de los extremos (cabeza o cola) de ARN sin estructura del bucle puede tener un ARN de bajo peso molecular. Como se describió anteriormente, este ARN de bajo peso molecular puede ser una molécula de ARN natural tal como ARNt, ARNr, ARNsn o ARN viral, o una molécula de ARN artificial.

[0235] Para expresar ARN antisentido y sentido de ADN de código antisentido y sentido, respectivamente, una construcción de ADN comprende un promotor como se define anteriormente. El número y la ubicación del promotor en el constructo pueden, en principio, seleccionarse arbitrariamente, siempre que sea capaz de expresar ADN codificados con sentido y sentido. Como un ejemplo simple de una construcción de ADN, se puede formar un sistema de expresión en tándem, en el que un promotor se ubica corriente arriba de los ADN de código de sentido y antisentido. Este sistema de expresión en tándem es capaz de producir ARNsi que tienen la estructura de corte mencionada

anteriormente en ambos extremos. En el sistema de expresión de ARNip de tallo-bucle (sistema de expresión de tallo), los ADN codificados con sentido y antisentido se disponen en la dirección opuesta, y estos ADN se conectan a través de un ADN enlazador para construir una unidad. Un promotor está vinculado a un lado de esta unidad para construir un sistema de expresión de ARNip de tallo-bucle. Aquí, no hay ninguna limitación particular en la longitud y secuencia del ADN enlazador, que puede tener cualquier longitud y secuencia siempre que su secuencia no sea la secuencia de terminación, y su longitud y secuencia no impidan el emparejamiento de la porción del tallo durante la maduración. Producción de ARN como se describe anteriormente. Como ejemplo, el ADN que codifica para el ARNt_c mencionado anteriormente y tal se puede usar como un ADN enlazador.

[0236] En ambos casos de sistemas de expresión tándem y tallo-bucle, el extremo 5' puede ser una secuencia capaz de promover la transcripción a partir del promotor. Más específicamente, en el caso de ARN_{si} en tándem, la eficiencia de la producción de ARN_{si} puede mejorarse agregando una secuencia capaz de promover la transcripción de los promotores en los extremos 5' de los ADN codificados con sentido y sentido. En el caso del ARNip de tallo-bucle, esta secuencia se puede agregar en el extremo 5' de la unidad descrita anteriormente. Una transcripción de una secuencia de este tipo puede usarse en un estado de unión al ARN_{si} siempre que el silenciamiento del gen diana por ARN_{si} no esté obstaculizado. Si este estado dificulta el silenciamiento del gen, es preferible realizar el recorte de la transcripción utilizando un medio de recorte (por ejemplo, ribozima como se conoce en la técnica). Estará claro para la persona experta que los ARN antisentido y sentido pueden expresarse en el mismo vector o en vectores diferentes. Para evitar la adición de secuencias en exceso corriente abajo de los ARN sentido y antisentido, se prefiere colocar un terminador de la transcripción en los extremos 3' de las cadenas respectivas (cadenas que codifican ARN sentido y antisentido). El terminador puede ser una secuencia de cuatro o más nucleótidos de adenina (A) consecutivos.

[0237] En este documento y en sus reivindicaciones, el verbo "comprender" y sus conjugaciones se usa en su sentido no limitativo para significar que los artículos siguientes de la palabra están incluidos, pero los elementos no mencionados específicamente no son excluidos. Además, el verbo "consistir" puede ser reemplazado por "consistir esencialmente de", lo que significa que un producto como se define en este documento puede comprender componentes adicionales a los identificados específicamente, dichos componentes adicionales no alteran el carácter único. Además, un método como se define en este documento puede comprender pasos adicionales a los identificados específicamente, dichos pasos adicionales no alteran la característica única de la invención. Además, se hace referencia a un elemento por el término indefinido. El artículo "un" o "una" no excluye la posibilidad de que más de uno de los elementos esté presente, a menos que el contexto requiera claramente que haya uno y solo uno de los elementos. El artículo indefinido "un" o "una" así por lo general significa "al menos uno". La palabra "aproximadamente" o "alrededor de" cuando se usa en asociación con un valor numérico (alrededor de 10) significa preferiblemente que el valor puede ser el valor dado de 10 más o menos el 1% del valor.

[0238] Los siguientes ejemplos se ofrecen para fines ilustrativos, y no pretenden limitar el alcance de la presente invención de ninguna manera.

DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

[0239]

Fig. 1 Requerimiento de factor de crecimiento de organoides hepáticos. (A) Imágenes DIC de organoides hepáticos mantenidos con EGF (E), R-espondina 1 (R), Noggin (N), medios acondicionados con Wnt3 (W) o la combinación de ellos, complementados con FGF10, HGF y nicotinamida. (B) El número de organoides se contó semanalmente y se pasó cuando se requirió. Los resultados se muestran como media 6 SEM de 3 experimentos independientes. (C) Análisis de la expresión génica por RTPCR de los genes Lgr5, Keratina 7 (K7) y Albúmina (Alb). (D) Conductos bílicos aislados que crecen en organoides. Imágenes de contraste de interferencia diferencial de los días correspondientes después de la siembra. Ampliación 10x (días 0, 1, 3 y 5). Días 15 en ampliación 4x. Los cultivos se pasaron cada 4-7 días por disociación mecánica. Los cultivos se han cultivado al menos durante 8 meses.

Fig. 2 Morfología de los organoides hepáticos. (A) Paneles superiores: sección de parafina de un hígado de ratón que muestra los diferentes dominios (PT = tríada portal, CV = vena central). Paneles inferiores: sección de parafina de un organoide hepático que muestra diferentes dominios b (epitelios de una sola capa) y h (epitelios estratificados) (B) Panel derecho: tinción de ecaderina en los organoides del hígado. Se pueden identificar dos dominios diferentes. Dominio b, formado por un epitelio de una sola capa que se asemeja a las estructuras de los conductos biliares en el hígado. Este dominio del conducto biliar está formado por células altamente polarizadas que muestran una tinción positiva para la pancitina (PCK) (panel inferior). Los paneles de la izquierda muestran la presencia de un segundo dominio dentro de los organoides del hígado. Este dominio h está formado por un epitelio estratificado con células no polarizadas. Las células están organizadas alrededor de un lumen central y expresan el marcador de hepatocitos Alb. Ampliación 10 x.

Fig. 3 Señalización Wnt en los cultivos hepáticos. La expresión de Lac Z se detectó en cultivos derivados de ratones Lgr5-LacZ o Axin2 LacZ. No se detectó tinción positiva en cultivos de hígado derivados de ratones

B16. Ampliación 4x, inserto 20x.

Fig. 4 Expresión de marcadores diferenciadores del hígado. (A) análisis inmunohistoquímico e inmunofluorescencia de la expresión del marcador de colangiocitos queratina 7 (K7) y los marcadores de hepatocitos queratina 8 (K8) y albúmina (Alb). (B) análisis de la expresión génica de marcadores de hepatocitos: albúmina (Alb), transtiretrina (Ttr), glutamina sintetasa (Glul), glucosa 6 fosfatasa (G6P) y citocromo p450 isoforma 3A11 (CYP3A11); y los marcadores de colangiocitos queratina 7 (K7) y queratina 19 (K19).

Fig. 5 Cultivos unicelulares de hígado. (A) diagrama de citometría de flujo que indica el área de las células clasificadas. (B) células individuales que crecen en organoides en los puntos de tiempo indicados. Ampliación 40 x (día 1-3), 10x (día 16), 4 x (día 21 en adelante). (C & D) imagen representativa de la eficiencia de formación de colonias de células clasificadas individuales de Lgr5GFP. Se sembraron 100 células por triplicado y se contaron las colonias 10 días después.

Fig. 6 Análisis de micromatrices de los cultivos hepáticos. Análisis del perfil de expresión génica del tejido hepático adulto y de los cultivos de organoides hepáticos mantenidos durante 1 mes en los medios ER o ER suplementados con Noggin (ENR) o con noggin y Wnt (ENRW). El perfil genético se comparó entre las diferentes muestras y el perfil genético del tejido adiposo blanco (WAT) del tejido adiposo de la frente, músculo e hígado recién nacido. (A) análisis de mapa de éxito que muestra que los cultivos presentan un perfil similar al del hígado adulto, pero un perfil diferente a los tejidos no relacionados con el hígado como músculo y BAT y WAT, (B) Lista de marcadores de hepatocitos y marcadores de colangiocitos en las diferentes afecciones.

Figura 7: El cultivo de organoides en el hígado del ratón muestra un cariotipo estable después del cultivo a largo plazo.

A - Imágenes DIC de organoides hepáticos mantenidos en EGF (E) y R-espondina 1 (R), complementados con FGF10, HGF y nicotinamida (figura izquierda, ER) o mantenidos en la misma combinación complementada con Noggin (N) y Wnt3A condicionados media (W) (figura derecha, ENRW) por un período de 24 meses.

B - Análisis de cariotipo de organoides de hígado de ratón después de 8 meses en cultivo. Se encontraron recuentos cromosómicos normales (n = 40, figura del panel izquierdo) y poliploidía, una característica típica de hepatocitos (n = 80, figura del panel derecho)

Figura 8: Factores suplementarios FGF10, HGF y nicotinamida; Efecto sobre el crecimiento y la diferenciación.

A - Diagrama que representa los genes expresados diferencialmente durante las 3 etapas del desarrollo del hígado, desde hepatoblastos hasta hepatocitos maduros.

B - Esquema que muestra el protocolo utilizado. Los cultivos se sembraron en medio de expansión EM2 (ERFHNic: EGF (E) y R-espondina 1 (R), suplementado con FGF10, HGF y nicotinamida; ERFHNic se indica como "ER" en la Figura 8B) 2 días antes del experimento. Dos días después, los medios de cultivo se cambiaron a EGF (E) solo o EGF suplementado con R-espondina 1 (ER) con o sin suplementos adicionales elegidos entre FGF10 (F) o HGF (H) o Nicotinamida (Nic) o una combinación de estos a las concentraciones indicadas en el texto. Cinco días después, los cultivos se dividieron y se replantearon en una proporción de 1:4 para cada condición. En estas condiciones, los cultivos se dividieron y se replantearon cada 7 días durante un período total de 10 semanas.

C - Primer día después de la primera división en cada una de las condiciones de cultivo probadas. Los resultados muestran que EGF y R-espondina 1 combinados con FGF10 o HGF o Nicotinamida o una combinación de estos son esenciales para lograr al menos 1 pase.

D - Después de un cultivo a largo plazo, la combinación de ER complementada con FNic o ER complementada con FHNic, ambas dan como resultado un alto número de pases. Después del paso 10, la tasa de crecimiento es mejor para la condición de cultivo, incluidos los 3 factores suplementarios; ERFHNic (figura 15A, B).

E - Análisis de RT-PCR que muestra la expresión de diferentes marcadores de hepatocitos (CYP3A11, Alb, FAH) y marcador de colangeocitos (K19) y marcador de células madre IGR5 5 días después de la retirada de ciertos factores (el punto de partida fue ERFHNic). Tenga en cuenta que solo la condición EF mostró la expresión de todos los marcadores de hepatocitos probados. HPRT se utilizó como un gen de mantenimiento para normalizar la expresión génica.

Figura 9: Tabla que muestra la cuantificación de diferentes factores de transcripción específicos de hepatocitos y colangiocitos en células de tres diferentes condiciones de cultivo hepático y en tejido hepático adulto. También se muestra la expresión de los componentes clave de las vías de señalización Notch y TGF-beta. E = EFHNic, ER = ERFHNic, ENRW = ENRW- FHNic.

Figura 10: Protocolo de diferenciación.

A - Esquema que muestra el protocolo utilizado. Los cultivos se sembraron en medio de expansión (ERFHNic: EGF (E) y R-espondina 1 (R), suplementado con FGF10, HGF y nicotinamida; ERFHNic se indica como "ER" en la Figura 10A) 2 días antes del experimento. Dos días después, los medios de cultivo se cambiaron a EGF (E) suplementado con A8301 (A), o DAPT (D), o FGF10 (F) o HGF (H) o Nicotinamida (Nic) o R-espondina 1 (R) o Wnt3A o Noggin (N) o una combinación de estos en las concentraciones mostradas. El ARN se aisló en varios puntos de tiempo. El tejido hepático del ratón se tomó como control positivo (+) mientras que el agua se tomó como control negativo (-).

B - Análisis de RT-PCR que muestra la expresión de los marcadores de hepatocitos CYP3A11, Alb, FAH, tbx3, TAT y Gck 7 días después de las condiciones de diferenciación. Tenga en cuenta que solo la condición EADF mostró una expresión de todos los marcadores de hepatocitos analizados. HPRT se utilizó como un gen de mantenimiento para normalizar la expresión génica.

C - Análisis de la expresión en el tiempo después de las condiciones de diferenciación. En los días 2, 5 y 8 días después de la diferenciación, la expresión de los marcadores de hepatocitos CYP3A11, Alb, FAH y el marcador de colangio K19 se analizó mediante RTPCR. Tenga en cuenta que la expresión de los marcadores hepáticos CYP3A11 y FAH comienza en el día 5 y alcanza su punto máximo en el día 8 después. HPRT se utilizó como un gen de mantenimiento para normalizar la expresión génica. UNA; A8301, D; DAPT, F; FGF10, H; HGF, De; Dexametasona

D - Experimento de titulación que muestra la expresión de los marcadores de hepatocitos CYP3A11, Alb, FAH, tbx3, TAT, G6P y Gck 7 días después de diferentes concentraciones de los compuestos de diferenciación A y D. Se utilizó HPRT como gen de mantenimiento para normalizar la expresión génica.

E - Tinción inmunofluorescente para los marcadores hepáticos K19, albúmina y marcador de superficie de hepatocitos. Hoeschst fue utilizado para teñir los núcleos.

F - Tinción con Xgal en organoides derivados del hígado de ratones Albcreert2LacZ. Se detectaron células positivas a albúmina (flechas) después de la diferenciación de EADF en cultivos derivados de albcreert2LacZ inducidos por tamoxifeno.

Figura 11: Cultivos de hígado derivados de humanos en condiciones de cultivo ERFHNIC

Figura 12: Respuesta del hígado a la estimulación de señalización de Wnt en condiciones fisiológicas o durante la regeneración después de una lesión

A: La inyección de ligando de Lgr5 R-espondina1 en ratones Axin2 LacZ muestra que las células hepáticas responden a la estimulación con Wnt (flechas que apuntan a células positivas para X-gal). No hubo expresión de Lgr5, por lo que los inventores suponen que se utilizó Lgr4 para iniciar la respuesta.

B: la inyección de CCL4 en ratones Axin2 LacZ muestra que durante la respuesta de regeneración se activa la señalización Wnt

Figura 13: Regulación al alza de Lgr5 después del modelo de regeneración de lesión hepática.

Se inyectaron ratones adultos Lgr5-LacZ KI con 0,8 ml/kg del compuesto hepatotóxico CCL4. Las imágenes muestran que en hígados no inyectados (no dañados) la vía Wnt está activa solo en las células que recubren los conductos. Después del daño por las células CCL4, también las células que no recubren el conducto tienen una ruta Wnt activada.

A - Experimento en el curso del tiempo que muestra la regulación positiva de Lgr5 en hígados dañados por CCL4 (flechas que muestran células positivas para x-gal). Los ratones WT de control con CCL4 inyectados y los ratones Lgr5LacZ Ki inyectados con placebo no mostraron ninguna tinción (panel de la derecha).

B - Lgr5 co-tinción con marcadores hepáticos.

Figura 14: Tinción aislada del conducto para K19

Aislamiento de conductos Lgr5LacZ. La tinción con K19 confirma que las estructuras aisladas y sembradas son de hecho conductos intrahepáticos.

Figura 15: Requisito de factor de crecimiento

Los 3 factores complementarios (FGF10, HGF y nicotinamida) son esenciales para el mantenimiento a largo plazo de los cultivos de hígado. Después del cultivo a largo plazo, la combinación de ER, incluyendo FNic (\$) o ERFHNic (\$\$), da como resultado un alto número de pases. Después del paso 10, la tasa de crecimiento es mejor para la condición de cultivo, incluidos los 3 factores suplementarios; ERFHNic (ver figura 16B).

Figura 16: El perfil de expresión génica de los organoides hepáticos de ratón en condiciones de diferenciación se asemeja al perfil hepático del adulto y del recién nacido

A - Grupos de genes que muestran los genes expresados de manera similar (a) o anulados de manera similar (b) entre la condición de diferenciación EADF y el hígado adulto o recién nacido.

B - Grupos de genes que muestran los genes expresados diferencialmente entre los organoides del hígado y el hígado adulto o recién nacido (a) y los genes expresados de manera similar entre EADF y el hígado recién nacido (b).

C - Datos de señal bruta de un análisis de micromatrices, que comparan los niveles de expresión de marcadores ductales seleccionados, factores de transcripción necesarios para la expresión de Ngn3 y marcadores endocrinos en el hígado adulto, páncreas adulto, panes de organoides y organoides de hígado en medios de expansión.

Figura 17: Trasplante de células al modelo de ratón de enfermedad hepática.

Los organoides fueron trasplantados en el modelo de ratón: ratones FGR adultos (FAH -/- RAG -/- IL2R -/-). Los hepatocitos se trasplantaron a los ratones como control.

A - K19 células positivas (panel superior izquierdo) y células Fah positivas (panel medio) derivadas de los organoides hepáticos trasplantados en ratones knock out para FAH. Control de trasplante de hepatocitos (panel superior derecho). Las gráficas de citometría de flujo inferior muestran que el% de células positivas para hepatocitos fue mayor en el grupo que dio lugar a hepatocitos injertados en FAH positivos.

C & D - Análisis de citometría de flujo de células trasplantadas. (C) Clon 1, obtenido de ratón Lgr5-GFP, y (D) clon 2, obtenido de ratón Lgr5-lacZ. El marcador de la superficie de los hepatocitos muestra una subpoblación positiva que comprende células grandes y células altamente granulares, es decir, células que representan el fenotipo de los hepatocitos maduros.

E - Horario de trasplante.

Figura 18: Genes distintivos del hígado del ratón

Tabla que muestra a) marcadores expresados en células madre de hígado de ratón; b) marcadores no expresados en células madre de hígado de ratón; c) marcadores de hepatocitos y colangiocitos expresados en la firma de células madre del hígado de ratón para organoides de hígado de ratón en medios de expansión; d) marcadores de hepatocitos y colangiocitos no expresados en la firma de células madre del hígado de ratón para organoides de hígado de ratón en medios de expansión; e) reprogramación de genes expresados en organoides de hígado de ratón; f) genes de reprogramación no expresados en organoides de hígado de ratón. Los resultados se obtuvieron utilizando una micromatriz de hígado utilizando el ARN de referencia de ratón universal (Stratagene, n° de catálogo 740100) como un ARN de referencia. Si las cifras absolutas detectadas eran inferiores a 100, el gen se consideraba como no detectado.

Figura 19: Genes distintivos del hígado humano

Tabla que muestra los resultados de la micromatriz hepática de organoides humanos. De izquierda a derecha, los resultados se muestran para a) medio de expansión EM1, b) medio de expansión EM2, c) medio de diferenciación, d) hígado adulto.

Los números (log2) en las cuatro columnas de la izquierda son el resultado de una comparación entre la muestra y una muestra de ARN de referencia (comercial) que se utiliza para todas las matrices. Se muestra

la expresión relativa de ARNm en cada muestra en comparación con el ARN presente en la muestra de referencia. El ARN de referencia utilizado fue el ARN de referencia humano universal (Stratagene, número de catálogo 740000). Por lo tanto, los números negativos en estas columnas no se relacionan con los niveles de expresión reales, solo significa que hay menos de ese ARN en la muestra de referencia. Las 4 columnas de la derecha son cifras absolutas. Si están por debajo de 100, se consideran como no detectados.

EJEMPLOS

Ejemplo 1 - Un medio de expansión para el crecimiento y la expansión de los organoides hepáticos

[0240] Después del aislamiento, los conductos biliares (ver Fig. 1) se suspendieron en Matrigel y se cultivaron en diferentes condiciones de factores de crecimiento. La combinación de EGF (50 ng/ml) y R-espondina 1 (lug/ml) suplementada con FGF10 (100 ng/ml), HGF (25-50 ng/ml) y nicotinamida (1-10 mM), (ERFHNic) fue esencial para el mantenimiento a largo plazo de los cultivos, lo que indica que la señalización Wnt y la señalización EGF son estrictamente necesarias para mantener la proliferación de progenitores hepáticos adultos *in vitro*. La adición de medios acondicionados con Noggin (100 ng/ml) y Wnt (50%) también mostró un mantenimiento a largo plazo de los cultivos (ver Figs. 1A y 1B). Bajo estas condiciones que apoyaron el mantenimiento a largo plazo, la expresión de Lgr5 así como los marcadores de hepatocitos (albúmina) y los marcadores de colangiocitos (K7) se detectaron mediante RT-PCR (ver Fig. 1C). En estas condiciones, los organoides del hígado se han pasado semanalmente por disociación mecánica o enzimática, a dilución 1: 8, y se han cultivado durante muchos meses (Fig. 1D).

[0241] Se analizó la expresión de los genes diana Wnt Axin2 y Lgr5 en los cultivos. Los cultivos de ambos hígados Axin2LacZ y Lgr5-LacZ revelaron la presencia de células positivas para Axin2 y Lgr5 en los organoides del hígado 1 mes después de la siembra, lo que confirma que la señalización de Wnt es activa y necesaria para el crecimiento del cultivo (Fig. 3). Los cultivos hepáticos también expresan marcadores de hepatocitos (p. Ej., Albúmina, transtiretrina, glutamina sintetasa) y fabricantes de colangiocitos (queratina 7 y 19) (ver Fig. 4).

[0242] Cuando se clasificaron células Lgr5 individuales de un ratón Lgr5LacZ o Lgr5GFP, las colonias individuales se convirtieron en organoides. Estos cultivos también expresan marcadores de los linajes de colangiocitos y hepatocitos y se han mantenido y dividido regularmente en 1:6-1:8 durante más de 4 meses (ver Figs. 5A y B). Curiosamente, solo los cultivos derivados de células Lgr5 positivas se convirtieron en organoides (Figs. 5C y D). Estos datos indican que las células Lgr5 son células progenitoras de estos cultivos y capaces de propagar la progenie de los 2 linajes hepáticos diferentes.

[0243] Habiendo establecido que los organoides del hígado se derivan de células Lgr5+ve, nos propusimos determinar su firma génica individual en comparación con la firma hepática del adulto. El ARN se aisló de hígado adulto y de organoides hepáticos cultivados en medios ER o ENRW suplementados con FGF10, nicotinamida y factor de crecimiento de hepatocitos. La firma genética del hígado adulto y las 2 condiciones de cultivo hepático se derivaron posteriormente a través de un perfil de expresión génica comparativa con respecto a la expresión de una referencia de ARN universal. El uso del mismo ARN de referencia para la hibridación con todas las muestras nos permitió comparar las 3 muestras independientes entre ellas (hígado adulto, ER y ENRW). El análisis del mapa de calor reveló que el perfil de expresión de ambas condiciones de cultivo se parece mucho al perfil de expresión del tejido hepático adulto, mientras que no comparten el mismo perfil en comparación con el perfil del tejido muscular o adiposo (ver Fig. 6). Entre el perfil de expresión génica similar entre el hígado adulto y los cultivos de hígado, se detectan genes específicos del hígado como HNF1a, HNF1b, HNF4, Alb, Glul, Met, G6P, Fahd1a, Fahd2a, CYP4B1, K7 y K19. El análisis del mapa de calor revela que ambas condiciones de cultivo presentan un patrón de expresión similar entre sí y en comparación con la muestra de hígado adulto. Sin embargo, al analizar los datos en detalle, podemos observar que la condición sin Wnt y sin noggin muestra un patrón más diferenciado que la condición que incluye ambos factores de crecimiento. Esto está de acuerdo con los datos mostrados en la Fig. 1C donde la diferenciación de hepatocitos (por medio de la expresión de albúmina) está casi ausente en presencia de Wnt. Este resultado indicaría que Wnt está favoreciendo la auto-renovación del cultivo en detrimento de la diferenciación.

[0244] Además, en ambas condiciones de cultivo, así como en el hígado adulto, se pueden detectar genes de hígado adulto no específicos como AFP, y factores de transcripción no hepáticos como Pdx1 o NeuroD.

[0245] Es notable que, en ambas condiciones de cultivo, pero no en el hígado adulto, el marcador de células madre Lgr5 fue uno de los genes más altamente enriquecidos en la firma de cultivo de hígado. Además, los marcadores celulares de las poblaciones progenitoras en el intestino delgado y el estómago como Cd44 y Sox9 (Barker & Huch et al Cell stem cell 2010) se expresaron en gran medida en ambas condiciones de cultivo pero no en el hígado adulto, lo que indica nuevamente la capacidad de auto renovación de los cultivos hepáticos así como el estado de reposo del hígado adulto normal.

[0246] Además, aparte de Lgr5, los genes diana de Wnt múltiples también estaban altamente regulados en los cultivos de hígado en comparación con el hígado adulto, incluyendo MMP7, Sp5 y Tnfrs19, entre otros, proporcionando una fuerte evidencia del requisito de una actividad activa y robusta de señalización de Wnt canónica para mantener la

capacidad de auto renovación de los cultivos.

Ejemplo 2 - Un medio de diferenciación mejorado

- 5 **[0247]** Bajo ER o ENRW, los cultivos de hígado se renuevan por sí mismos y se pueden mantener y expandir semanalmente, durante hasta 1 año (figura 7A). El análisis cariotípico después de 1 año no muestra evidencia de aberraciones cromosómicas. Más del 66% de las células analizadas presentaron recuentos cromosómicos normales y el 13% de ellas también mostraron poliploidía, un rasgo característico de los hepatocitos (Figura 7B).
- 10 **[0248]** La combinación de EGF (50 ng/ml) y R-espondina 1 (lug/ml) suplementado con FGF10 (100 ng/ml), HGF (25-50ng/ml) y la nicotinamida (110 mM), eran preferibles para el mantenimiento a largo plazo de los cultivos. Bajo estas condiciones, obtuvimos cultivos celulares de larga vida que expresan el conducto biliar y algunos marcadores de hepatoblastos o hepatoblastos inmaduros (Glul, Albumina). Sin embargo, el número de células positivas para estos marcadores de hepatocitos fue muy bajo. En estas condiciones de cultivo, no se detectaron marcadores de hepatocitos maduros (por ejemplo, citocromos p450). Estos resultados sugieren que las condiciones de cultivo descritas aquí facilitan la expansión de los progenitores hepáticos capaces de generar células similares a hepatocitos, aunque en números más bajos, pero no hepatocitos completamente maduros (Fig. 8A).
- 15 **[0249]** Para mejorar la naturaleza hepatocítica de los cultivos y obtener hepatocitos maduros *in vitro*, se determinó en primer lugar si los tres factores suplementarios (FGF10, HGF y nicotinamida) añadidos a EGF y R-espondina1 ejercían ya sea un efecto positivo o negativo sobre la expresión de hepatocitos, así como en la auto-renovación del cultivo. Generamos cultivos de organoides en el hígado y los cultivamos con EGF o EGF y R-espondina1 más FGF10 o HGF o Nicotinamida o la combinación de estos, y dividimos los cultivos una vez por semana durante un período total de 10 semanas. En cada punto temporal también analizamos la expresión de varios marcadores de hepatocitos maduros (FAH, CYP3A11) y marcadores de hepatoblastos (albúmina) (Figura 8B).
- 20 **[0250]** De acuerdo con los datos de la figura 1 (ver ejemplo 1), observamos que la R-espondina1 y la nicotinamida combinadas con FGF10 son esenciales para el crecimiento y la auto-renovación de los cultivos de hígado (Figura 8C y D). R-espondina1 y nicotinamida inhiben la expresión del marcador maduro CYP3A11 y, sin embargo, promueven la expresión de la albúmina del marcador hepatoblasto. La adición de FGF10 o HGF a los medios que contienen solo EGF (sin R-espondina1 y sin nicotina-mida), facilitó la expresión del marcador maduro CYP3A11, aunque a niveles muy bajos (figura 8E). Para identificar compuestos adicionales que podrían facilitar la diferenciación de hepatocitos, utilizamos dos enfoques diferentes, ambos basados en las condiciones básicas de: EGF + HGF y/o FGF10.
- 25 **[0251]** El primer enfoque implicó probar una serie de compuestos además del EGF + FGF10 o condición HGF. Una lista completa de los compuestos analizados se muestra en la tabla 2.
- 30
- 35
- 40

Tabla 2

Compuestos	Señal		Concentración	Resultado	
				A/b	CYP3A/b
Exendin4	Glucagón como péptido 2 análogo	Sigma e7144	0.1-1uM		
Ácido retinoico	Ligando del receptor RAR-RXR	Sigma	25nM		
Ácido Retinoico + Exendina 4					
Erizo Sonic		Invitrogen C25II	500-100ng/ml		
BMP4	Señalización BMP	Peptotech 120-05	20ng/ml		
DAPT	Inhibidor de la gamma-secretasa	Sigma d5942	10 nM		
A8301	Inhibidor Alk5/4/7	Tocris Bioscience 2939	50 nM		
DAPT + A8301				+++	+++
FGF4	Ligando FGFR1,2	Peptotec	50ng/ml		
FGF1	Ligando FGFR1,2,3,4	Peptotech 450-33A	100ng/ml		
Dexametasona		Sigma D4902 25MG	10 m M-1mM		
Oncostatina M (OSM)		R & D systems 495-MO- 025	10-1000 ng/ml		
FGF4 + OSM + Dexa					
IGF		peptotec	100ng/ml		
Ácido valproico	Inhibidor de la histona desacetilasa y regulador de las vías ERK, PKC Wnt/ β - catenina	Stemgent 04-0007	250 μ M		
Butirato de sodio	Inhibidor de la histona desacetilasa	Stemgent 04-0005	250 μ M		
BIX01294	G9a HMTasa inhibidor	Stemgent 04-0002	1 μ M		
RG 108	Inhibidor del ADN metiltransferasa	Stemgent 04-0001	1 μ M		
TSA			100 nM	+	-
Hidro cortisona	glucocorticoide	Sigma H6909	5nM		
Oncostatina M (OSM)		R & D systems 495-MO- 025	10-1000 ng/ml		
ARA		Sigma A 0937	500 nM		
R 59022	Inhibidor de la diacilglicerol quinasa	Sigma d 5919	500nM-50nM	+	+
Arterenol bitrarte: -	agonista andrenoreceptor	sigma A 0937	500nM-50nM-5nM		
LIF			10 ³		
PD 035901	Inhibidor de MEK1	Axon Medchem gato n 1386	500nM		
Chir99021	Inhibidor de GSK3	Axon Medchem gato n 1408	3uM		
DMSO			1%		
Acido l-ascobico		Sigma 077K13021	1mM		
VEGF		Peptotec			
Matrigel 50%					
Matrigel 20%					
VEGF + DEXA					

[0252] El segundo enfoque se tuvo en cuenta los conocimientos de los estudios de desarrollo publicados en relación con la expresión de los factores de transcripción esenciales para lograr biliar y la diferenciación de los hepatocitos *in vivo*. En la figura 8 se muestra un análisis comparativo de la expresión de los factores de transcripción en los organoides en condiciones E o ER o ENRW complementados con FGF10, HGF y nicotinamida. Todos los factores de transcripción requeridos para la especificación de hepatocitos estaban presentes, además de *tbx3* y *prox1*. Sin embargo, también notamos que la expresión de factores de transcripción biliar específicos estaba altamente regulada al alza en los cultivos que contenían R-espondina1 (R), lo que indica que la expresión del gen de cultivo se desequilibró hacia un destino celular más biliar.

[0253] Las rutas de señalización Notch y TGF-beta se han implicado en el destino de las células biliares *in vivo*. De hecho, la eliminación de *Rbpj* (esencial para lograr una señalización activa de Notch) da como resultado una tubulogénesis anormal (Zong Y. Development 2009) y la adición de TGF-beta a los explantes de hígado facilita la diferenciación biliar *in vitro* (Clotman F. Genes and Development 2005). Debido a que tanto la vía de señalización de Notch como la de TGF-beta estaban altamente reguladas en los cultivos de hígado (Figura 9), razonamos que la inhibición del destino celular del conducto biliar podría desencadenar la diferenciación de las células hacia un fenotipo más hepatocítico. A8301 se seleccionó como un inhibidor del receptor de TGF-beta ALK5, 4 y 7, y DAPT como inhibidor de la gamma-secretasa, la proteasa activa esencial para activar la vía Notch. Primero cultivamos las células durante 2 días en las condiciones de expansión (medios ER) y en el día 2 (figura 10A) comenzamos las condiciones de diferenciación agregando la combinación de los diferentes compuestos. Los medios se cambiaron cada dos días, y la expresión de marcadores diferenciados se analizó 8-9 días después. Las condiciones de ER y ENRW se utilizaron como control negativo.

[0254] La combinación de EGF + FGF10 con DAPT y A8301 resultó en una mejora sorprendentemente grande de la expresión de los marcadores de hepatocitos analizados (*Cyp3a11*, TAT, albúmina) (figura 10B). El efecto ya fue detectable el día 5 y alcanzó su punto máximo en los días 8-9 (figura 10C). La máxima eficiencia de concentración se logró a 10uM (DAPT) y 50 nM (A8301) (figura 10D) respectivamente. La adición de dexametasona (una molécula de diferenciación de hepatocitos conocida) no produjo ninguna mejora en la expresión génica. La combinación de EGF, FGF10, A8301 y DAPT no solo mejora la expresión sino que también aumenta el número de células similares a hepatocitos, según lo evaluado por inmunofluorescencia contra los marcadores de hepatocitos albúmina y 2F8, y la tinción con Xgal en organoides derivados de AlbCreLacZ (figura 10E y F). Por lo tanto, podemos concluir que el protocolo de diferenciación mencionado anteriormente facilita la generación de células similares a hepatocitos *in vitro* a partir de cultivos de células madre del hígado.

Ejemplo 3 - Organoides de hígado humano

[0255] Usando estas condiciones de expansión (ERFHNic y ENRWFHNic) también hemos sido capaces de expandir cultivos biliares derivados de humanos (figura 11) con la adición de 500 uM de inhibidor de TGF beta (A83-01) al medio de expansión.

MATERIAL Y MÉTODOS (Para los ejemplos 1-3)

Aislamiento de cultivo hepático-conducto biliar.

[0256] El tejido hepático adulto aislado se lavó en DMEM/F12 avanzado frío (Invitrogen) y luego, el tejido se cortó en trozos de animales de aproximadamente 5 mm y se lavó adicionalmente con tampón de disociación frío (colagenasa, dispasa, FBS en medio DMEM). Los fragmentos de tejido se incubaron con el tampón de disociación durante 2 horas a 37°C. Luego, los fragmentos de tejido se suspendieron vigorosamente en 10 ml de tampón de aislamiento frío con una pipeta de 10 ml. El primer sobrenadante que contenía células de muerte se descartó y el sedimento se suspendió con 10-15 ml de tampón de disociación. Después de una suspensión vigorosa adicional de los fragmentos de tejido, el sobrenadante se enriquece en conductos biliares. Este procedimiento se repite hasta obtener suficientes conductos biliares.

[0257] Los sedimentos biliares aislados se sedimentan y se mezclan con 50 µl de Matrigel (BD Bioscience), se siembran en placas de cultivo de tejidos de 24 pocillos y se incuban durante 5-10 minutos a 37°C hasta la polimerización completa del Matrigel. Después de la polimerización, se sobrecargan 500 µl de medio de cultivo tisular.

[0258] **Composición de los medios:** DMEM/F12 avanzado suplementado con B27, N2, 200 ng/ml de N-acetilcisteína, 50ng/ml de EGF, 1 µg/ml de R-espondina1, gastrina: 10 nM, FGF10 100 ng/ml, nicotinamida 10 mM y HGF: 50 ng/ml y 50% de medios acondicionados con Wnt.

[0259] El medio completo se cambió cada 2 días. Después de 1 semana, se retiraron los medios acondicionados con Wnt y se extrajeron los organoides formados del Matrigel con una pipeta de 1000 µl y se disociaron mecánicamente en pequeños fragmentos y se transfirieron a Matrigel nuevo. El paso se realizó en una proporción dividida de 1:4 una o dos veces por semana. En estas condiciones, los cultivos se han mantenido durante al menos 6 meses.

Reactivos

[0260] El factor de crecimiento de hepatocitos humanos (HGF) se adquirió de Peprotech, EGF invitrogen, R-espondina Nuvelo, Noggin peprotech, FGF10 Peprotech, gastrina Sigma Aldrich, nicotinamida Sigma.

Micromatriz

[0261] Para el análisis de la expresión de los cultivos de hígado derivados de Lgr5, se aisló ARN usando un kit de Qiagen ARNasa, a partir de hígado adulto o a partir de cultivos de hígado cultivadas en medios sin Wntcm y Noggin (ER) o con Wntcm y Noggin (ENRW). Se marcaron 150 ng de ARN total con un kit de amplificador lineal de entrada de ARN bajo (Agilent Technologies, Palo Alto, CA). ARN de referencia de ratón universal (Agilent) se marcó diferencialmente y se hibridó con tejido de hígado adulto o ER o cultivos tratados con ENRW. Se usó un 4X44K Agilent Whole Mouse Genome Micromatrizes de doble color (G4122F). El etiquetado, la hibridación y el lavado se realizaron de acuerdo con las pautas de Agilent.

Ejemplo 4: Expresión de Lgr5 se regula al alza después de una lesión hepática

[0262] En el hígado, la señalización de Wnt es activo en áreas vena central. Recientemente hemos observado que la señalización Wnt juega un papel clave en el metabolismo hepático (comunicación personal de Boj et al.). En las células del conducto hepático, la señalización Wnt se activa después de una lesión hepática (Hu et al 2007, Gastroenterology, 133 (5): 1579-91). De manera similar, al utilizar el alelo *Axin2-LacZ*, que representa un reportero general fiel para la señalización de Wnt, también observamos una regulación positiva de la señalización de Wnt en la parenquima hepática total después de la inyección del agonista de Wnt Rspo1 (ver figura 12A) o después de una lesión hepática por el tetracloruro de carbono del compuesto hepatotóxico (CCl4) (ver figura 12B).

[0263] El Wnt diana *Lgr5* marca las células madre en varios tejidos de auto-renovación activa, pero previamente no se ha informado que se expresa después de la lesión. Nuestros ratones knockin de *Lgr5-LacZ* descritos anteriormente (Barker et al, 2007, Nature 449 (7165): 1003-7) muestran que *Lgr5* es esencialmente indetectable en el hígado sano aunque la qPCR detecta una expresión residual de ARNm. Después de la inyección de CCl4 en ratones knockin de *Lgr5-LacZ* (ver Barker et al, 2007, supra para ratones LacZ y Furuyama K et al., Nat Genetics, 43, 34-41, 2001 para la descripción del método CCl4), observamos una clara expresión del informador en estructuras de yemas recién formadas en el hígado (ver figura 13A), alcanzando un máximo en el día 6,5 después de la lesión y manteniéndose hasta el día 9 para mostrar una clara desintegración una vez que el hígado se haya regenerado completamente en el día 13 después de la lesión (ver figura 13A, panel superior derecho). No se detectó expresión del reportero en compañeros de camada de tipo salvaje que se sometieron a un protocolo de lesión similar (vea la figura 13A, panel inferior derecho).

[0264] La aparición de la expresión *Lgr5* en los sitios de regeneración activa, sugirió que *Lgr5* podría anunciar *de novo* la activación por Wnt de células madre/progenitoras regenerativas después de la lesión. De hecho, encontramos que las células *Lgr5* de aparición novo no expresan marcadores de células hepáticas maduras (K19 o FAH) o células estrelladas (SMA), sino que son positivas para el marcador progenitor de hígado recientemente descrito Sox9 (figura 13B). Esto significa que las células *Lgr5*+, que son el punto de partida para la obtención de organoides in vitro, pueden obtenerse a partir de fragmentos de hígado induciendo una lesión hepática o estimulando la señalización de Wnt con R-espondina. La inducción de la expresión de *Lgr5* en células hepáticas por lesión o por R-espondina puede llevarse a cabo *in vivo* antes de que se obtengan las células, *ex vivo* en un hígado aislado o *in vitro* en un fragmento de hígado o en una población de células hepáticas.

Ejemplo 5 - Expansión a largo plazo de cultivos de organoides hepáticos

[0265] En el ejemplo 1, se encontró que la combinación de EGF (50 ng/ml) y R-espondina 1 (lug/ml) suplementado con FGF10 (100 ng/ml), HGF (25-50ng/ml) y nicotinamida (1-10 mM), fueron preferibles para el mantenimiento a largo plazo de los cultivos. Ahora también tenemos evidencia de que los tres factores complementarios (FGF10, HGF y Nicotinamida) agregados a EGF y R-espondina1 son todos necesarios para la expansión de los cultivos por más de 3 meses. Para evaluar eso, aislamos los conductos biliares de la parenquima hepática, como se muestra en la figura 14 (se usó la tinción K19 para confirmar la identidad de las estructuras aisladas) y generamos cultivos de organoides en el hígado al cultivarlos con: i) EGF; o ii) EGF y R-espondina1 más FGF10 o HGF o nicotinamida; o iii) EGF y R-espondina1 más FGF10 y HGF y nicotinamida (ERFHNic). Hemos dividido las culturas una vez a la semana por un período total de 14 semanas. Los resultados confirmaron, como se informó en los ejemplos 1 y 2, que EGF, R-espondina1 y nicotinamida combinados con FGF10 son esenciales para el crecimiento y la auto renovación de los cultivos de hígado. Después de 10 pases, los cultivos que carecen de HGF mostraron una desventaja de crecimiento en comparación con los cultivos suplementados con HGF. Aunque aún es viable, la proporción de proliferación disminuyó a 1:2-1:4 en comparación con el 1:6-1:8 de los cultivos suplementados con la combinación completa (FGF10, HGF y nicotinamida). Después de 15 pases, los cultivos con ERFHNic no suplementado con HGF ya no eran viables. Por lo tanto, estos resultados sugieren que el HGF es esencial para mantener una buena tasa de proliferación después del mantenimiento a largo plazo (figura 15).

Ejemplo 6 - Marcadores expresados en organoides hepáticos en condiciones de diferenciación

[0266] Usando el protocolo de diferenciación descrito en el ejemplo 2, hemos sido capaces de detectar un marcador hepatoblast (albúmina) y un marcador de superficie de hepatocitos en los organoides hepáticas. Para cuantificar el número de estas células similares a hepatocitos, realizamos un análisis de citometría de flujo de los cultivos utilizando un marcador de superficie de hepatocitos. Observamos que, mientras que en la condición de cultivo de expansión casi no se detectaron células con marcador de superficie de hepatocito, después de la diferenciación, hasta el 35% de las células fueron positivas para este marcador de superficie de hepatocito (ver Figura 17B y C).

[0267] Luego analizamos el perfil de expresión génica de los organoides de hígado de ratón en estas condiciones de diferenciación (figura 16 y figura 1, vemos una fuerte regulación positiva de, por ejemplo, los genes Alb, FAH, y TAT y Cyp3). Encontramos que la expresión génica de los organoides hepáticos de ratón después de la diferenciación se parece a la de los hepatocitos de ratón maduros y/o el hígado de ratón.

Ejemplo 7 - Transplante de organoides hepáticos en ratones.

[0268] Se tomaron células de los organoides que habían crecido utilizando condiciones de expansión ERFHNic y condiciones de diferenciación de EAFD y se transplantaron en una cepa inmunodeficiente de ratones deficientes en la enzima catabólica de tirosina fumarilacetoacetato hidrolasa (FAH), un modelo de ratón para la enfermedad humana tipo I Tirosinemia (Azuma et al. 2007, Nature Biotech, 25 (8), 903-910). El calendario de trasplantes se muestra en la figura 17D. Los resultados preliminares muestran que se pueden encontrar células FAH dispersas positivas en la parenquima hepática de los ratones deficientes en FAH, lo que indica que las células hepáticas derivadas de los cultivos de organoides se injertaron en los hígados receptores (ver figura 17A, lado derecho). Además, un número significativamente mayor de células K19 positivas también se detectaron en los hígados de los ratones receptores. Esto sugiere que las células transplantadas derivadas de organoides pueden generar ambos linajes *in vivo* : hepatocitos (como lo demuestra el marcador de FAH) y colangiocitos (como lo demuestra el marcador K19) (vea la figura 17A, panel superior izquierdo). Esto se vio respaldado por el análisis de citometría de flujo de células transplantadas que provenían de dos clones separados de dos cultivos separados (figuras 17B y 17C, respectivamente). Las células Lgr5+ se transdujeron con un virus que contiene GFP y se realizó un análisis de citometría de flujo después de la diferenciación. Las células que fueron positivas para el marcador de la superficie del hepatocito muestran una dispersión mayor que indica células más grandes, que representan granularidad y madurez, es decir, células de hepatocitos maduros. Las células que fueron negativas para el marcador de superficie de hepatocitos dieron como resultado una menor dispersión, lo que indica células más pequeñas, es decir, progenitores menos maduros. Por lo tanto, todos los tipos de células están presentes (células maduras e inmaduras) en un cultivo de diferenciación. El resto de las células diferenciadas, por lo que las células no utilizadas para el análisis FACS se utilizaron para los experimentos de trasplante.

Ejemplo 8

[0269] Los organoides de hígado de ratón cultivados de acuerdo con un método de la invención se analizaron utilizando el análisis de micromatriz para determinar qué genes se expresan y qué genes no se expresan.

Ejemplo 9

[0270] Los órganos del hígado humano cultivados usando los medios EM1, EM2 y DM de la invención y el hígado humano se analizaron utilizando análisis de micromatrices de oligonucleótidos para determinar qué genes se expresan y qué genes no se expresan. Se notó un perfil de expresión génica significativamente diferente entre los genes expresados en medios de expansión, los genes expresados en medio de diferenciación y los genes expresados en hígado adulto. La tendencia de la expresión del gen de los hepatocitos es aproximadamente la misma que en el ratón, pero la diferenciación de los organoides fue menor que en los organoides del hígado del ratón. Esto puede deberse al uso de la célula humana utilizada.

[0271] Como sucede a menudo en un análisis utilizando una micromatriz de oligonucleótidos, no se detectaron Lgr5 y Tnfrsf19. Sin embargo, se encontró que estaban presentes en organoides cultivados en el medio de expansión.

MATERIALES Y MÉTODOS (para los Ejemplos 4 a 7)

Tratamiento animal

[0272] Los compañeros BL6/Balbc Flgrice de Lgr5LacZ o Axin2-LacZ o WT de dos meses de edad recibieron una inyección intraperitoneal de 0,8 ml/kg de CCL4 disuelto en aceite de maíz (n =) o aceite de maíz solo (n =). Los ratones se sacrificaron 2 o 5 o 9 o 13 días más tarde y el hígado se aisló y se procesó adicionalmente para la tinción de ARN o bgalactosidasa.

Tinción de β -galactosidasa (lacZ)

[0273] Los tejidos hepáticos se aislaron e incubaron inmediatamente durante 2 horas en un volumen de 20 veces de fijador enfriado en hielo (1% de formaldehído; 0,2% de glutaraldehído; 0,02% de NP40 en PBS0) a 4°C en una plataforma rodante. Se retiró el fijador y los tejidos se lavaron dos veces en tampón de lavado (PBS0; MgCl₂ 2 mM; NP40 al 0,02%; Naoxidolato de 0,1%) durante 20 minutos a temperatura ambiente en una plataforma rodante. El sustrato de β -galactosidasa (5 mM K₃FE (CN)₆; 5 mM K₄Fe (CN)₆.3H₂O; 2 mM MgCl₂; 0,02% NP40; 0,1% NaDeoxicolato; 1 mg/ml X-gal luego se agregó PBS0) y los tejidos se incubaron en la oscuridad a 37°C durante 2 horas y durante la noche a temperatura ambiente. Se retiró el sustrato y los tejidos se lavaron dos veces con PBS0 durante 20 minutos a temperatura ambiente en una plataforma rodante. Luego, los tejidos se fijaron durante la noche en un volumen de 20 veces de paraformaldehído (PFA) al 4% en PBS0 a 4°C en la oscuridad sobre una plataforma rodante. El PFA se retiró y los tejidos se lavaron dos veces en PBS0 durante 20 minutos a temperatura ambiente en una plataforma rodante.

[0274] Los tejidos teñidos fueron transferidos a casetes de tejido y los bloques de parafina fueron preparados usando métodos estándar. Se prepararon secciones de tejido (4 μ M) y se tiñeron con rojo neutro.

Tratamiento con R-espondina1

[0275] A ratones Axin2-lacZ de 6-8 semanas de edad se les inyectó IP con 100 μ g de R-espondina1 humana purificada y se sacrificaron 48 horas más tarde para el análisis de expresión de LacZ en el hígado.

RT-PCR

[0276] El ARN se extrajo de cultivos de células gástricas o tejido recién aislado utilizando el Mini Kit de Extracción de ARN RNeasy (Qiagen) y se realizó una transcripción inversa utilizando la transcriptasa inversa del Virus de la Leucemia Murina de Moloney (Promega). El ADNc se amplificó en un termociclador (GeneAmp PCR System 9700; Applied Biosystems, Londres, Reino Unido) como se describió anteriormente (Huch et al., 2009). Los cebadores utilizados se muestran en la Tabla 3 a continuación.

Tabla 3: Cebadores para RT-PCR

Nombre de gen	Símbolo de gen	Secuencia	Producto PCR (bp)
Citocroma P459, familia 3,	CYP3A11	fw TGGTCAAACGCCTCTCCTTGCT G	100
Subfamilia a. polipéptido 11		rv ACTGGGCCAAAATCCCGCCG	
Glucosa-6-fosfatasa	G6P	fw GAATTACCAAGACTCCAGG	581
		rv TGAGACAATACTTCCGGAGG	
Ceratina 19	Krt19	fw GTCCTACAGATTGACAATGC	549
		rv CACGCTCTGGATCTGTGACA	
Albúmina	Alb	fw GCGCAGATGACAGGGCGGAA	358
		rv GTGCCGTAGCATGCGGGAGG	
t-box 3	Tbx3	fw AGCGATCACGCAACGTGGCA	441
		rv GGCTTCGCTGGGACACAGATCT TT	

	Homeobox relacionado con prospero	Prox1	fw	TTCAACAGATGCATTACC	270
5	proteína 1		rv	TCTTTGCCCCGCGATGATG	
	Fumarilacetoacetato-	Fah	fw	ACGACTGGAGCGCACGAGAC	183
	hidrolasa		rv	AGGGCTGGCTGTGGCAGAGA	
10	Tirosina aminotransferasa	Tat	fw	TTTGGCAGTGGCTGAAAGGCA	258
			rv	GGGCCCAGGATCCGCTGACT	
15	Triptofano2,3-dioxigenasa	Tdo2	fw	ACTCCCCGTAGAAGGCAGCGA	583
			rv	TCTTTCCAGCCATGCCTCCACT	
20	Repetición rica en leucina	Lgr5	fw	GGAAATGCTTTGACACACATTC	413
	que contiene proteína G		rv	GGAAGTCATCAAGGTTATTATA	
			A		
25	receptor acoplado 5				
	Transtiretina	TTR	fw	ATGGTCAAAGTCCTGGATGC	220
			rv	AATTCATGGAACGGGGAAAT	
30	Glucocinasa	Gck	fw	AAGATCATTGGCGGAAAG	193
			rv	GAGTGCTCAGGATGTTAAG	
35	hipoxantina	Hprt	fw	AAGCTTGCTGGTGAAAAGGA	186
	fosforibosiltransferasa		rv	TTCGCTCATCTTAGGCTTT	

Inmunohistoquímica

[0277] El procedimiento de inmunotinción utilizado aquí se describió previamente en Huch et al. 2009. Brevemente, las secciones de cinco micrómetros se desparafinaron, se rehidrataron y las secciones de tejido se permeabilizaron usando PBS-T (PBS; Tween20 0,1%). Cuando fue necesario, las secciones se trataron con un tampón de citrato 10 mM (pH 6,0) para la recuperación del antígeno, se bloquearon utilizando un tampón de bloqueo universal (BioGenex) y se incubaron con el anticuerpo primario. Luego, las secciones se lavaron dos veces con PBS y se incubaron con anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa. DAB+ (DAKO) se usó como un sustrato de cromógeno. Las secciones se contrastaron con la hematoxilina de Mayer y se visualizaron en un microscopio Leica DMR. Los anticuerpos primarios utilizados fueron anti-Sox9 de conejo (1: 600; 1h a temperatura ambiente, Millipore), anti-SMA de ratón (1:1000, toda la noche a 4°C, Sigma), anti-FAH de conejo (1:5000; toda la noche 37°C, donación de M. Grompe), anti-K19 de conejo (1: 500; durante la noche a 4°C, donación de M. Grompe). Los anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa utilizados fueron Brightvision de ratón o conejo (inmunológico).

Inmunofluorescencia

[0278] Para la tinción de montura completa, los organoides o los conductos biliares aislados se fijaron con acetona (organoides) o PFA4% (conductos biliares) durante 30 minutos, se lavaron una vez con PBS, se permeabilizaron con PBS 0,3% Triton-X100 durante 5 minutos, se bloquearon usando solución de bloqueo universal (Power block HK085-5KE BioGenex) y se incubaron durante la noche con los anticuerpos primarios diluidos en PBS1% FBS. Después de varios lavados en PBS, las muestras se incubaron con el anticuerpo secundario. Los núcleos se tiñeron con Hoescht33342. Las imágenes fueron adquiridas utilizando microscopía confocal (Leica, SP5). La reconstrucción tridimensional se realizó utilizando el software Volocity (Improvision). Los anticuerpos primarios utilizados fueron anti-K19 de conejo (1:500; donación de M. Grompe), marcador de superficie de antihepatocitos de rata (1:50, donación de M. Grompe), anti-albúmina de cabra (1:50, santa Cruz). Los anticuerpos secundarios utilizados fueron todos criados en burro y conjugados a diferentes fluoróforos de Alexa (burro anti-cabra 568, burro anti-rata-488, burro anti conejo-647, Sondas moleculares).

Citometría de flujo

[0279] Las células disociadas se resuspendieron a 1×10^4 células por mililitro en 1 ml de DMEM + 2% de FBS antes de la adición de sobrenadante de hibridoma MIC1-1C3 a una dilución 1:20 o sobrenadante de hibridoma OC2-2F8 a una dilución 1:50, y se incubaron durante 30 min a 4°C. Después de un lavado con solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (DPBS) fría, las células se resuspendieron en DMEM + FBS al 2% que contenía una dilución 1:200 de anticuerpo secundario de rata de cabra conjugado con APC adsorbido contra proteínas séricas de ratón (Jackson Immunoresearch). La tinción con yoduro de propidio se usó para marcar las células muertas para su exclusión. Las células se analizaron y clasificaron con un Cytopeia inFluxV-GS (Becton-Dickenson).

Ensayo de trasplante

[0280] La inyección de las poblaciones de células clasificadas en el bazo y la retirada de NTBC para inducir la selección de los hepatocitos se realizaron como se ha descrito previamente (Overturf et al. 1996). La retirada del fármaco se realizó en periodos de 3 semanas, seguidos de una readministración hasta que se restableció el peso normal en los animales receptores.

REIVINDICACIONES

1. Un método para obtener un organoide hepático, en donde dicho método comprende:
cultivar una o más células madre epiteliales hepáticas, o un fragmento de hígado o un conducto biliar hepático, en
contacto con una matriz extracelular en presencia de un medio de expansión, comprendiendo el medio medio basal
para células animales o humanas al que se agrega:
factor de crecimiento epidérmico (EGF), un factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) capaz de unirse a FGFR2 o
FGFR4, nicotinamida y un agonista de Wnt seleccionado de R-espondina 1, R-espondina 2, R-espondina 3 o R-
espondina 4.
2. Método según la reivindicación 1, en el que el medio de expansión comprende además HGF.
3. El método según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que un inhibidor de TGF-beta está presente
adicionalmente en el medio y, opcionalmente, en el que el inhibidor de TGF-beta es un inhibidor de molécula pequeña
seleccionado del grupo que consiste en: A83-01, SB- 431542, SB-505124, SB-525334, LY 364947, SD-208, SJN 2511.
4. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el método comprende cultivar una
o más células madre epiteliales en un medio de cultivo celular que comprende o que consiste en un medio basal para
células animales o humanas al que se añade EGF, un inhibidor de BMP., R-espondina y Wnt;
y posteriormente en un medio de expansión que comprende o consiste en un medio basal para células animales o
humanas al que se agrega: EGF, un FGF y HGF, nicotinamida y una R-espondina;
y posteriormente en un medio de diferenciación que comprende o consiste en un medio basal para células animales
o humanas al que se agrega: EGF, FGF y/o HGF, un inhibidor de TGF-beta y un inhibidor de Notch.
5. Método según la reivindicación 4, en el que el medio de diferenciación comprende además dexametasona.
6. Un medio de cultivo celular que comprende un medio basal para células animales o humanas al que se agrega:
EGF, un FGF capaz de unirse a FGFR2 o FGFR4, Nicotinamida y un agonista de Wnt seleccionado de R-espondina
1, R-espondina 2, R spondin 3 y R-espondina 4.
7. Medio de cultivo celular según la reivindicación 6, en el que se añade HGF al medio.
8. El medio de cultivo de acuerdo con las reivindicaciones 6 o 7, en el que uno, dos, tres, cuatro o más del grupo
gastrina, B27, N2 y N-Acetilcisteína se agregan al medio basal.
9. Un organoide hepático que comprende células que expresan Lgr5, obtenible mediante el cultivo de una o más
células madre epiteliales hepáticas, o un fragmento de hígado o un conducto biliar hepático, en contacto con una
matriz extracelular en presencia de un medio de expansión, comprendiendo el medio un medio basal para células
animales o humanas a las que se agrega: factor de crecimiento epidérmico (EGF), un factor de crecimiento de
fibroblastos (FGF) capaz de unirse a FGFR2 o FGFR4, Nicotinamida, un agonista de Wnt seleccionado de R-
espondina 1, R-espondina 2, R-espondina 3 o R-espondina 4, y HGF, en donde el organoide del hígado puede
cultivarse durante al menos 3 meses.
10. Organoide hepático según la reivindicación 9, que comprende una estructura quística y, en el exterior, una capa
de células con al menos una yema y una luz central.
11. Organoide hepático según la reivindicación 9 o la reivindicación 10, que tiene una o más (por ejemplo, 2, 3, 4 o
todas las 5) de las siguientes características: (a) que tiene una densidad celular de $>5 \times 10^5$ células/cm³,
preferiblemente $>10 \times 10^5$ células/cm³; (b) tener un grosor equivalente a 2-30 capas de células, preferiblemente un
grosor equivalente a 2-15 capas de células; (c) las células se contactan mutuamente en tres dimensiones, (d)
demuestran una función inherente al tejido hepático sano, (e) tienen una forma alargada, con dos dominios definidos.
12. El organoide hepático según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en el que:
 - (a) el organoide comprende un dominio epitelial de una sola capa donde se detectan células polarizadas y se
expresan marcadores de queratina y un segundo dominio, que constituye el cuerpo principal del organoide,
formado por un epitelio multicapa con células no polarizadas, que expresan opcionalmente albúmina, y/
(b) el organoide se obtiene de una célula madre epitelial de un hígado adulto que expresa Lgr5, y que
comprende una población de entre al menos 1×10^3 células y 5×10^4 .
13. El uso de un organoide hepático como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12 en una pantalla
de descubrimiento de fármacos.
14. El uso de un organoide de hígado como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12 en un ensayo
de toxicidad.

15. El organoide hepático de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12 para uso en el tratamiento de un trastorno, afección o enfermedad hepática o para uso en medicina regenerativa.

Fig 1a

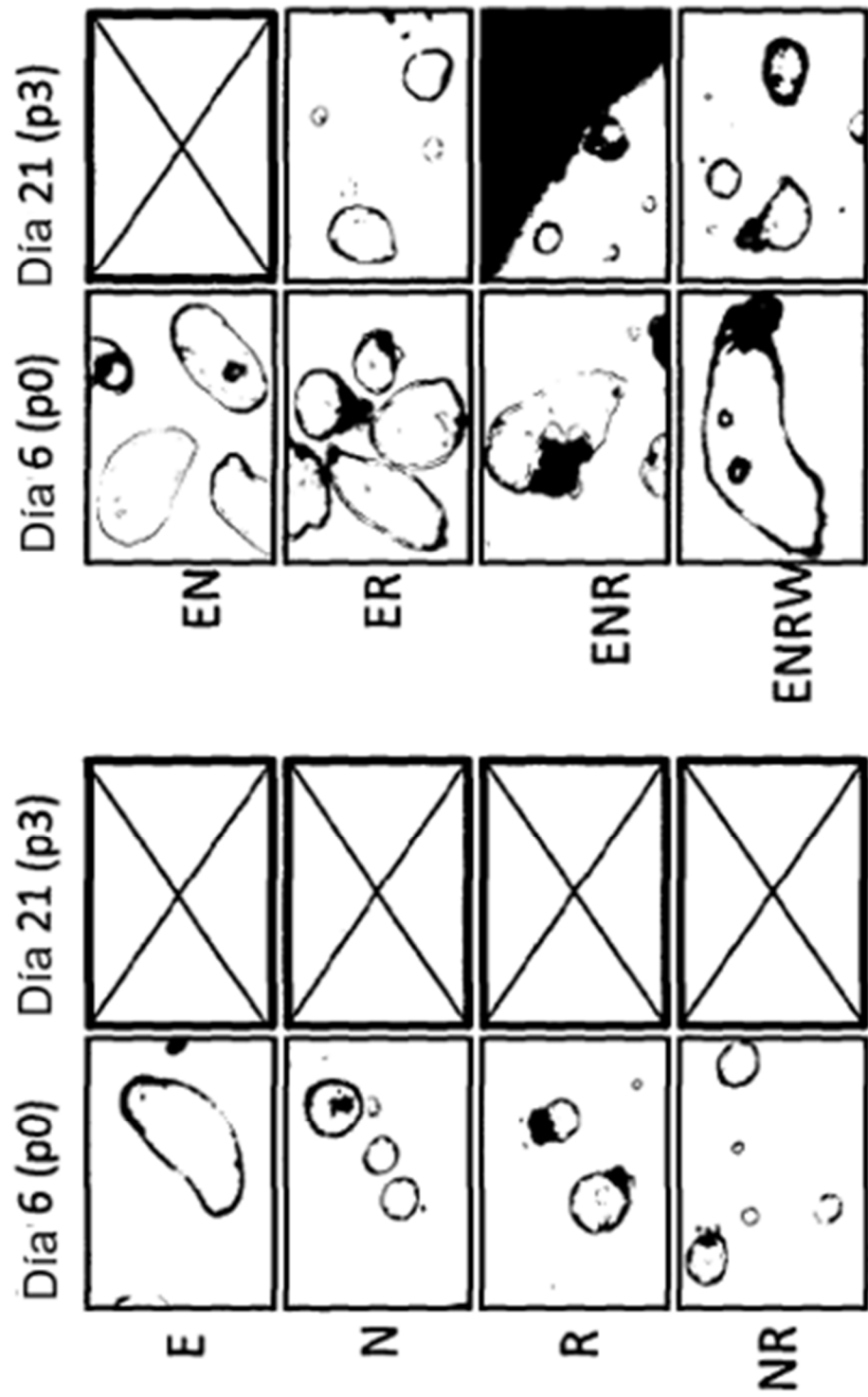


Fig 1b

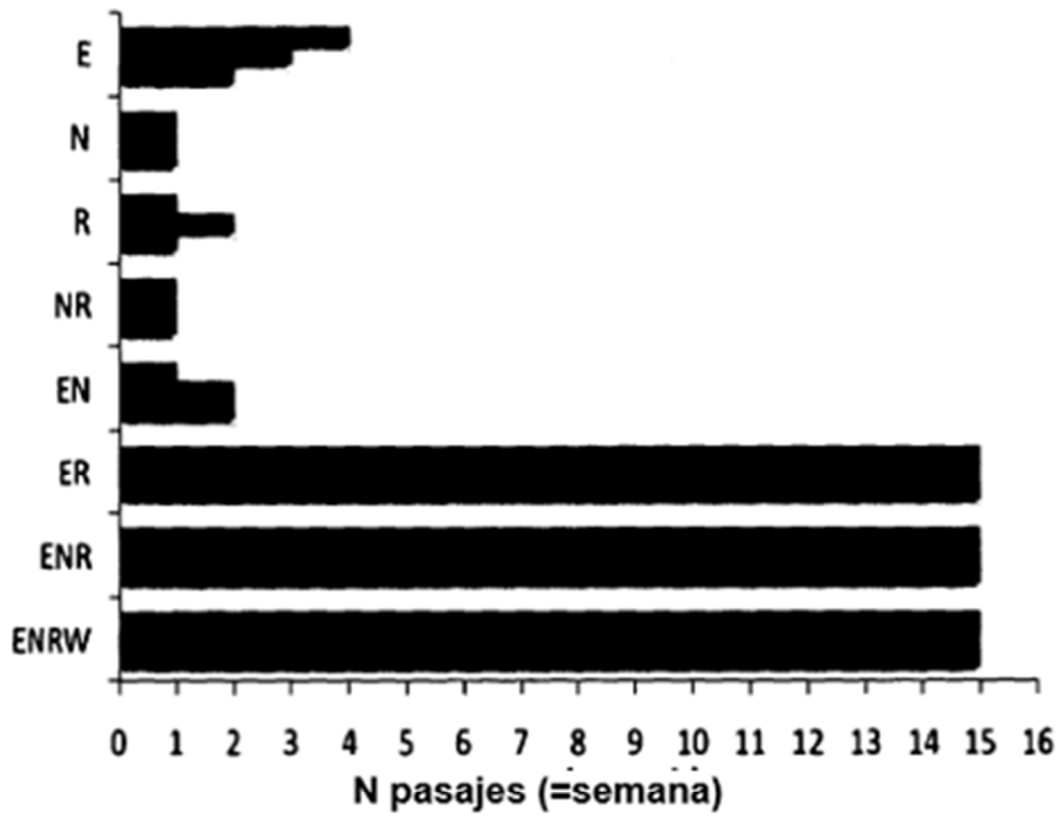


Fig 1c

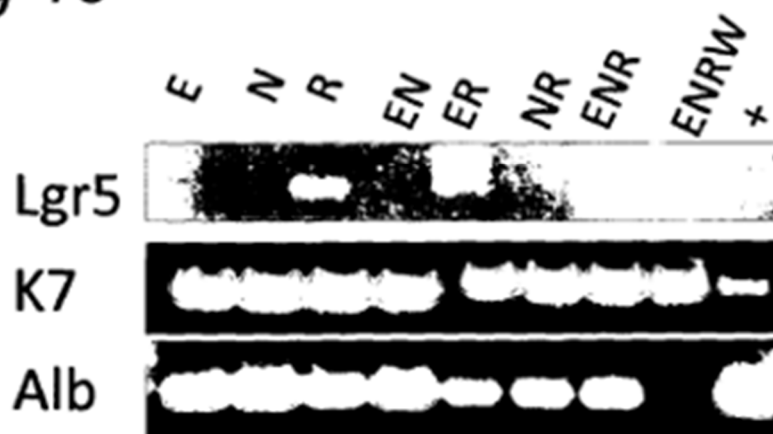


Fig 1d

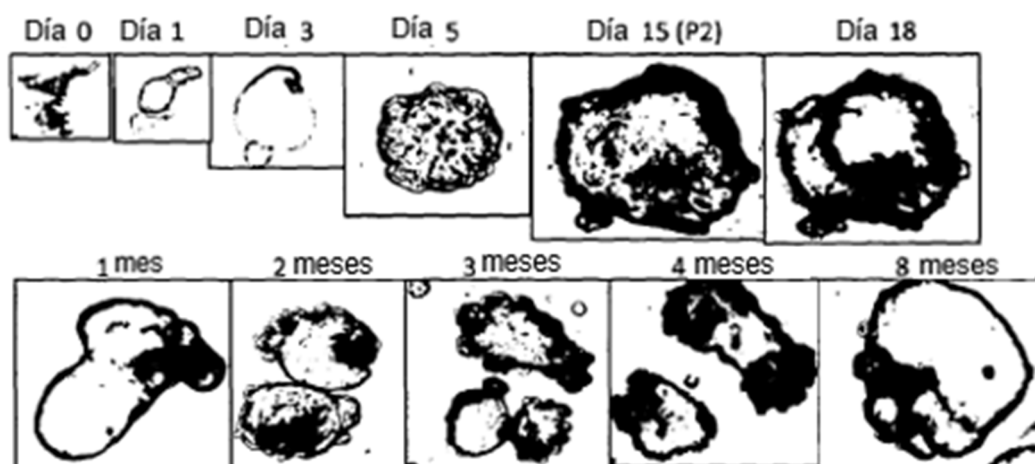


Fig 2a

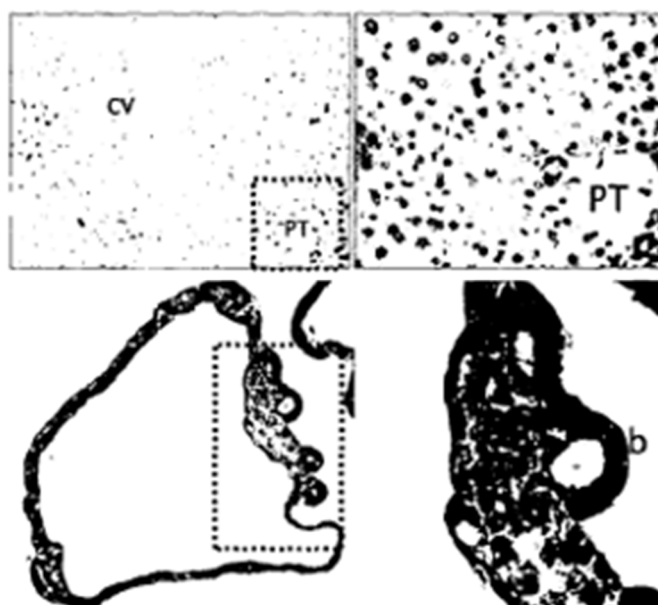


Fig 2b

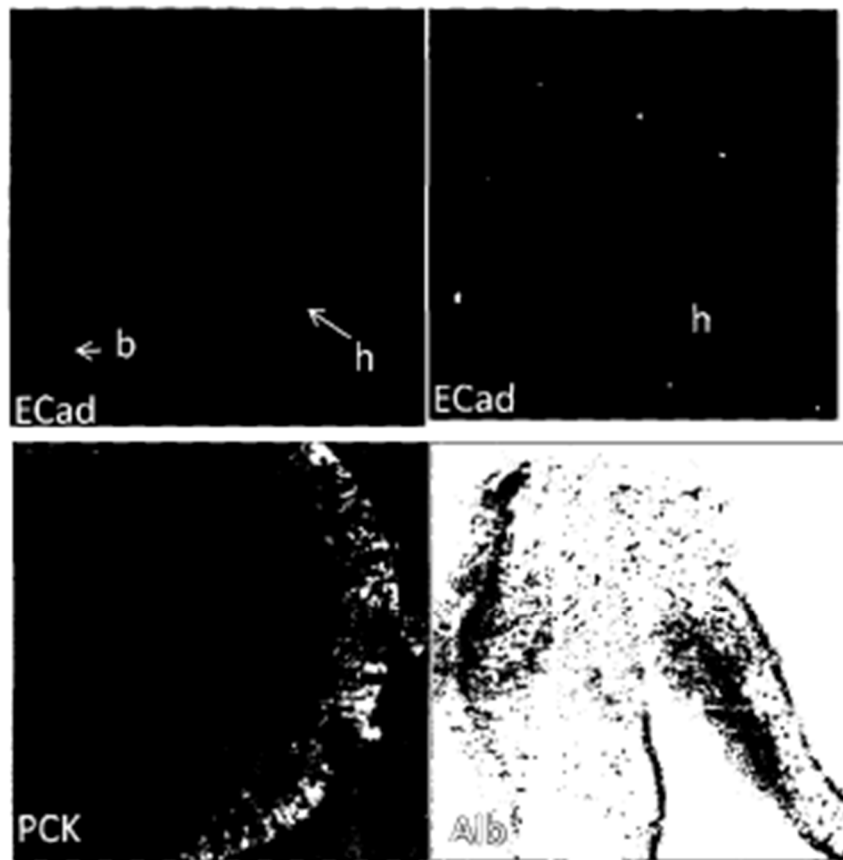


Fig 3

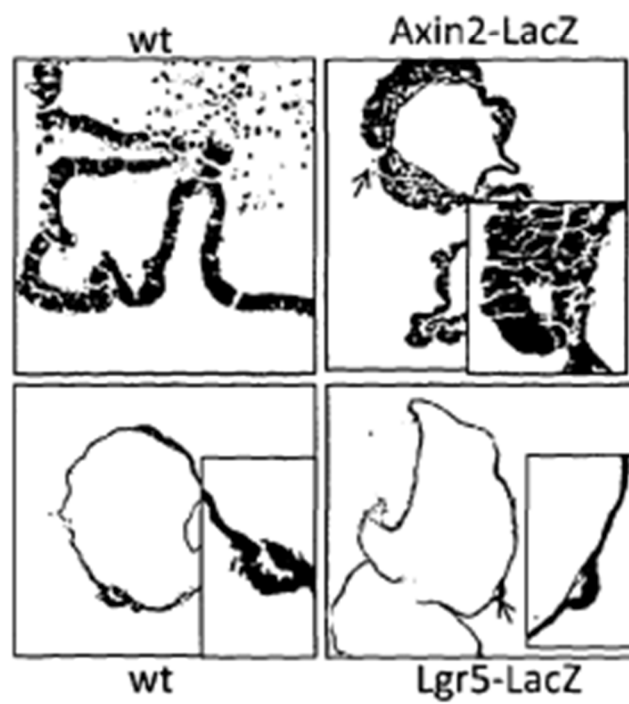


Fig 4a

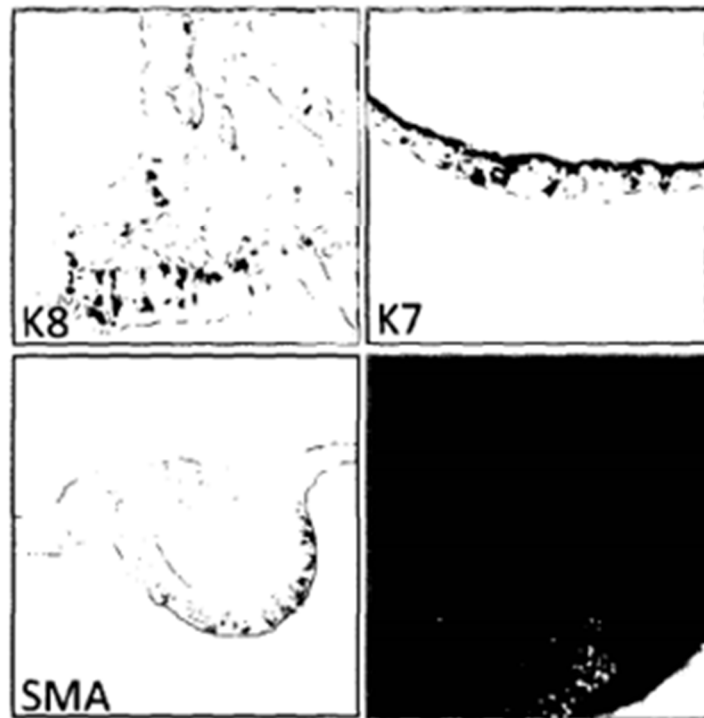


Fig 4b

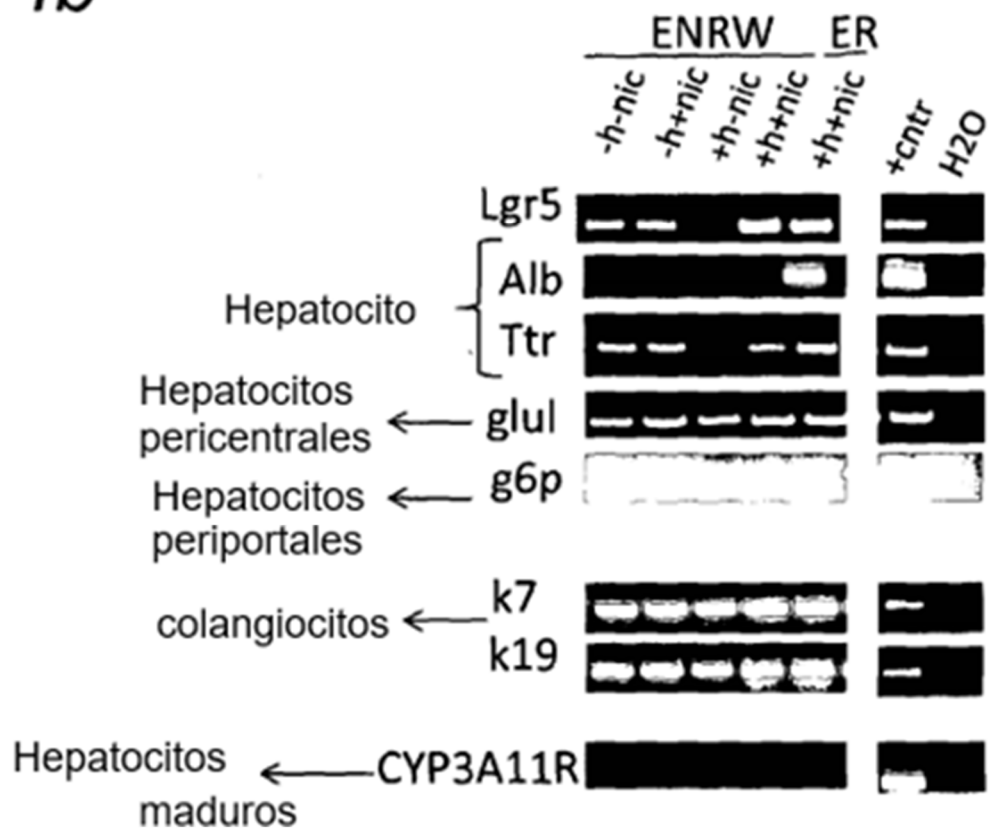


Fig 5a

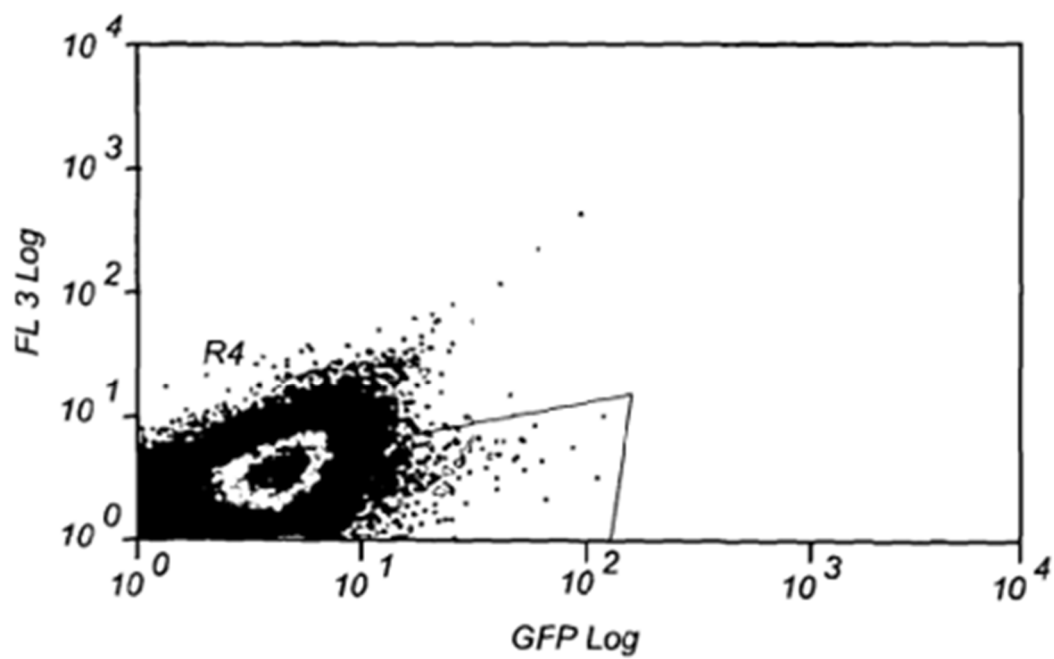


Fig 5b

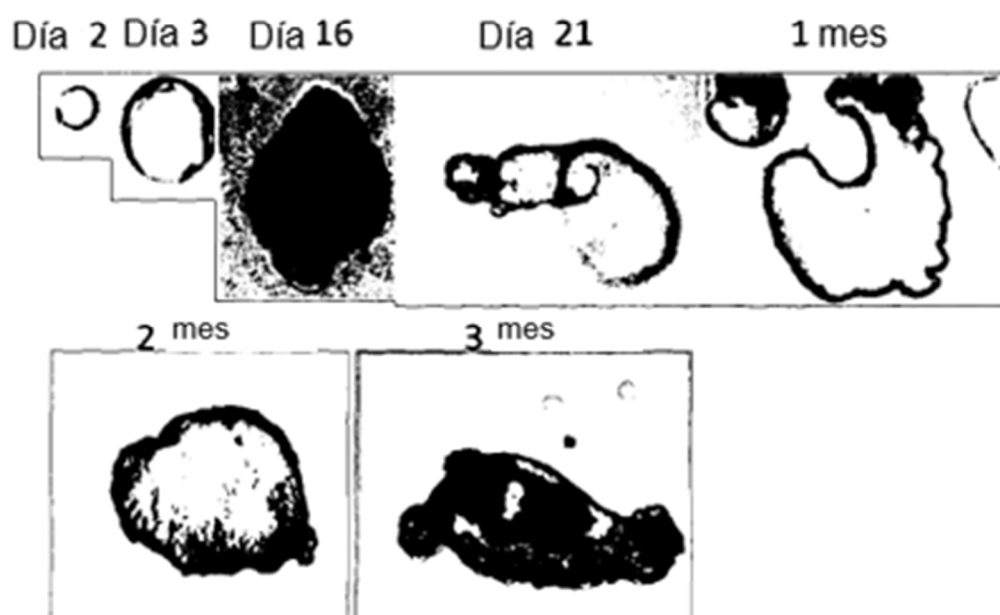
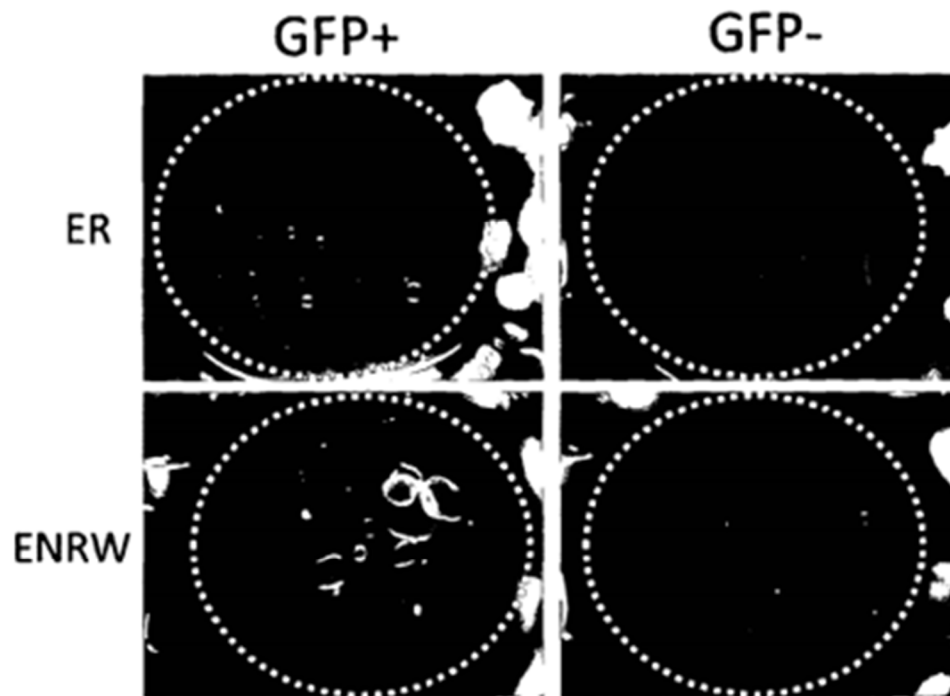


Fig 5c



Día 10 después de clasificación

Fig 5d

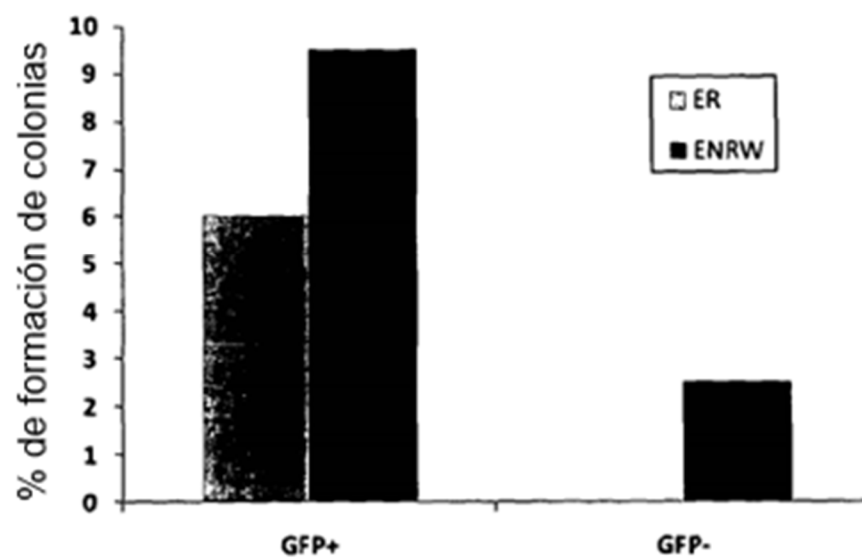
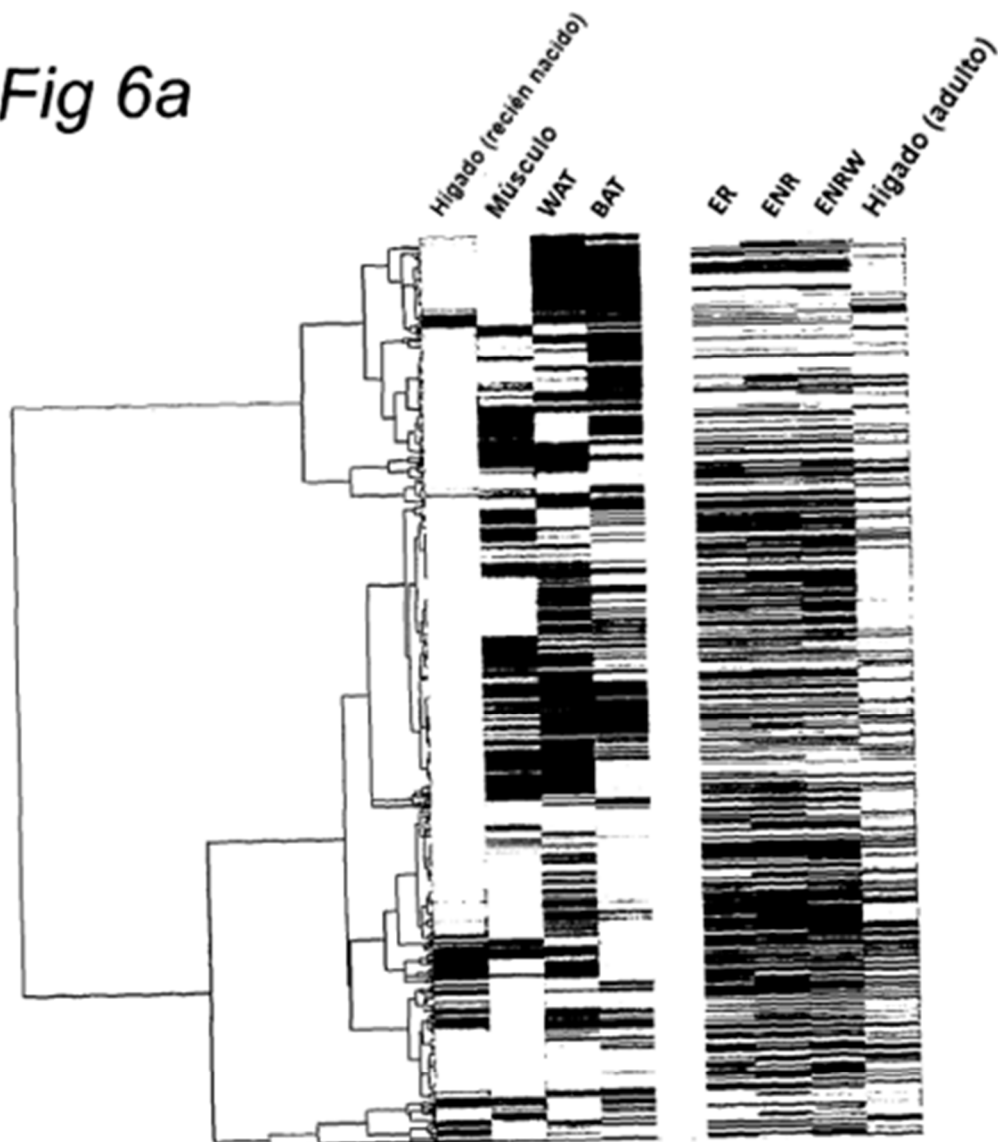


Fig 6a*Fig 6b*

	ER	ENR	ENRW	Liver (adult)
G6pc2	119.5	122	125	117.5
G6pc3	4679.5	4340.5	4139.5	685.5
Glul	923.5	839.5	1387	18345
Met	5337	5743.5	4122	1828.5
Hnf1a	10980	9865	6176	8334
Hnf1b	2357	2632	2770.5	361
Hnf4a	1336	1283	1086	4033
Cyp39a1	1190.5	1167	1391	1051
Cyp2j6	938.5	918	998.5	1164
Cyp3a13	344	426.5	244	10787
Cyp4b1	1567	1567	370.5	2247
Lap3	4704	4659.5	5069.5	20262
Krt7	163790	161041	195354	386.5
Krt19	88264	79467.5	54949.5	347

Figura 7

Cultivo de hígado de ratón - 24 meses de edad

A



B

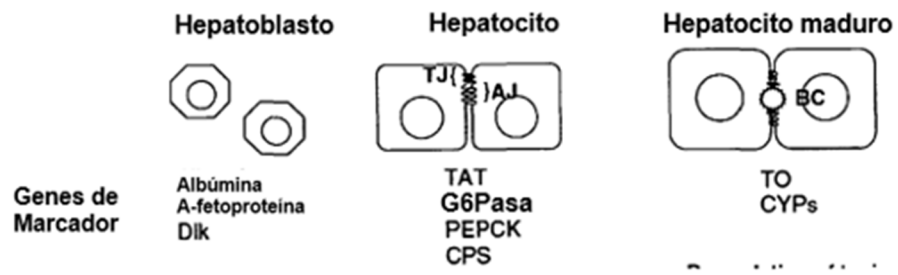
n cromosomas recuento

40	10/15
80	2/15
42	1/15
36	1/15
85	1/15



Figura 8

A



B

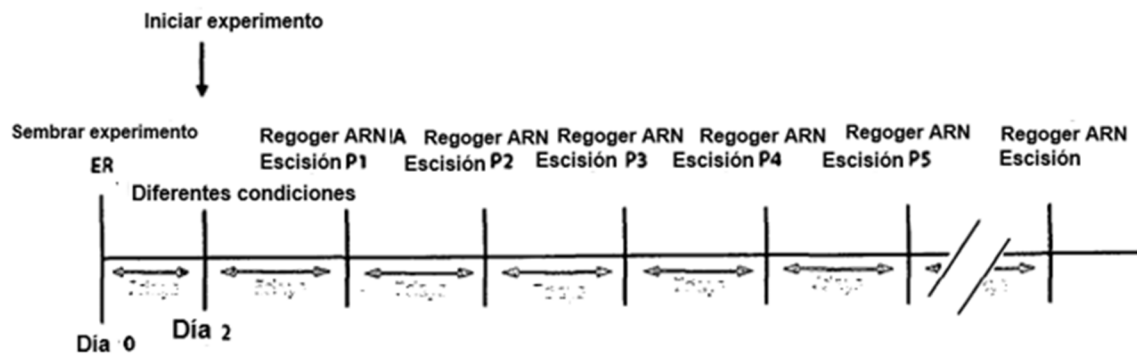


Figura 8

C Después de la primera escisión

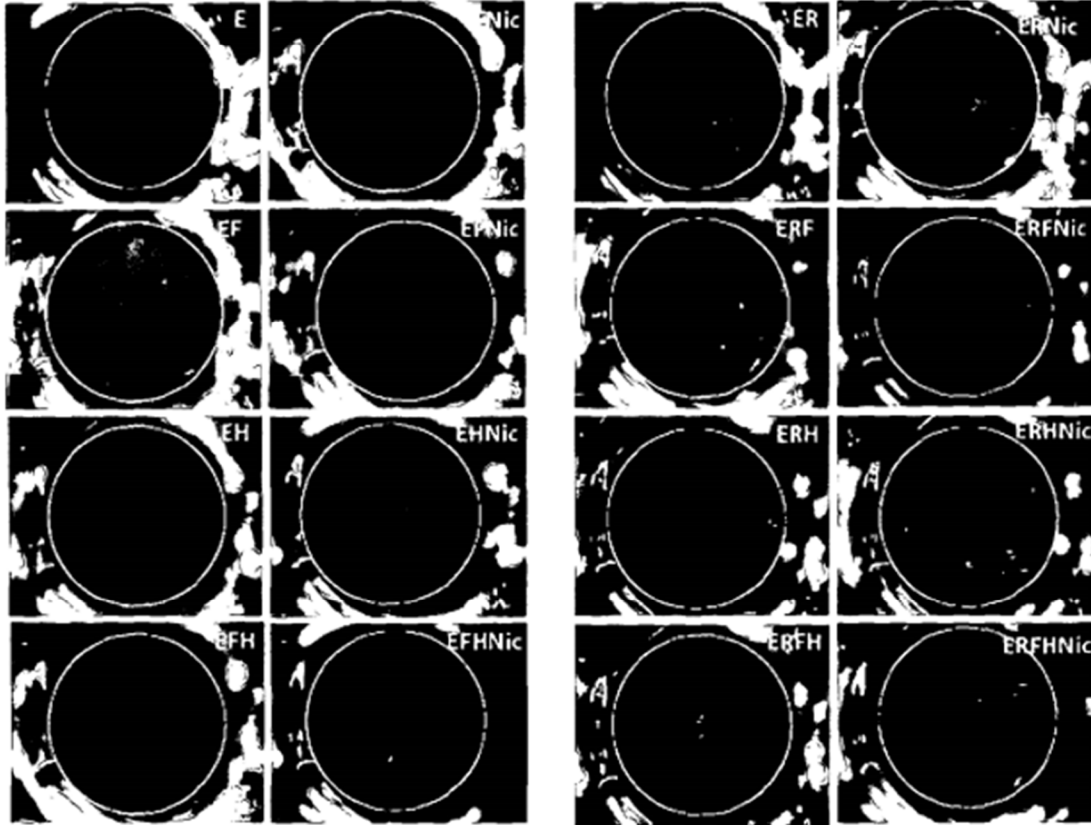
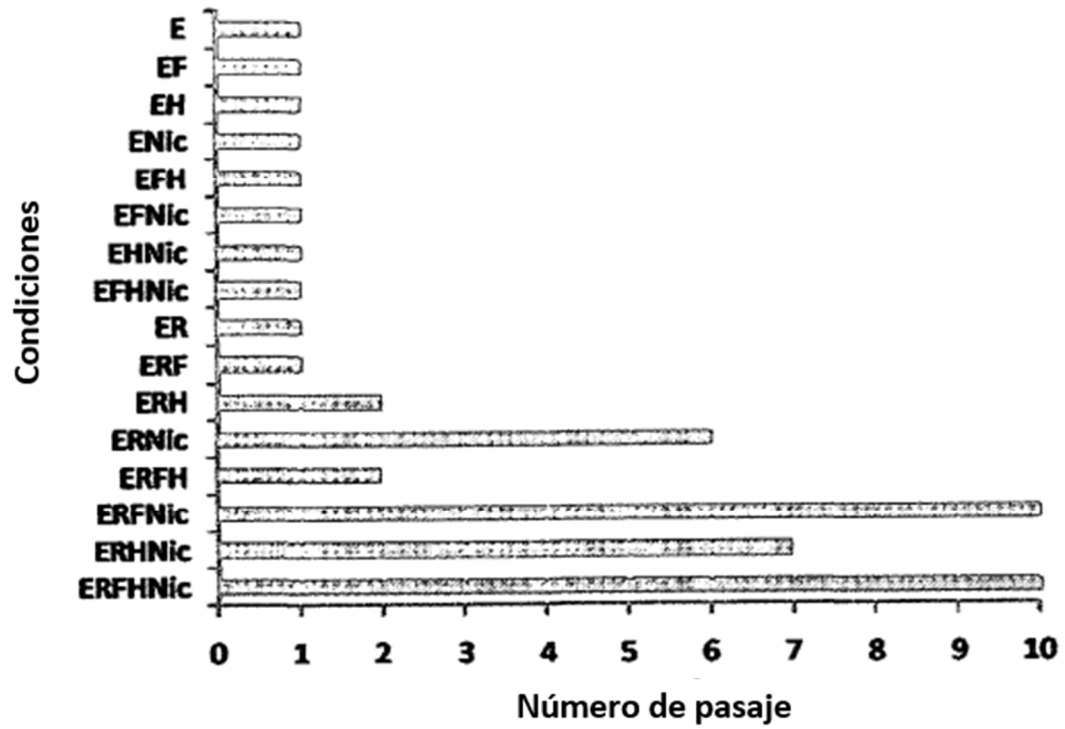
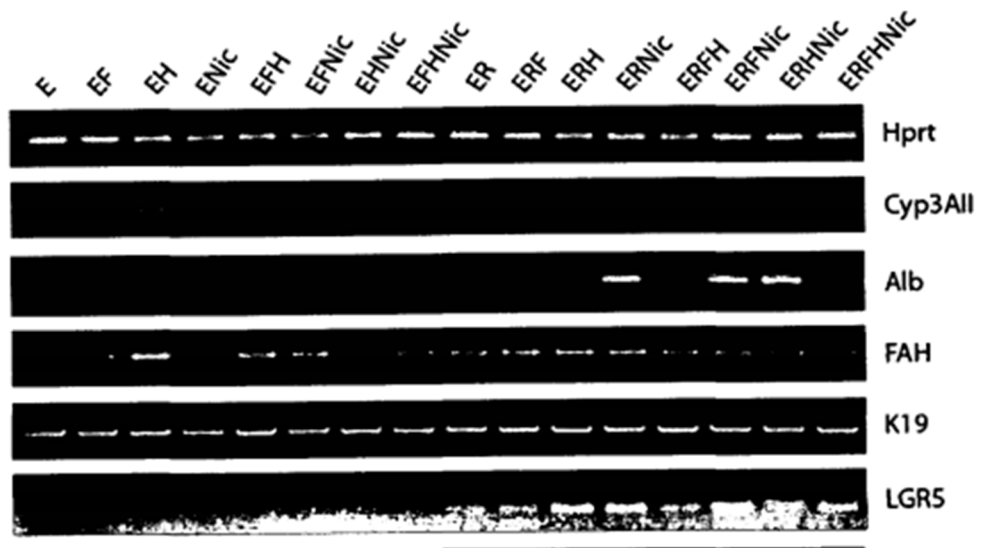


Figura 8

D

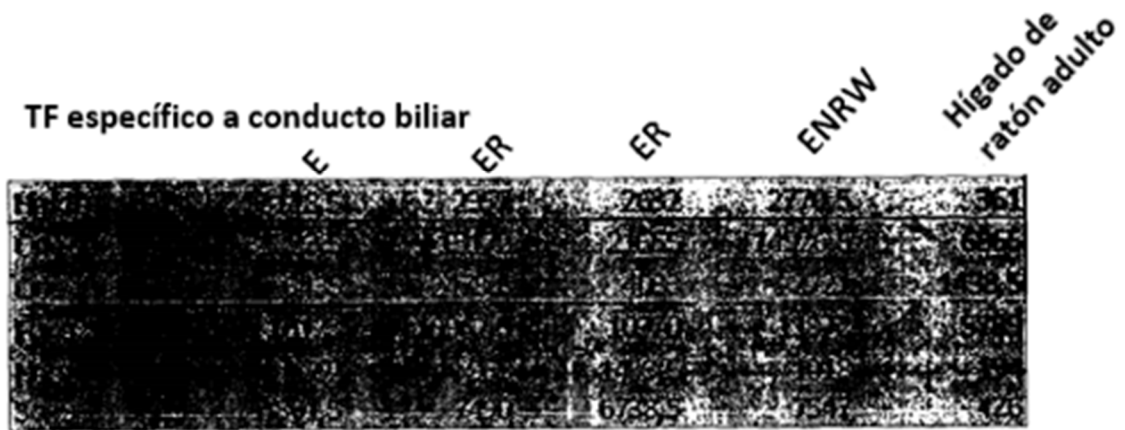


E



5 días después de la diferenciación

Figura 9



TF específico a HC

Gata6	4981,5	5381	5124	5184	740
Cebpa	1431	1188	856	946	10640
Hnf1a	11640	10980	9865	6176	8334
Hnf4a	2573	1336	1283	1086	4033

Prox1	495	219,5	379,5	319	2139
Tbx3	196,5	214	208	180	1840,5
Nr5a2	132	139	131,5	141	1234

Señalización de notch

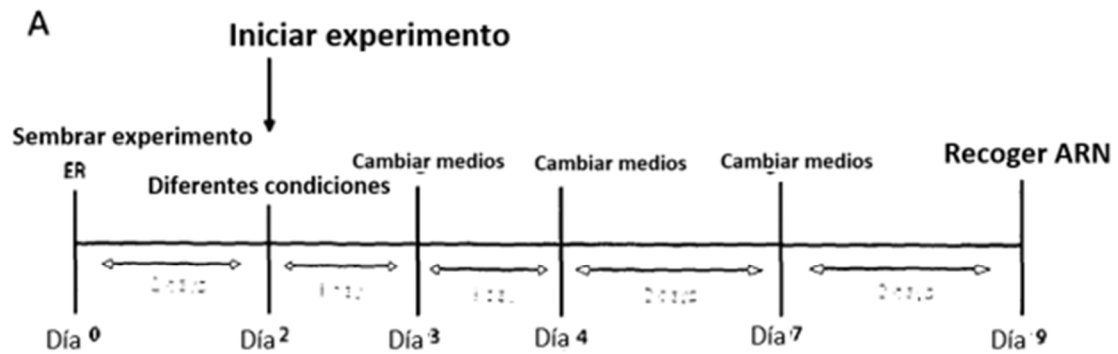
Jag1	6832,5	3638,5	4111	3394	343
Dll1	4035	3758	2791,5	2714,5	415,5
Notch3	557	718	476	788	234

Señalización de TGFb

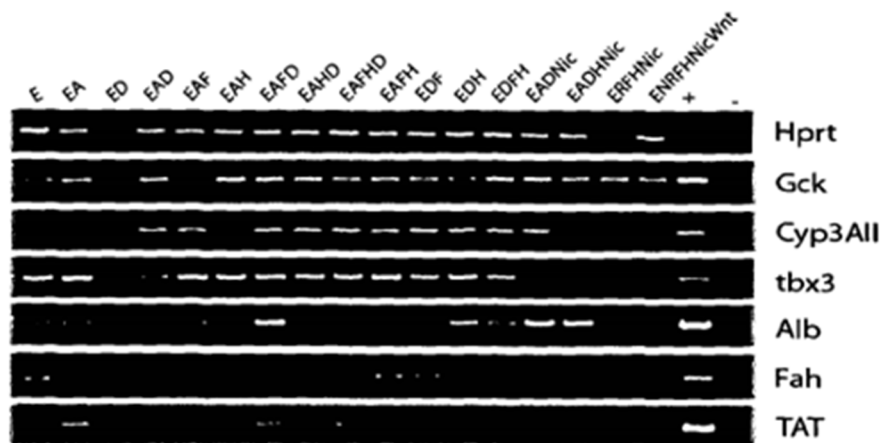
Tgfbr1	3439	2971	4281	3664	733
Tgfbr1	245	234	243	210	116

Tgfbr2	8442	9942	13874	11392	1364
--------	------	------	-------	-------	------

Figura 10



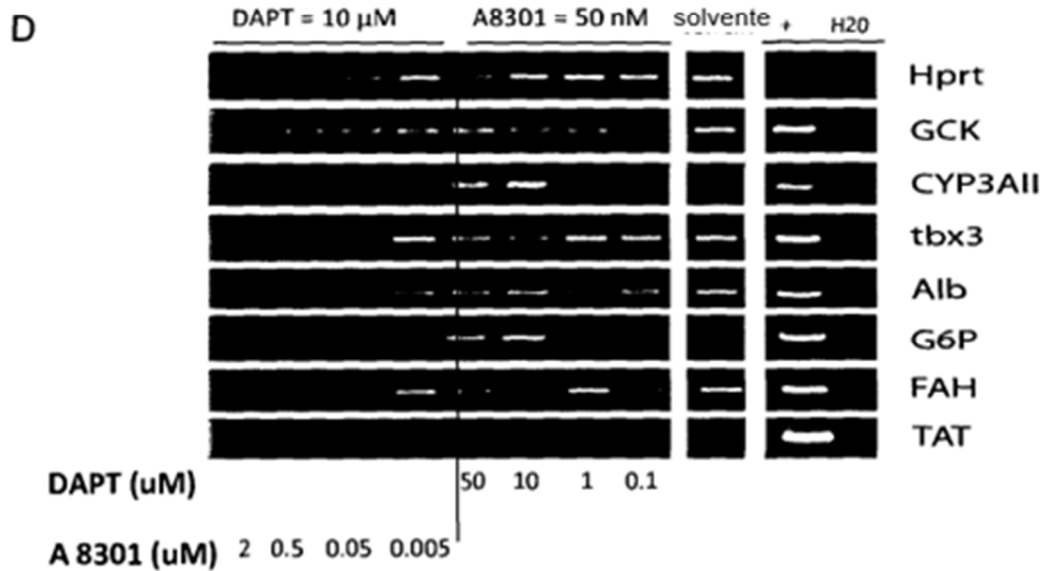
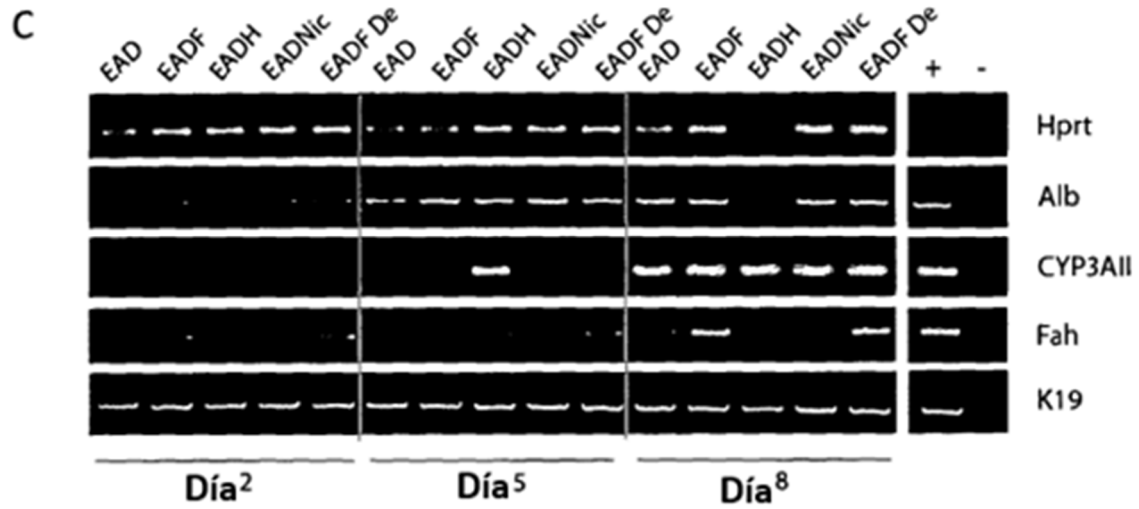
B



E=EGF 50ng/ml
A=A8301 50nM
D=DAPT 10nM
F=FGF10 100ng/ml

Nic=Nicotinamida 10nM
R-espondina1 500 ng/ml
Wnt= Medio condicionado
Por Wnt 50%

Figura 10



E=EGF 50ng/ml

A=A8301 50nM

D=DAPT 10nM

F=FGF10 100ng/ml

H=HGF 50ng/ml

Nic= Nicotinamida 10nM

R= R-espondina1 500 ng/ml

Wnt= Medio condicionado

Por Wnt 50%

De= dexametasona

10mM

Figura 10E

Tinción para marcadores de hígado después de 8 días de condición de diferenciación EADF

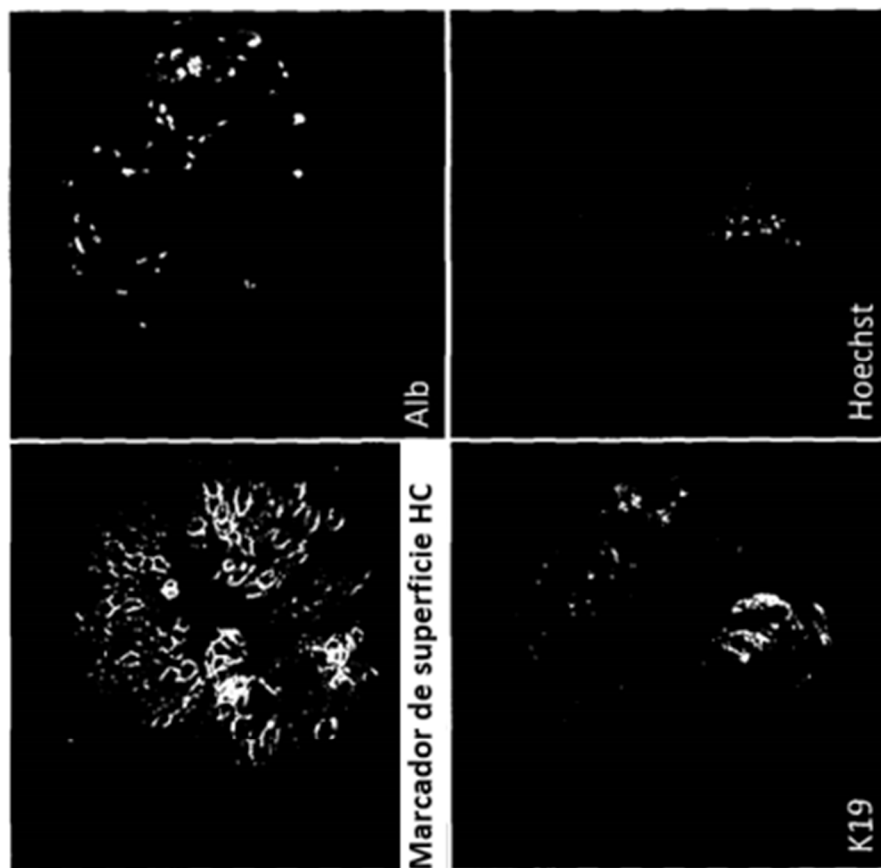


Figura 10F

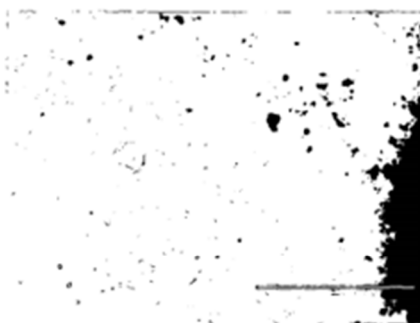
F Organoides derivados de Albcreert2LacZ, (sistema inducible por tamoxifeno)



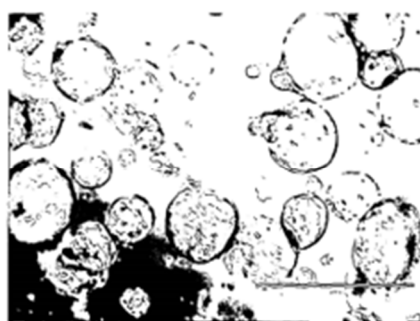
Control no inducido con tamoxifeno

Cultivo inducido por tamoxifeno

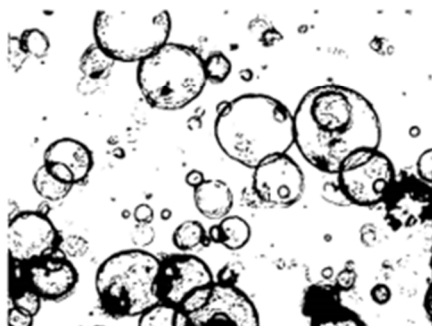
Figura 11 – Cultivo hepáticos derivados de humano Condiciones de cultivo ERFHNic



5 días después del sembrado 4x



P1 (día 10) 4x



P2 (día 20) 4x

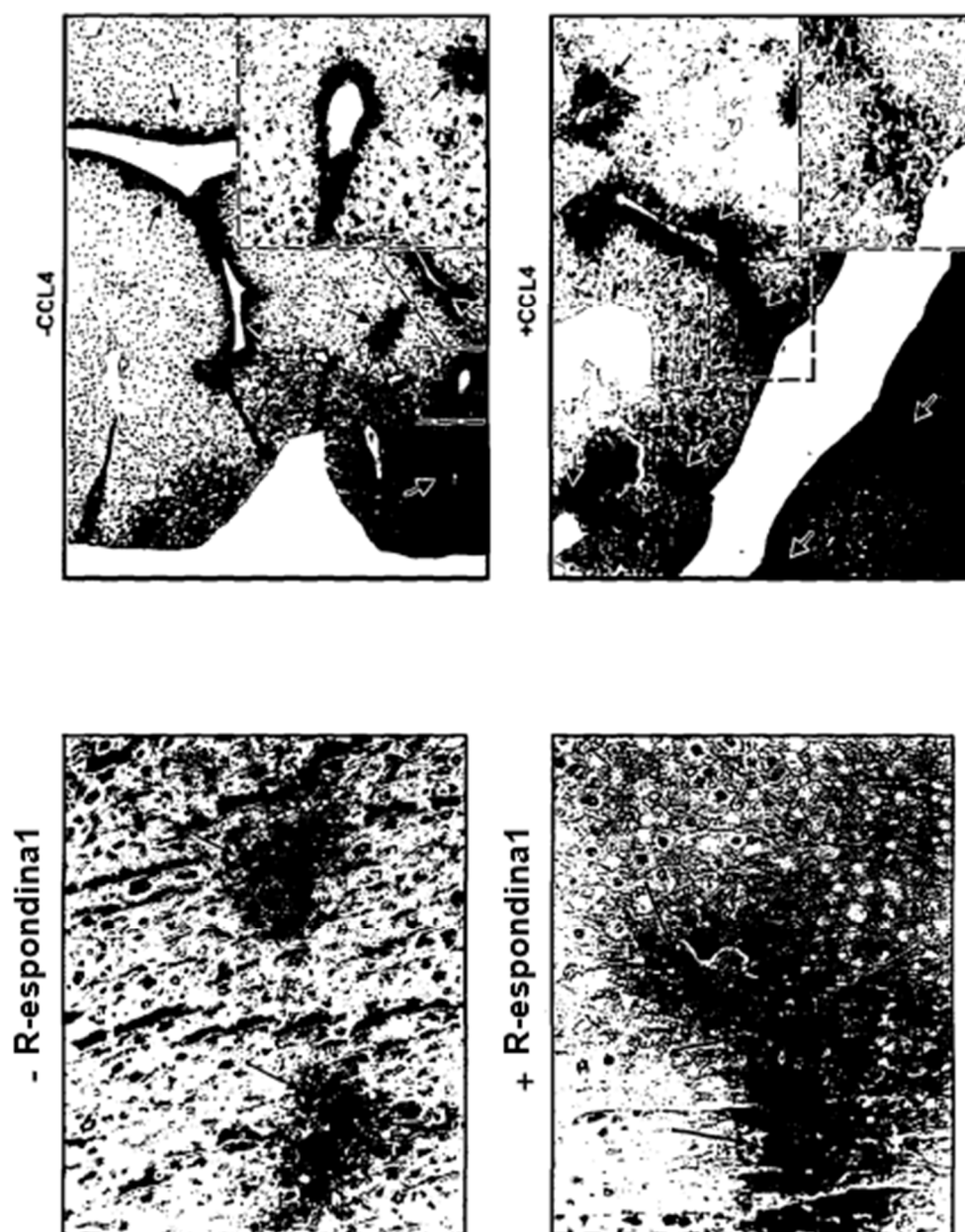


Figura 12

Figura 13A

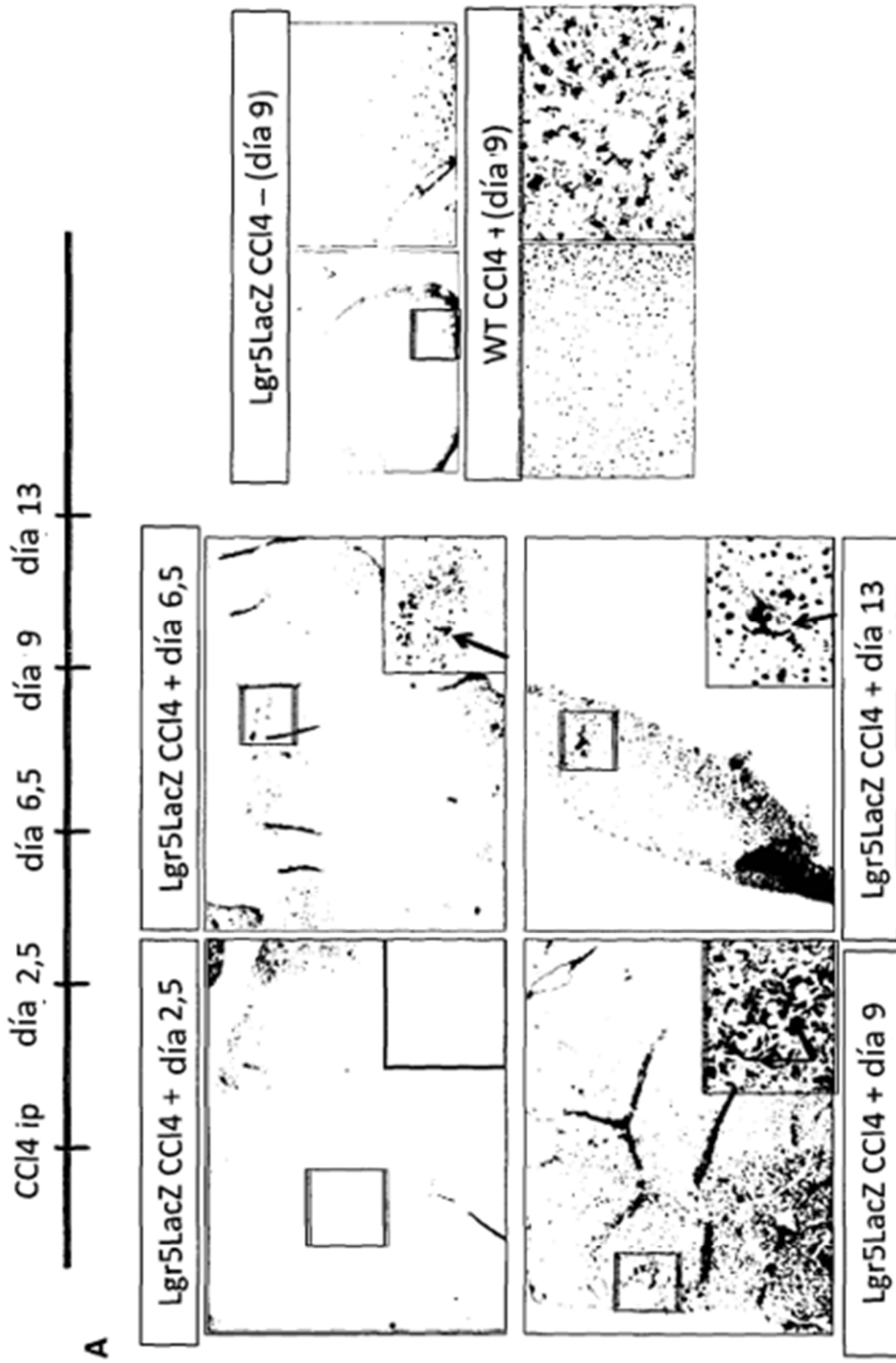


Figura 13B

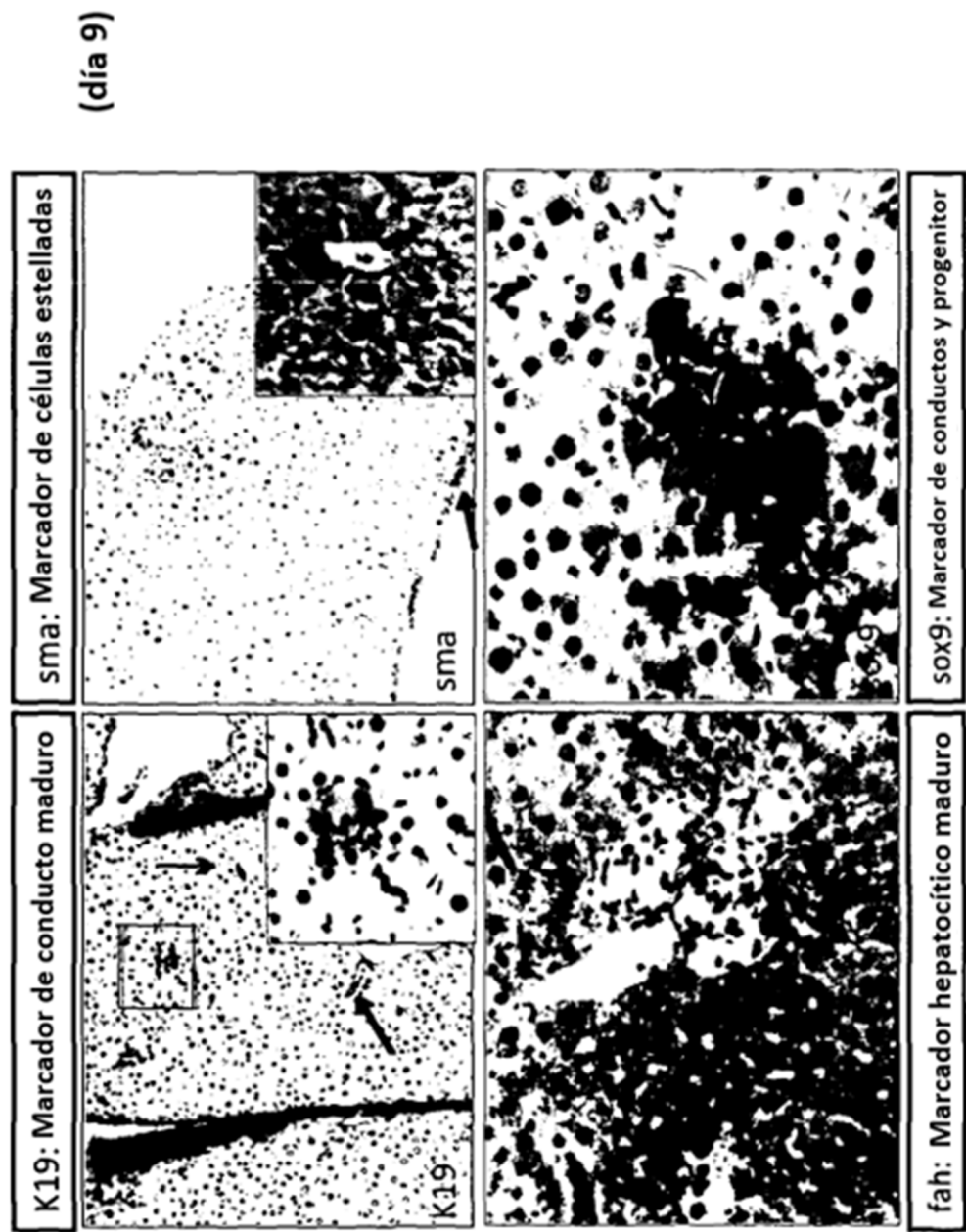




Figura 14

Figura 15

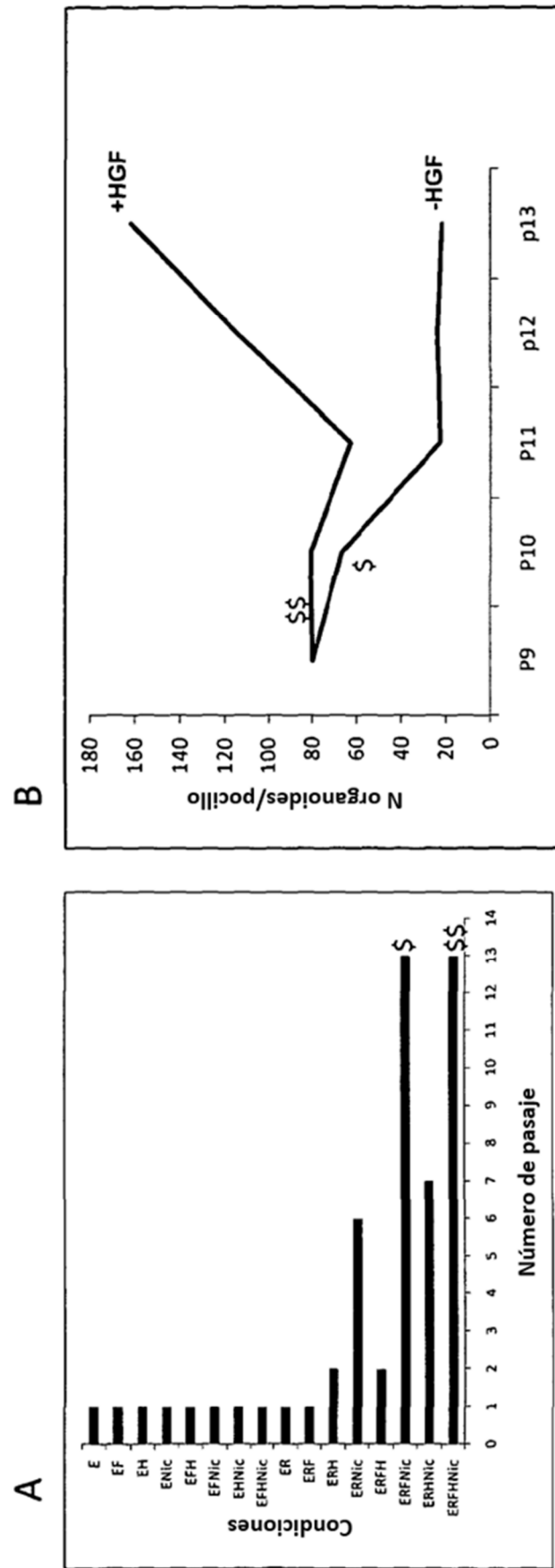


Figura 16A

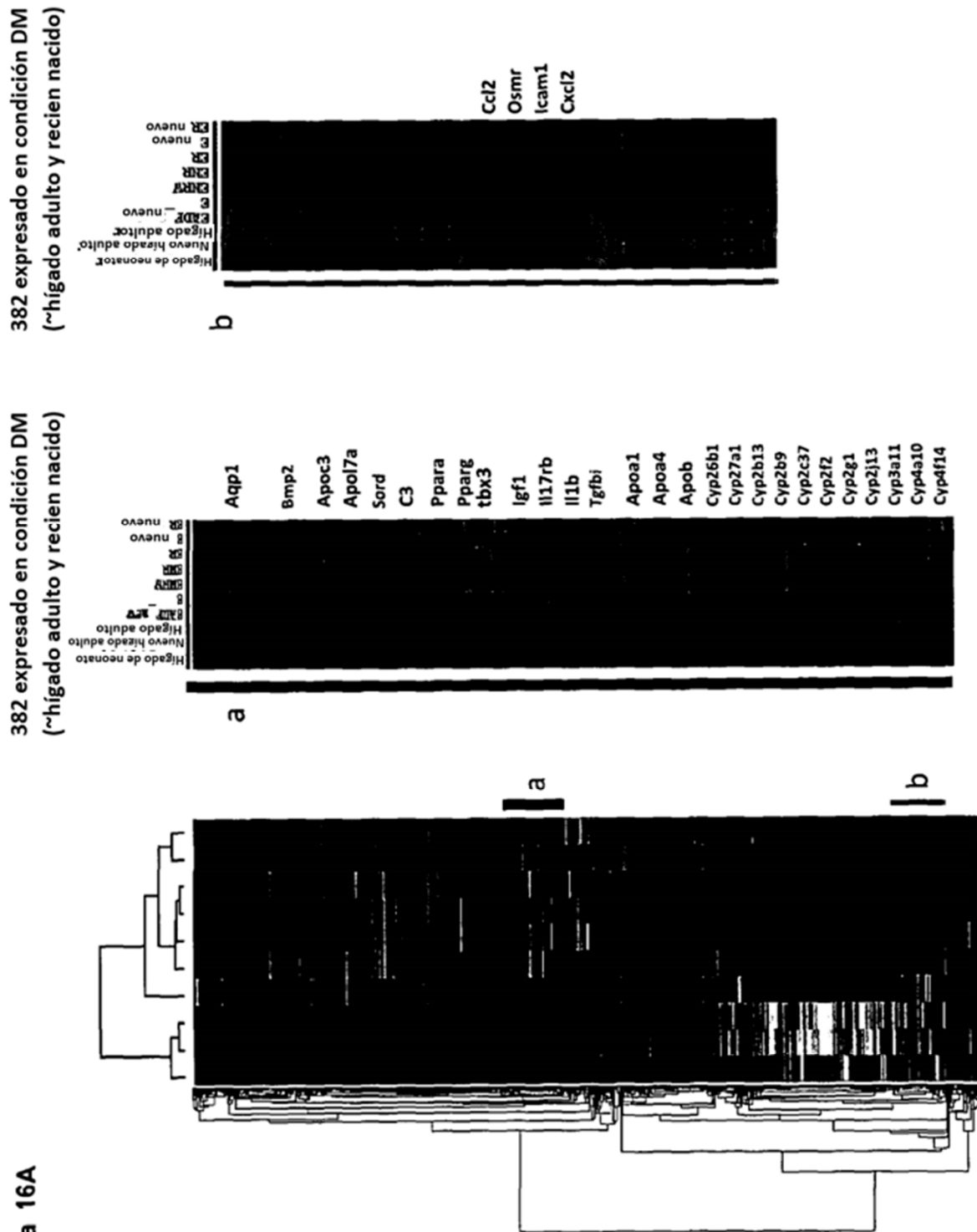


Figure 1 displays hierarchical clustering of gene expression data across various liver samples. The dendrogram on the left indicates the relationship between samples, while the heatmap on the right shows the expression levels of specific genes.

Panel a: Hierarchical clustering of all genes. The dendrogram shows a primary split between neonatal liver samples (left) and adult liver samples (right). The heatmap shows expression levels for genes *cyp2j6*, *olfm4*, *Lefty 1*, *mki67*, and *cdkn3*.

Panel b: Hierarchical clustering of genes expressed in DM. The dendrogram shows a primary split between neonatal liver samples (left) and adult liver samples (right). The heatmap shows expression levels for genes *cyp2j6*, *olfm4*, *Lefty 1*, *mki67*, and *cdkn3*.

Panel c: Hierarchical clustering of genes expressed in neonatal liver. The dendrogram shows a primary split between neonatal liver samples (left) and adult liver samples (right). The heatmap shows expression levels for genes *cyp2j6*, *olfm4*, *Lefty 1*, *mki67*, and *cdkn3*.

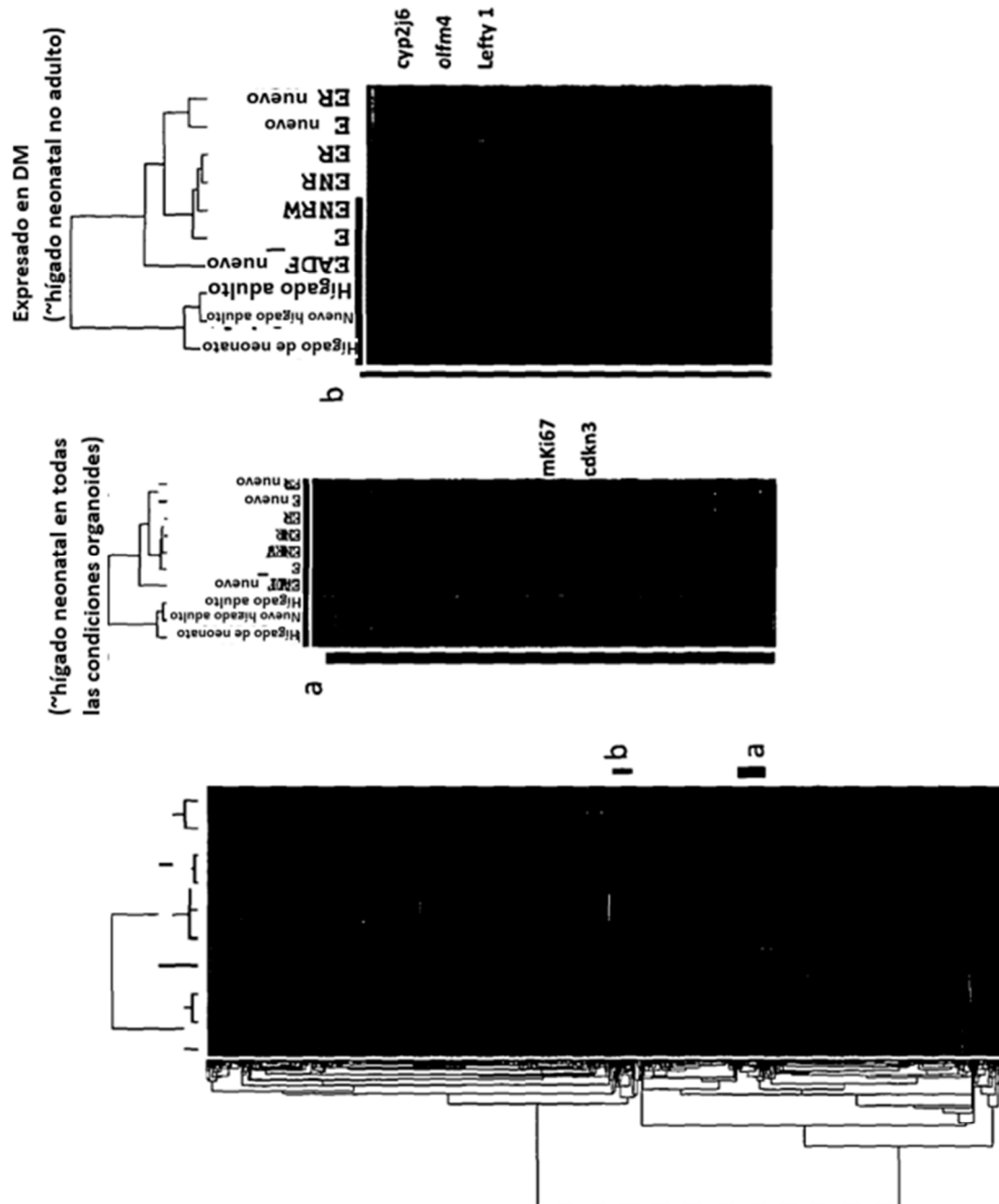


Figura 16C

Marcadores ductales	Hígado adulto	Páncreas adulto	Organoide de páncreas	Organoide hepático
Ref Mus musculus leucina aminopeptidasa 3 (Lap3), ARNm [NM_024434]	Lap3	922	3286	2655
Ref Mus musculus queratina 19 (Krt19), ARNm [NM_008471]	Krt19	566	76191	29904
Ref Mus musculus queratina 7 (Krt7), ARNm [NM_033073]	Krt7	369	147227	108352
Ref Mus musculus SRY-box que contiene gen 9 (Sox9), ARNm [NM_011448]	Sox9	185	2365	2492
Ref Mus musculus HNF1 homeobox B (Hnf1b), ARNm [NM_009330]	Hnf1b	115	608	764
Ref Mus musculus dominio de un corte miembro de familia 1 (Uncorte1), ARNm [NM_008262]	Hnf6	120	1297	1454
Factores de transcripción necesarios para la expresión de Ngn3				
Ref Mus musculus SRY-box que contiene gen 9 (Sox9), ARNm [NM_011448]	Sox9	185	2365	2492
Ref Mus musculus horquilla box A2 (Foxa2), ARNm [NM_010446]	Foxa2	1415	12948	9579
Ref Mus musculus HNF1 homeobox B (Hnf1b), ARNm [NM_009330]	Hnf1b	115	608	764
Ref Mus musculus dominio un corte, miembro de familia 1 (Uncorte1), ARNm [NM_008262]	Hnf6	120	1297	1454
Marcadores endocrinos				
Ref Mus musculus neurogenina 3 (Neurog3), ARNm [NM_009719]	Neurog3	226.5	110	118
gb Factor nuclear 1 hepatocítico de ratón (HNF-1), ARNm, cds. completo [M57966]	Hnf1a	5709.5	4929	6185
Ref Mus musculus factor nuclear 4 hepático, alfa (Hnf4a), ARNm [NM_008261]	Hnf4a	2947	385	404
Ref Mus musculus homeobox 1 pancreático y duodenal (Pdx1), ARNm [NM_008814]	Pdx1	137	201.5	198.5
Ref Mus musculus diferenciación neurogénica 1 (Neurod1), ARNm [NM_010894]	Neurod1	87	88	78.5
Ref Mus musculus factor transcripción ISL1, LIM/homeodominio (Isl1), ARNm [NM_021459]	Isl1	82	93	239
Ref Mus musculus factor transcripción NK2, locus 2 (Drosophila) (Nkx2-2), ARNm [NM_010919]	Nkx2-2	100	158	76
Ref Mus musculus factor transcripción NK2, locus 6 (Drosophila) (Nkx2-6), ARNm [NM_010920]	Nkx2-6	159	94	99
Ref Mus musculus gen 6 de box emparejado (Pax6), ARNm [NM_013627]	Pax6	157	100.5	114
Ref Mus musculus insulina II (Ins2), ARNm [NM_008387]	Ins2	195.5	107.5	85.5
Ref Mus musculus familia 2 portador soluto (transportador glucosa facilitado), miembro 2 (Slc2a2), ARNm [NM_031197]	Slc2a2	1212.5	188	143
Ref Mus musculus piruvato quinasa hígado y glóbulo rojo (Pklr), variante de transcripto 1, ARNm [NM_013631]	Pklr	237	288	186
Ref Mus musculus glucoquinasa (Gck), ARNm [NM_010292]	Gck	1771	261	162

Figura 17A

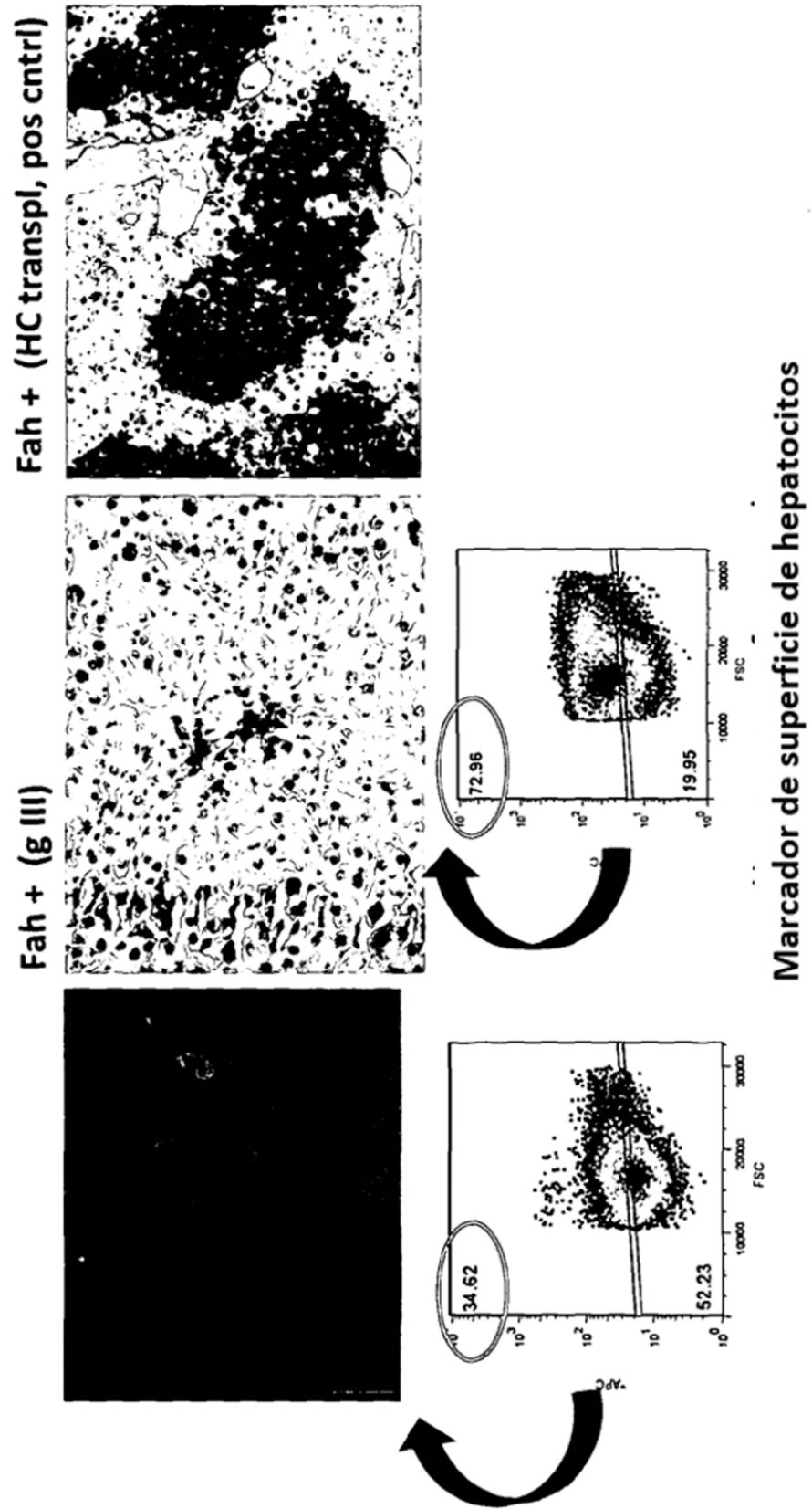


Figura 17B

Análisis de citometría de flujo para marcador de superficie de hepatocitos (HC) en células transplantadas derivadas del clon 1

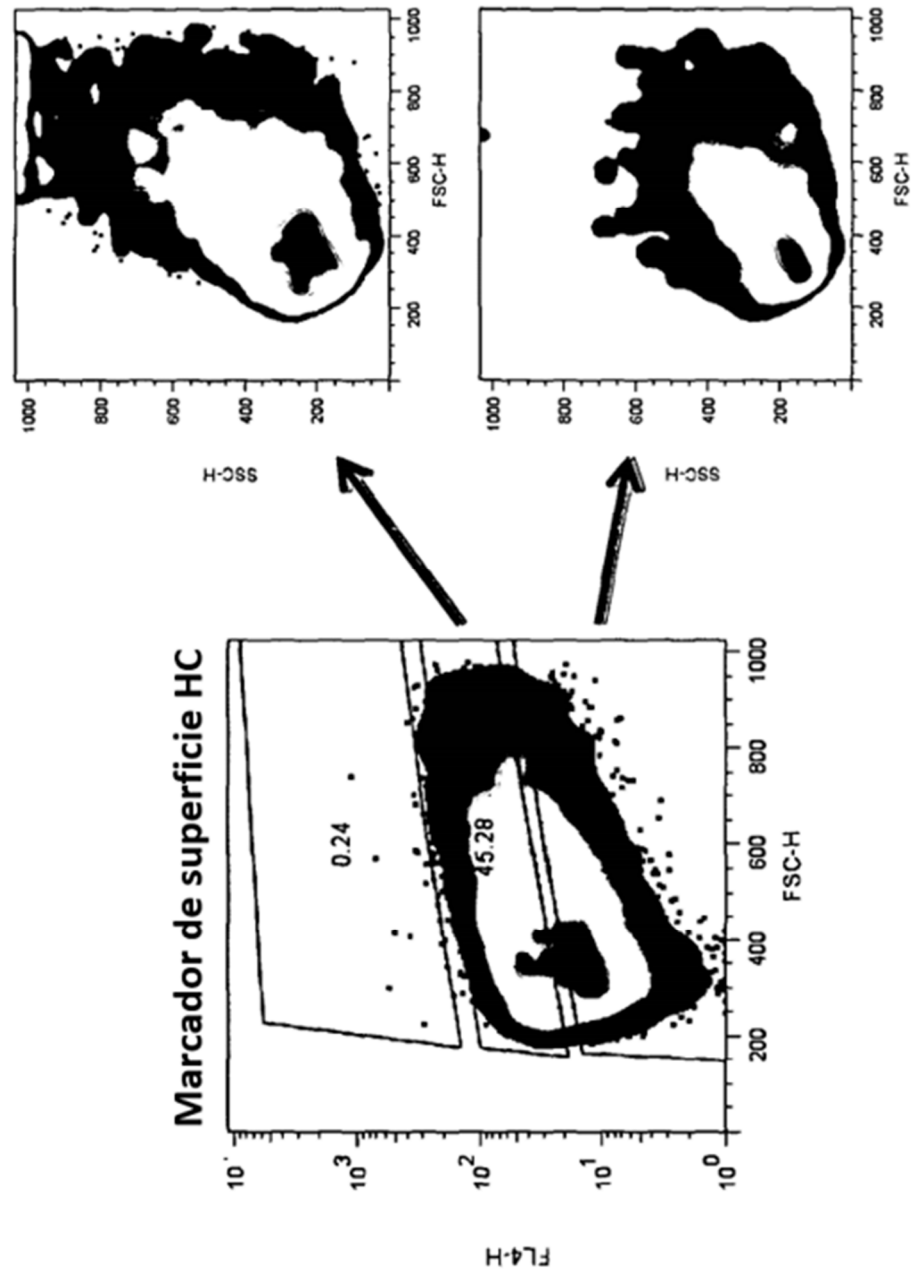


Figura 17C

Análisis de citometría de flujo para marcador de superficie de hepatocitos (HC) en células transplantadas derivadas del clon 2

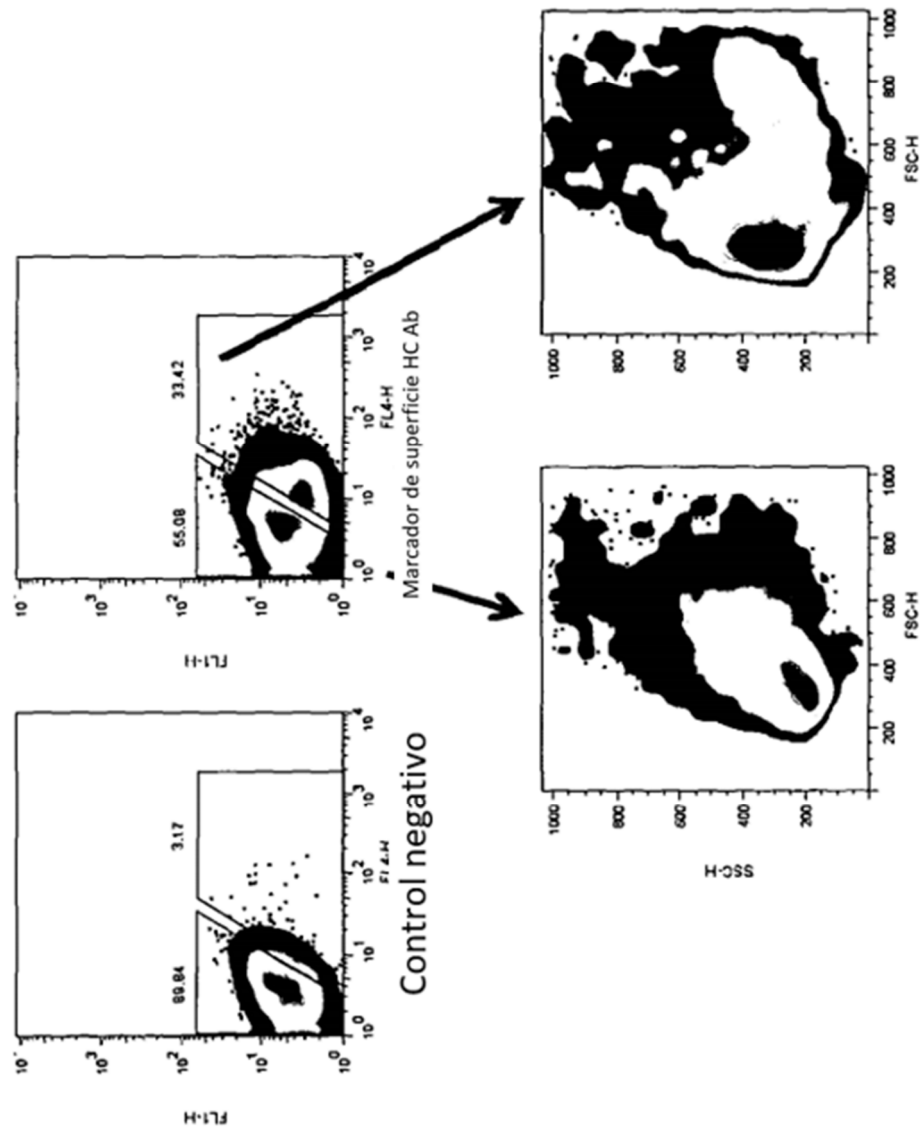
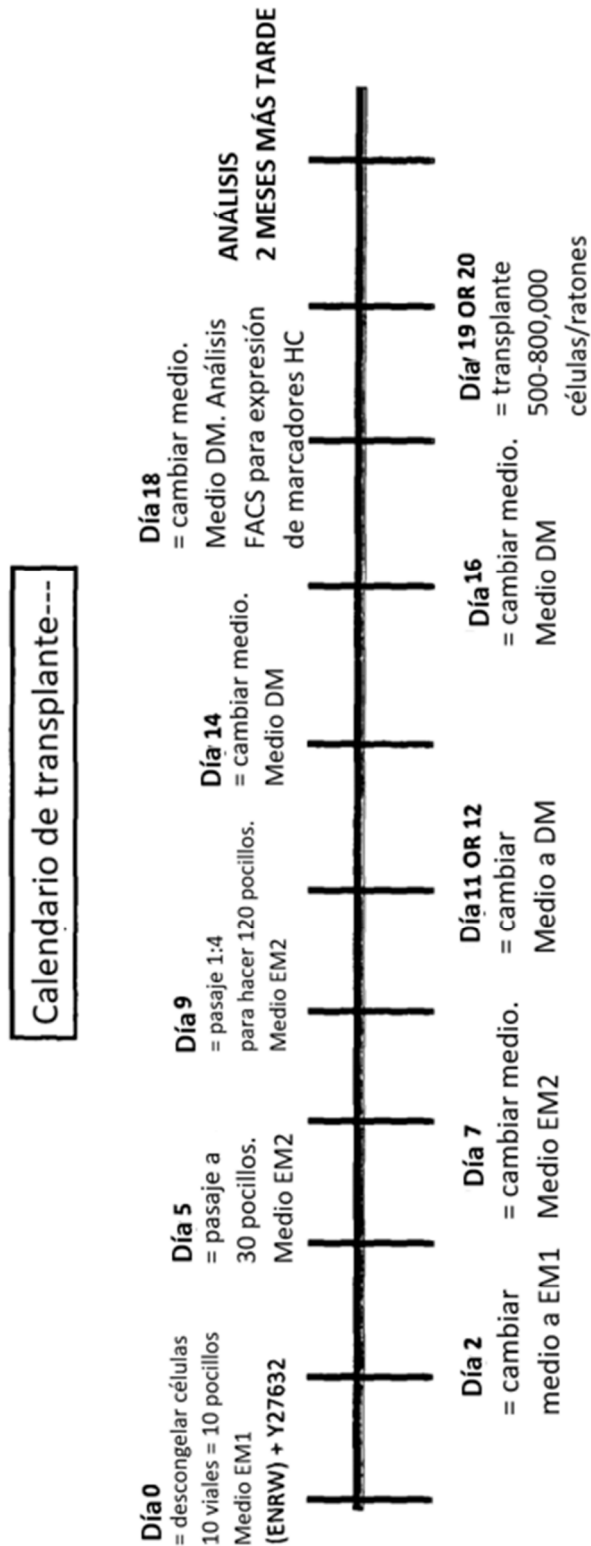


Figura 17D

Modelo de ratón: RATONES FGR adultos (FAH-/-RAG-/-IL2R-/-). Transplante de organoides o hepatocitos como control



EM1= Medio de expansión 1= ENRWFHNic

E2= Medio de expansión 2= ERFHNic

DM= Medio de diferenciación= EADF

Figura 18

<u>hígado de ratón de firma de célula madre</u>		<u>firma específica a: hígado/HC CG</u>		<u>genes reprogramadores</u>	
<u>positivo para</u>	<u>negativo para</u>	<u>positivo para en expansión</u>	<u>negativo para</u>	<u>positivo</u>	<u>negativo</u>
Igr5	Igr6	Hnf1a	afp	Klf4	Pou5f1
Igr4		Hnf1b	Ins1	Myc	Sox2
epcam		Hnf4a	Ins2		
Cd44		Hhex	Gcg		
Tnfrsf19		Onecut1	Ptf1a		
Sox9		Onecut2	Cela1		
Sp5		Prox1	Cela2a		
Cd24a		Cdh1	Cela3b		
Prom1		Foxa2	Neurod1		
Cdca7		Gata6	Neurod2		
Elf3		Foxm1	Neurog1		
		Cebpa	Neurog2		
		Cebpb	Neurog3		
		Cebpd	Amy2a4		
		Cebpg	Igf1r		
		Glul	Igf2		
		Krt7	Cd34		
		Krt19			
		Met			

Figura 19

*corte de fondo >3,5vez (gMediana); cambio tinción a Cy3/Cy5 (Cy3-muestras; Cy5-referencia ADN)														
Nº de característica	Nombre Sistemático	Descripción	Nombre de gen	ENRW_7708_1 pat1051	ER_pat_7708_2 ER_10511	EADF_7708_3 pat1051	tejido de hígado_7708_4 pat1051	ENRW_7708_1 pat1051	ER_pat1051	Señal de gMediana	Señal de gMediana	Señal de gMediana	Señal de gMediana	Señal de gMediana
Hígado humano de firma de célula madre														
40197	NM_003667	reflHomo sapiens repetición rica en leucina que contiene receptor 5 acoplado a proteína G (LGR5), ARNm [NM_003667]	LGR5											
40602	NM_018490	reflHomo sapiens repetición rica en leucina que contiene receptor 4 acoplado a proteína G (LGR4), ARNm [NM_018490]	LGR4	1.3710	1.5826	1.8852	1.1145	1602	1684	2689	82.5	83		80
4087	NM_002354	reflHomo sapiens calcio asociado a tumor transductor de señal 1 (TACSTD1), ARNm [NM_002354]	TACSTD1/E pcam	3.0978	3.5264	4.2412	-3.2251	16341	23939	42144				118
18697	NM_000610	reflHomo sapiens molécula CD44 (grupo de sangre indio) (CD44), variante de transcrito 1, ARNm [NM_000610]	CD44	0.8742	0.8495	-1.5025	-3.8418	10117	11624.5	2586.5				148.5
31576	NM_018647	reflHomo sapiens tumor necrosis superfamilia receptor factor, miembro 19 (TNFRSF19), variante de transcrito 1, ARNm [NM_018647]	TNFRSF19					83	85.5	81				81
2504	NM_000346	reflHomo sapiens SRY (región determinante de sexo Y)-box 9 (displasia campomética, inversión de sexo autosomal) (SOX9) ARNm [NM_000346]	SOX9	2.2553	2.3538	1.5394	-2.0445	484	448.5	355				88
6370	NM_001003	reflHomo sapiens factor de transcrito Sp5 (SP5) ARNm [NM_001003845]	SP5	-0.0509	0.4409	0.0402	3.3653	162	217.5	199				239.5
40879	A_23_P85250	reflHomo sapiens transductor de señal CD24 ARNm, cds completo y región 3' [L33930]	CD24	3.2316	3.5288	1.9579	-2.4236	15141.5	17882	7049				125
1705	NM_006017	reflHomo sapiens prominina 1 (PROM1), ARNm [NM_006017]	PROM1	3.2512	2.6437	2.4209	-1.5556	445	340	346				84

43572	NM_031942	reflHomo sapiens ciclo de división celular asociado 7 (CDCA7), variante transcrito 1, ARNm [NM_031942]	CDCA7	-2.4618	-3.6148	-7.7368	-5.0979	476	218	87	83
1226	NM_004433	reflHomo sapiens factor 3 tipo E74 (factor transcrito dominio ets, específico a epitelial) (ELF3), variante de transcrito 1, ARNm [NM_004433]	ELF3	3.3588	3.9163	4.2213	0.4499	6378.5	8700.5	14527	161
Genes reprogramadores											
19017	NM_004235	reflHomo sapiens factor Kruppel 4 (intestino) (KLF4), ARNm [NM_004235]	KLF4	0.3754	2.3397	1.9646	-0.9306	291	1176.5	919	105
6084	NM_002467	reflHomo sapiens v-myc mielocitomatosis oncogen viral homólogo (aviar) (MYC), ARNm [NM_002467]	MYC	-1.1416	-0.8254	-3.3457	-2.1032	3006	3896	871	323
11740	NM_002701	reflHomo sapiens POU clase 5 homeobox 1 (POU5F1), variante de transcrito 1, ARNm [NM_002701]	POU5F1	-3.9024	-3.5281	-3.8577	-1.8681	1643	2251.5	2261	1173
34630	NM_003106	reflHomo sapiens SRY (región Y determinante de sexo)-box 2 (SOX2), ARNm [NM_003106]	SOX2	-4.0411	-4.0509	-4.3534	-2.6317	131	131.5	129	98
Firma específica de hígado/HC: positivo para expansión											
22258	NM_000545	reflHomo sapiens HNF1 homeobox A (HNF1A), ARNm [NM_000545]	HNF1A	0.1593	0.4237	0.3115	2.1337	287.5	366.5	367.5	240
19971	NM_000458	reflHomo sapiens HNF1 homeobox B (HNF1B), ARNm [NM_000458]	HNF1B	3.3524	3.3315	3.1792	0.0000	200.5	200	141	86
7418	NM_000457	reflHomo sapiens factor 4 nuclear de hepatocito, alfa (HNF4A), variante de transcrito 2, ARNm [NM_000458]	HNF4A	-0.9981	1.7168	1.0493	2.0374	84.5	119.5	108	103
25738	NM_002729	reflHomo sapiens homeobox expresado hematopoyéticamente (HHEX), ARNm [NM_000458]	HHEX	0.8347	0.9290	1.4544	0.2789	1025	1263	1931	178
28260	NM_004498	reflHomo sapiens homeobox un corte 1 (UNCORTE1), ARNm [NM_004498]	UNCORTE1	0.5189	2.1647	2.9438	5.8053	120	211	327	387

30379	NM_004852	ref[Homo sapiens homeobox un corte 1 (UNCORTE2), ARNm [NM_004852]	UNCORTE2	3.4671	3.7373	3.5642	2.8300	4693	6965	6460	498
20882	NM_002763	ref[Homo sapiens homeobox prospero 1 (PROX1), ARNm [NM_002763]	PROX1	2.4930	1.0227	1.1415	2.4817	98	98	97.5	101
12860	NM_004360	ref[Homo sapiens cadherina 1, tipo 1, E-cadherina (epitelia) (CDH1) ARNm [NM_004360]	CDH1	3.3253	3.6614	4.1391	2.4935	10803	16648	25328	1076.5
33903	NM_021784	ref[Homo sapiens horquilla box A2 (FOXA2), variante de transcrito 1, ARNm [NM_021784]	FOXA2	2.8637	3.2434	3.0108	2.6774	289.5	306	398	129.5
39806	NM_005257	ref[Homo sapiens proteína 6 de enlace a GATA (GATA6), ARNm [NM_005257]	GATA6	3.0052	3.5536	3.8552	1.2789	1620	2038	3585	136
16668	NM_202002	ref[Homo sapiens horquilla box M1 (FOXM1), variante de transcrito 1, ARNm [NM_202002]	FOXM1	-1.9203	-3.6288	-5.0418	-4.5112	329	156.5	117.5	94
9214	NM_004364	ref[Homo sapiens proteína de enlace a CCAAT/potenciador (C/EBP), alfa (CEBPA), ARNm [NM_004364]	CEBPA	-0.9322	1.2903	-0.0086	4.2303	304	1257	647	1586.5
14125	NM_005194	ref[Homo sapiens proteína de enlace a CCAAT/potenciador (C/EBP), alfa (CEBPB), ARNm [NM_005194]	CEBPB	-0.1111	-0.2252	0.4127	2.5221	5257	5653.5	10124	5163.5
37458	NM_005195	ref[Homo sapiens proteína de enlace a CCAAT/potenciador (C/EBP), delta (CEBPD), ARNm [NM_005195]	CEBPD	-0.1615	0.9115	0.4583	4.1610	1525	3232	2733	2661
145	NM_001806	ref[Homo sapiens proteína de enlace a CCAAT/potenciador (C/EBP), gamma (CEBPG), ARNm [NM_001806]	CEBPG	0.9187	2.0261	1.8780	0.7494	2185	4317.5	4980	364
41435	NM_002065	ref[Homo sapiens glutamato-amoniaco ligasa (glutamina sintetasa) (GLUL), variante de transcrito 1, ARNm [NM_002065]	GLUL	-0.1834	0.0758	-0.8704	0.4736	1365.5	1338	876	311
30469	NM_005556	ref[Homo sapiens queratina 7 (KRT7), ARNm [NM_005556]	KRT7	5.1396	4.8373	4.3723	-0.0401	7538.5	4712	2627	96
13920	NM_002276	ref[Homo sapiens queratina 19 (KRT19), ARNm [NM_002276]	KRT19	4.1830	3.7196	3.6914	-2.4731	365708	424094	308350	1571
5427	NM_000245	ref[Homo sapiens met protooncogen (receptor de factor de crecimiento de heptocitos) (MET), ARNm [NM_000245]	MET	1.3614	1.0945	1.2510	-0.3692	7623.5	6639	8627	406

[illegible]

1710	NM_000039	reflHomo sapiens apolipoproteína A-I (APOA1), mRNA [NM_000039]	APOA1	-3.5478	-2.8913	-2.1400	5.2314	370	536	1014.5	24580
8511	NM_002130	reflHomo sapiens 3-hidroxi-3-metilglutaril-Coenzima A sintasa 1 (soluble) (HMGCS1) variante de transcrito 2, mRNA [NM_002130]	HMGCS1	1.9834	1.8579	-1.2536	1.9013	1518	1248	264	271
2331	NM_138711	reflHomo sapiens peroxisoma receptor gamma activado por proliferador (PPARG), variante de transcrito 3, mRNA [NM_138711]	PPARG	1.9376	3.5421	1.0259	-0.9723	794	2235	489	102
42261	NM_000767	reflHomo sapiens citocroma P450, familia 2, subfamilia B, polipéptido 6 (CYP2B6), mRNA [NM_000767]	CYP2B6	3.1696	3.8429	3.7438	7.0424	691	835	1376	23535
40086	NM_000772	reflHomo sapiens citocroma P450, familia 2, subfamilia C, polipéptido 18 (CYP2C18), mRNA [NM_000772]	CYP2C18	7.6099	8.9559	7.5195	8.1267	441	938	458.5	231
18649	NM_000771	reflHomo sapiens citocroma P450, familia 2, subfamilia C, polipéptido 9 (CYP2C9), mRNA [NM_000771]	CYP2C9	7.4072	9.3744	7.5571	10.9138	371.5	1144	765	3195
1249	NM_000775	reflHomo sapiens citocroma P450, familia 2, subfamilia J, polipéptido 2 (CYP2J2), mRNA [NM_000775]	CYP2J2	2.6839	2.5692	2.5672	5.4100	839	595.5	802	682.5
37457	NM_017460	reflHomo sapiens citocroma P450, familia 3, subfamilia A, polipéptido 4 (CYP3A4), mRNA [NM_017460]	CYP3A4	6.0960	6.9956	7.3093	9.3567	400.5	1260	1142	496.5
33810	ENST00000439761	reflHomo sapiens CYP3A5 mRNA, alelo CYP3A5*3, exon 4B y cds parcial, alternativamente escindido [AF355801]	CYP3A5	-0.3739	0.1067	0.0937	1.4438	736	962.5	1172	403.5
2423	NM_000765	reflHomo sapiens citocroma P450, familia 3, subfamilia A, polipéptido 7 (CYP3A7), mRNA [NM_000765]	CYP3A7	5.5511	7.1260	6.6750	8.9567	3649	10927	9853	5989
14586	NM_007253	reflHomo sapiens citocroma P450, familia 4, subfamilia F, polipéptido 8 (CYP4F8), mRNA [NM_007253]	CYP4F8	2.7132	4.1535	2.5950	5.9628	686	2541.5	825.5	1176
14415	NM_207352	reflHomo sapiens citocroma P450, familia 4, subfamilia V, polipéptido 2 (CYP4V2), mRNA [NM_207352]	CYP4V2	2.9194	2.9333	2.7663	5.2822	853	995	923.5	822
29103	NM_005505	reflHomo sapiens receptor scavenger, clase B, miembro 1 (SCARB1), variante de transcrito 1, mRNA [NM_005505]	SCARB1	-0.6468	-0.4215	-1.0325	2.0324	14042	23763	13137	22012