

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 883 159**

51 Int. Cl.:

**C12N 5/095** (2010.01)

**C12N 5/00** (2006.01)

**C12N 5/071** (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.11.2015 PCT/EP2015/077988**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.06.2016 WO16083612**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.11.2015 E 15801830 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.06.2021 EP 3224351**

54 Título: **Medio de cultivo para expandir células madre epiteliales de mama**

30 Prioridad:

**27.11.2014 GB 201421094**

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

**07.12.2021**

73 Titular/es:

**KONINKLIJKE NEDERLANDSE AKADEMIE VAN  
WETENSCHAPPEN (100.0%)**

**Uppsalalaan 8  
3584 CT Utrecht, NL**

72 Inventor/es:

**SACHS, LARS NORMAN;  
GRACANIN, ANA y  
DROST, JARNO**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO BLANCO, María Alicia**

ES 2 883 159 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**

Medio de cultivo para expandir células madre epiteliales de mama

**5 CAMPO TÉCNICO**

La invención pertenece al campo de los medios y métodos de cultivo de células madre epiteliales de mama, en particular medios de cultivo y métodos para expandir poblaciones de células madre epiteliales de mama, por ejemplo, células madre epiteliales de mama humanas.

10

**ANTECEDENTES**

Hay un gran interés en los medios de cultivo y los métodos para expandir las poblaciones de células madre. Las poblaciones de células madre tienen muchos usos. Por ejemplo, las células madre y su progenie diferenciada pueden usarse en ensayos celulares, selección de fármacos y ensayos de toxicidad. Las células madre también son prometedoras para las terapias basadas en células, como en la medicina regenerativa para el tratamiento de tejido dañado. Además, los medios de cultivo celular eficientes son importantes para proporcionar y mantener poblaciones de células con propósitos de investigación.

15

Se han descrito métodos para el cultivo a largo plazo de células madre epiteliales o fragmentos de tejido derivados de varios tejidos (por ejemplo, páncreas, colon, criptas intestinales, estómago, hígado y próstata) (ver las WO 2010/090513, WO2012/014076 y WO2012/168930). Sin embargo, se ha descubierto que estos métodos son incapaces de soportar el cultivo a largo plazo de células madre epiteliales o fragmentos de tejido derivados del tejido mamario.

20

25

Un sistema de cultivo para cultivar células madre epiteliales derivadas de tejido mamario normal se describe en Pasic et al. (2011) *Genes & Development* 25:1641-1653. Sin embargo, este sistema no puede mantener el cultivo a largo plazo de organoides mamarios. Se ha observado que los cultivos que usan este sistema dejan de expandirse después de 2-3 pases. Por consiguiente, no es posible obtener un gran número de células madre usando esta técnica.

30

Un sistema de cultivo para cultivar células tumorales circulantes de pacientes con cáncer de mama se describe en Yu et al. (2014) *Science* 345(6193):216-220. Sin embargo, los autores de este artículo no proporcionaron ninguna orientación con respecto al cultivo de células madre epiteliales mamarias obtenidas de tejido mamario normal, tumor primario o metástasis. Además, las células tumorales mamarias circulantes cultivadas usando el sistema de Yu et al. forman agregados de células.

35

Por lo tanto, hay una necesidad de medios de cultivo y métodos para cultivar células madre epiteliales de mama obtenidas de tejido de mama normal, tumores primarios o metástasis que permitan el cultivo a largo plazo. También hay una necesidad de medios de cultivo y métodos para cultivar células tumorales de mama circulantes que permitan la formación de organoides de mama que se parezcan mucho a los tumores de mama.

40

La WO2014/066649 divulga una estrategia para diseñar varios tejidos, organoides y vasculatura 3D. La WO2010129294 divulga moléculas pequeñas que soportan el crecimiento de células pluripotentes y métodos del mismo. LA US2014/243227 divulga medios de cultivo para células madre. La WO2010011352 divulga composiciones para células multipotentes IS11+ derivadas del mesodermo (IMPS), células progenitoras epicárdicas (SPCS) y células CXCR4+CD56+ multipotentes (C56CS) y métodos de uso.

45

**SUMARIO DE LA INVENCION**

50

La invención proporciona un método para expandir células madre epiteliales de mama que comprende:

proporcionar una población de células madre de mama;

55

proporcionar un medio de cultivo que comprende un ligando de ErbB3/4, uno o más ligandos de FGFR2b y un agonista de Wnt;

poner en contacto las células madre con el medio de cultivo; y

60

cultivar las células en condiciones apropiadas.

La invención proporciona además un medio de cultivo que comprende un ligando de ErbB3/4 y uno o más ligandos de FGFR2b y un agonista de Wnt.

65

La divulgación proporciona además un medio de cultivo que comprende un ligando de ErbB3/4 adecuado

para expandir una población de células madre epiteliales de mama durante por lo menos 4 pases.

La divulgación proporciona además un organoide de mama que comprende una población de células madre epiteliales de mama. En algunos casos, dicho organoide de mama puede obtenerse o se obtiene mediante un método de la invención.

La divulgación proporciona además un organoide de mama de la divulgación en un medio de cultivo de la invención.

La divulgación proporciona además el uso de un organoide de mama de la divulgación, o una célula derivada de dicho organoide, en un cribado de descubrimiento de fármacos; ensayo de toxicidad; investigación de embriología de tejidos, linajes celulares o vías de diferenciación; estudios de expresión génica que incluyen expresión génica recombinante; investigación de mecanismos implicados en la lesión o reparación de tejidos; investigación de enfermedades inflamatorias e infecciosas; estudios de mecanismos patogénicos; o estudios de mecanismos de transformación celular o etiología del cáncer.

La divulgación proporciona además un organoide de la divulgación, o una célula derivada de dicho organoide, para su uso en medicina.

La divulgación proporciona además un medio de cultivo que comprende un agente estabilizador de p53.

## DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

**Figura 1.** (A) Tejidos de tumor de mama obtenidos de pacientes que se muestran de acuerdo con el subtipo (estado del receptor de estrógeno (ER), del receptor de progesterona (PR) y del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2)); (B) líneas organoides establecidas o prometedoras que se muestran de acuerdo con el subtipo (estado ER, PR y HER2).

**Figura 2.** Imágenes de contraste de fase de tumor de mamada (A) establecido y prometedor y (B) líneas organoides normales. Las barras de escala equivalen a 150  $\mu$ m.

**Figura 3.** Ejemplo de optimización de medios. Se suspendieron células mamarias normales y tumorales del paciente W855 en extracto de membrana basal Cultrex® (Trevigen, Inc.) y se suplementaron con el medio indicado. Las imágenes de contraste de fase se muestran para: (A) Pase 0 día 4 y (B) Pase 0 día 14. Las condiciones de cultivo más beneficiosas están marcadas con recuadros grises en negrita. Anchuras de imagen: paneles superiores de 1,5 mm, paneles inferiores de 300  $\mu$ m.

**Figura 4.** Cariotipos aneuploides de líneas organoides tumorales mamarias establecidas.

**Figura 5.** Comparación histológica e inmunohistoquímica del tejido de la glándula mamaria original (tumor W854 (W854T), W855 normal y tumor (W855N y W855T), tumor W859 (W859T)) con las líneas organoides derivadas respectivamente. Las barras de escala equivalen a 100  $\mu$ m (descripción general) y 20  $\mu$ m (vista detallada). **Clave:** HE = tinción con hematoxilina y eosina; PR = receptor de progesterona (clon PgR 636, M356929 Dako), ER = receptor de estrógeno alfa (clon SP1, ab16660 Abcam), HER2 = receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (c-erbB2) (clon SP3, #RM-9103, ThermoScientific).

**Figura 6.** Análisis inmunofluorescente de líneas organoides mamarias completas montadas normales (W855) y tumorales (W854, W855 y W859). La contratinción nuclear es DRAQS (DR50050 Biotatus limited). La barra de escala equivale a 100  $\mu$ m. **Clave:** Krt8 = queratina-8 (clon Ks8.7, sc101459 Santa Cruz), Krt14 = queratina-14 (clon AF64, PRB-155P Covance), ER = receptor de estrógenos alfa (clon C1355, Fisher 50-172-167), E-cadherina (clon 36/E-cadherina, 61082 BD Biosciences), HER2 = receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (c-erbB2) (clon SP3, # RM-9103, ThermoScientific), PR = receptor de progesterona (clon PgR 636, M356929 Dako).

**Figura 7.** PCR cuantitativa en organoides para marcadores basales (KRTS/14), luminales (KRT8), epiteliales (CDH1) y mesenquimales (VIM, ZEB1) normalizados a la línea de organoides mamarios normales W855N.

**Figura 8.** Imágenes de contraste de fase de las líneas de organoides de tumores mamarios W854T, W855T y W859T durante una selección de fármacos piloto con dosis crecientes del inhibidor de EGFR Iressa o del estabilizador de p53 Nutlin-3. Los organoides visiblemente afectados están marcados con recuadros negros en negrita. Los anchos de imagen son 500  $\mu$ m.

**Figura 9.** Viabilidad de las líneas de organoides de tumores mamarios W854T, W855T y W859T tratadas con dosis crecientes del inhibidor de EGFR Iressa o del estabilizador de p53 Nutlin-3 durante 7 días, medido por un ensayo de ATP luminiscente (CellTiter-Glo 2.0, G9241 Promega).

**Figura 10.** Organoides mamarios normales en el medio de cultivo descrito en Pasic et al. en comparación con los organoides del mismo paciente cultivados en medio base-F7/10E.

**Figura 11.** Organoides de tumores mamarios de ratón. Imágenes de contraste de fase de organoides establecidas a partir de tumores mamarios KB2P que carecen de Brca2 y p53, pase 4, los anchos de imagen son de 7 mm, 1,5 mm y 600  $\mu$ m.

**Figura 12.** Organoides de tumor mamario metastásico humano. Imágenes de contraste de fase de organoides establecidos a partir de una metástasis de cáncer de mama humano en la piel, pase 5, los anchos de imagen son 7 mm, 1,5 mm y 600  $\mu$ m.

**Figura 13.** Descripción general de cultivos organoides mamarios.

**Figura 14.** Medios de cultivo organoides.**DESCRIPCIÓN DETALLADA**

5 Los métodos para cultivar células madre epiteliales de una variedad de tejidos se han descrito previamente en la WO2010/090513, la WO2012/014076 y la WO2012/168930. Los presentes inventores han descubierto sorprendentemente que la adición de un ligando de ErbB3/4 al medio de cultivo permite cultivar células madre epiteliales de mama durante un mayor número de pases en comparación con cuando el ligando de ErbB3/4 está ausente del medio.

10 La capacidad de mantener las células y los organoides resultantes vivos durante más tiempo y aumentar el número de pases permite, de manera ventajosa, obtener más células de una colección de células de partida de lo que era posible usando métodos anteriores. Esto permite que esté disponible un gran número de células para varias aplicaciones, por ejemplo, la selección de fármacos, en la que se requiere una gran cantidad de material para probar varios fármacos diferentes. La capacidad de generar las células a partir de una única fuente de partida es ventajosa para tales aplicaciones donde es necesario comparar los resultados entre experimentos. Además, la capacidad mejorada de obtener más células a partir de una pequeña colección de células de partida (por ejemplo, una colección de aproximadamente 100-300 células) es ventajosa para aplicaciones en las que hay poco material de partida disponible, como biopsias de cáncer primario o metastásico o células tumorales circulantes. De manera similar, significa que hay muchas células disponibles para su uso en trasplantes, por ejemplo, en la reconstrucción o mejora de la mama, y que pueden trasplantarse múltiples pacientes con células obtenidas de un donante útil.

25 El cultivo de las células en un medio de la invención permite que las células se multipliquen a la vez que retienen su fenotipo de células madre o progenitoras, a lo que se hace referencia en la presente como expansión. Se forman organoides que comprenden estas células madre o progenitoras. Por tanto, el uso del medio de la invención es ventajoso para proporcionar un mayor número de estas células madre o progenitoras útiles y para obtener organoides que contienen estas células.

30 Por consiguiente, se proporciona un método para cultivar células madre epiteliales de mama, en donde dicho método comprende cultivar una o más células madre epiteliales de mama en contacto con una matriz extracelular en presencia de un medio de cultivo, el medio de cultivo comprendiendo un medio basal para células animales o humanas al que se añaden uno o más ligandos de ErbB3/4.

35 El medio de cultivo usado en el método de la invención comprende un ligando de ErbB3/4, uno o más ligandos de FGFR2b y un agonista de Wnt.

40 En realizaciones preferidas, el medio de cultivo de la invención comprende un medio basal para células animales o humanas al que se le añaden uno o más ligandos de ErbB3/4 (por ejemplo, 1, 2, 3, 4 o más de 4), uno o más ligandos de FGFR2b (por ejemplo, 1, 2, 3, 4 o más de 4), preferiblemente en donde el uno o más ligandos de FGFR2b es FGF7 y/o FGF10, y uno o más agonistas de Wnt (por ejemplo, 1, 2, 3, 4 o más de 4), preferiblemente en donde el uno o más agonistas de Wnt es un agonista de Lgr5, preferiblemente en donde el agonista de Lgr5 es una Rspodina, por ejemplo, cualquiera de Rspodina 1-4.

45 En algunas realizaciones, el medio de cultivo de la invención o el medio de cultivo usado en el método de la invención comprende uno o más componentes adicionales seleccionados de: un ligando de FGFR2b (por ejemplo, FGF7 y/o FGF10), un agonista de Lgr5 (por ejemplo, Rspodina, por ejemplo, cualquiera de Rspodina 1-4), un inhibidor de BMP (por ejemplo, Noggin), B27, N-acetilcisteína, nicotinamida, un inhibidor de ROCK, un inhibidor de TGF-beta (por ejemplo, un inhibidor de ALK 4, 5, 7, por ejemplo, A83-01) y un inhibidor de la quinasa MAP p38 (por ejemplo, SB 202190). En algunas realizaciones, el medio de cultivo comprende además por lo menos dos, por lo menos tres, por lo menos cuatro, por lo menos cinco, por lo menos seis, por lo menos siete (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7) de estos componentes. En algunas realizaciones, el medio de cultivo comprende además todos estos componentes adicionales.

55 En algunas realizaciones, el medio de cultivo comprende además un ligando del receptor de tirosina quinasa adicional, por ejemplo, EGF.

El medio de cultivo comprende un agonista de Wnt, por ejemplo, Wnt3a.

60 En algunas realizaciones, el medio de cultivo comprende además uno o más de anfirregulina, TGF-alfa y PDGF-CC. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el medio de cultivo comprende además PDGF-CC. En algunas realizaciones, el medio de cultivo comprende además anfirregulina, TGF-alfa y PDGF-CC. La divulgación proporciona por tanto el uso de un ligando de ErbB3/4 para cultivar células madre epiteliales de mama.

65 En la presente se divulga un método para cultivar células madre epiteliales de mama que usa un medio de expansión como se describe en la WO2012/168930, la WO2010/090513 o la WO2012/014076 al que se le añaden

por lo menos uno (por ejemplo, 1, 2, 3, 4 o más de 4) ligandos de ErbB3/4 y por lo menos uno (por ejemplo, 1, 2, 3, 4 o más de 4) ligandos de FGFR2b.

Los presentes inventores también han descubierto sorprendentemente que la adición de un agente estabilizador de p53 a un medio de cultivo puede asegurar que la población celular sea predominantemente de células tumorales. Sin desear estar limitados por ninguna teoría, se cree que los agentes estabilizadores de p53 aumentan la concentración celular de p53 (por ejemplo, bloqueando la interacción entre p53 y Mdm2), estimulan la expresión dependiente de p53 e inducen la senescencia celular. Las mutaciones de p53 se producen comúnmente en células tumorales, lo que puede dar como resultado que la proteína p53 mutante no pueda ser estabilizada por un agente estabilizador de p53. Por tanto, un subconjunto de células tumorales con la proteína p53 mutante escaparía de la senescencia inducida por un agente estabilizador de p53 y superaría el crecimiento de las células normales en una población mixta.

La divulgación proporciona además por lo tanto el uso de un agente estabilizador de p53 para cultivar células tumorales.

La divulgación también proporciona un método para cultivar células madre tumorales que usa un medio de expansión como se describe en la presente o en la WO2012/168930, la WO2010/090513 o la WO2012/014076 al que se le añade por lo menos un (por ejemplo, 1, 2, 3, 4 o más de 4) agente estabilizador de p53. La divulgación también proporciona un medio de cultivo que comprende un agente estabilizador de p53. Preferiblemente, el medio de cultivo es un medio de cultivo como se describe en la presente o en la WO2012/168930, la WO2010/090513 o la WO2012/014076. Preferiblemente, el medio de cultivo es adecuado para cultivar células madre epiteliales.

Un agente estabilizador de p53 preferido es un miembro de la familia Nutlin, por ejemplo, Nutlin-1, Nutlin-2 o Nutlin-3. Por ejemplo, en algunos casos, el agente estabilizador de p53 es Nutlin-3. Se conocen en la técnica otros agentes estabilizadores de p53 (por ejemplo, CP-31398) y el experto en la técnica podrá usar cualquiera de estos en como corresponde.

#### Ligando de ErbB3/4

La familia de tirosina quinasas del receptor de ErbB consiste de cuatro receptores de superficie celular: i) ErbB1/EGFR/HER1, ii) ErbB2/HER2, iii) ErbB3/HER3, y iv) ErbB4/HER4. Un ligando de ErbB3/4 se define en la presente como un ligando que es capaz de unirse a ErbB3 y/o ErbB4. Por consiguiente, EGF no es un ligando de ErbB3/4 porque no se une a ErbB3/4. En algunas realizaciones, el ligando de Erb3/4 se une a ErbB3 y no se une a ErbB4. En algunas realizaciones, el ligando de Erb3/4 se une a Erb4 y no se une a Erb3. En algunas realizaciones, la unión del ligando de ErbB3/4 a ErbB3 o ErbB4 induce la heterodimerización de dicho ErbB3 o dicho ErbB4 con ErbB2. En algunas realizaciones, la inducción de la heterodimerización de ErbB3 o ErbB4 con ErbB2 estimula la actividad quinasa intrínseca, lo que lleva a la fosforilación de tirosina. En el contexto de un medio de cultivo de la invención, un ligando de ErbB3/4 se conoce como "N".

En la técnica se conocen varios ligandos de ErbB3/4. En realizaciones preferidas, el uno o más ligandos de ErbB3/4 del medio de cultivo son miembros de la familia neuregulinas/herregulinas. A la familia de neuregulinas/herregulinas se hace referencia en la presente como la familia de neuregulinas. La familia de la neuregulinas es una familia de factores de crecimiento polipeptídicos estructuralmente relacionados que son productos génicos de genes cortados y empalmados alternativamente NRG1, NRG2, NRG3 y NRG4. En realizaciones más preferidas, el uno o más ligandos de ErbB3/4 del medio de cultivo son polipéptidos que son productos génicos de uno o más de NRG1, NRG2, NRG3 y NRG4 (es decir, un polipéptido de neuregulina). En algunas realizaciones, el ligando de ErbB3/4 es un polipéptido que es un producto génico de NRG1. El polipéptido que es un producto génico de NRG1, NRG2, NRG3 y NRG4 puede ser cualquiera de las isoformas que resultan del corte y empalme alternativo de ARNm de NRG1, NRG2, NRG3 o NRG4. Por tanto, por ejemplo, el polipéptido que es un producto génico de NRG1 puede ser cualquiera de las siguientes isoformas: NRG1 Tipo I (también conocida como herregulina, factor de diferenciación NEU (NDF) o receptor de acetilcolina inductor de actividad (ARIA)), NRG1 Tipo II (también conocido como factor de crecimiento glial-2 (GGF2)), NRG1 Tipo III (también conocido como factor derivado de neuronas sensoriales y motoras (SMDF)), NRG1 Tipo IV, NRG1 Tipo V o NRG1 Tipo VI. En algunas realizaciones, el polipéptido de neuregulina es pro-neuregulina-1, isoforma de isoforma unida a membrana HRG-beta1 (NP\_039250.2), pro-neuregulina-1, isoforma de isoforma unida a membrana HRG-beta1b (NP\_001153471.1), pro-neuregulina-1, isoforma de isoforma unida a membrana HRG-beta1c, (NP\_001153467.1), pro-neuregulina-1 o isoforma de isoforma unida a membrana HRG-beta1d (NP\_001153473.1).

En algunas realizaciones, el ligando de ErbB3/4 es de origen humano. Por consiguiente, en algunas realizaciones, el ligando de ErbB3/4 es un producto génico humano de uno o más de NRG1, NRG2, NRG3 y NRG4 (es decir, un polipéptido de neuregulina humana).

En algunas realizaciones, el gen NRG1 tiene la secuencia del Gen ID: 3084 o NG\_012005.1. En algunas realizaciones, el gen NRG2 tiene la secuencia del Gen ID: 9542. En algunas realizaciones, el gen NRG3 tiene la

secuencia del Gen ID: 10718 o NG\_013373.1. En algunas realizaciones, el gen NRG4 tiene la secuencia mostrada del Gen ID: 145957.

5 En algunas realizaciones, un polipéptido de neuregulina es un producto génico de NRG1 y tiene la secuencia mostrada en NP\_001153467.1 (SEQ ID NO: 1), NP\_001153468.1 (SEQ ID NO: 2), NP\_001153471.1 (SEQ ID NO: 3), NP\_001153473.1 (SEQ ID NO: 4), NP\_001153474.1 (SEQ ID NO: 5), NP\_001153476.1 (SEQ ID NO: 6), NP\_001153477.1 (SEQ ID NO: 7), NP\_001153479.1 (SEQ ID NO: 8), NP\_001153480.1 (SEQ ID NO: 9), NP\_004486.2 (SEQ ID NO: 10), NP\_039250.2 (SEQ ID NO: 11), NP\_039251.2 (SEQ ID NO: 12), NP\_039252.2 (SEQ ID NO: 13), NP\_039253.1 (SEQ ID NO: 14), NP\_039254.1 (SEQ ID NO: 15), NP\_039256.2 (SEQ ID NO: 16) o  
10 NP\_039258.1 (SEQ ID NO: 17). En algunas realizaciones, un polipéptido de neuregulina es un producto génico de NRG2 y tiene la secuencia mostrada en NP\_001171864.1 (SEQ ID NO: 18), NP\_004874.1 (SEQ ID NO: 19), NP\_053584.1 (SEQ ID NO: 20), NP\_053585.1 (SEQ ID NO: 21), o NP\_053586.1 (SEQ ID NO: 22). En algunas realizaciones, un polipéptido de neuregulina es un producto génico de NRG3 y tiene la secuencia mostrada en NP\_001010848.2 (SEQ ID NO: 23), NP\_001159444.1 (SEQ ID NO: 24) o NP\_001159445.1 (SEQ ID NO: 25). En  
15 algunas realizaciones, un polipéptido de neuregulina es un producto génico de NRG4 y tiene la secuencia mostrada en NP\_612640.1 (SEQ ID NO: 26).

20 En algunas realizaciones, el por lo menos un ligando de ErbB3/4 es una variante biológicamente activa de uno o más ligandos de ErbB3/4 de origen natural, por ejemplo, de uno o más miembros de la familia de las neuregulinas. Las variantes de neuregulina, que pueden ser de origen natural (por ejemplo, variantes alélicas que se producen en el locus NRG1) o producidas de manera recombinante, tienen secuencias de aminoácidos que son iguales, similares o sustancialmente similares a un polipéptido de neuregulina.

25 En algunas realizaciones, una variante de neuregulina tiene una secuencia que es por lo menos un 70%, por lo menos un 80%, por lo menos un 85%, por lo menos un 90%, por lo menos un 95%, por lo menos un 96%, por lo menos un 97%, por lo menos un 98%, por lo menos un 99% o 100% idéntica a un polipéptido de neuregulina, por ejemplo, la variante de neuregulina tiene una secuencia que es por lo menos un 70%, por lo menos un 80%, por lo menos un 85%, por lo menos un 90%, por lo menos un 95%, por lo menos un 96%, por lo menos un 97%, por lo menos un 98%, por lo menos un 99% o 100% idéntica a cualquiera de las SEQ ID NO: 1-26.  
30

En algunas realizaciones, el por lo menos un ligando de ErbB3/4 es por lo menos un fragmento biológicamente activo de por lo menos un ligando de ErbB3/4 de origen natural, por ejemplo, un fragmento biológicamente activo de uno o más polipéptidos de neuregulina.

35 En la presente se define que "biológicamente activo" significa que el ligando de ErbB3/4, por ejemplo, la variante o fragmento, es capaz de unirse a ErbB3 y/o ErbB4, opcionalmente en donde la unión a ErbB3 y/o ErbB4 induce la heterodimerización de dicho ErbB3. o dicho ErbB4 con ErbB2, y opcionalmente en donde dicha inducción de heterodimerización de ErbB3 o ErbB4 con ErbB2 estimula la actividad quinasa intrínseca, lo que lleva a la fosforilación de tirosina.  
40

En algunas realizaciones, el ligando de ErbB3/4 es un fragmento del polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos enumerada en cualquiera de las SEQ ID NO: 1-26 en donde el fragmento comprende por lo menos 30, por lo menos 35, por lo menos 40, por lo menos 45, por lo menos 50, por lo menos 55, por lo menos 60, por lo menos 65, por lo menos 70, por lo menos 75, por lo menos 80, por lo menos 85, por lo menos 90, por lo menos 95 o  
45 por lo menos 100 aminoácidos de la secuencia enumerada en cualquiera de las SEQ ID NO: 1-26.

En algunas realizaciones, el ligando de ErbB3/4 es una variante del polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos enumerada en cualquiera de las SEQ ID NO: 1-26, en donde la variante tiene una secuencia de aminoácidos que es por lo menos un 50%, por lo menos un 60%, por lo menos un 70%, por lo menos un 80%, por lo menos un 85%, por lo menos un 90%, por lo menos un 95%, por lo menos un 96%, por lo menos un 97%, por lo menos un 98%, por lo menos un 99% o 100% idéntica al polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos enumerada en cualquiera de las SEQ ID NO: 1-26.  
50

55 Las referencias a un porcentaje de identidad de secuencia entre dos secuencias de aminoácidos significan que, cuando se alinean, ese porcentaje de aminoácidos es el mismo al comparar las dos secuencias. Este alineamiento y el porcentaje de homología o identidad de secuencia pueden determinarse usando programas de software conocidos en la técnica, por ejemplo los descritos en la sección 7.7.18 de *Current Protocols in Molecular Biology* (F.M. Ausubel et al., Eds., 1987) Suplemento 30. Una alineación preferida se determina mediante el algoritmo de búsqueda de homología de Smith-Waterman usando una búsqueda de huecos afines con una penalización de apertura de hueco de 12 y una penalización de extensión de hueco de 2, matriz BLOSUM de 62. El algoritmo de búsqueda de homología de Smith-Waterman se describe en Smith & Waterman (1981) *Adv. Appl. Math.* 2: 482-489.  
60

65 En algunas realizaciones, el ligando de ErbB3/4 es una variante de un fragmento del polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos enumerada en cualquiera de las SEQ ID NO: 1-26, en donde el fragmento comprende

5 por lo menos 30, por lo menos 35, por lo menos 40, por lo menos 45, por lo menos 50, por lo menos 55, por lo menos 60, por lo menos 65, por lo menos 70, por lo menos 75, por lo menos 80, por lo menos 85, por lo menos 90, por lo menos 95 o por lo menos 100 aminoácidos de la secuencia enumerada en cualquiera de las SEQ ID NO: 1-26, y en donde la variante tiene una secuencia de aminoácidos que es por lo menos un 50%, por lo menos un 60%, por lo menos un 70%, por lo menos un 80%, por lo menos un 85%, por lo menos un 90%, por lo menos un 95%, por lo menos un 96%, por lo menos un 97%, por lo menos un 98%, por lo menos un 99% o 100% idéntica al fragmento.

10 En algunas realizaciones, el ligando de ErbB3/4 es un fragmento de una variante biológicamente activa del polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos enumerada en cualquiera de las SEQ ID NO: 1-26, en donde la variante tiene una secuencia de aminoácidos que es por lo menos un 50%, por lo menos un 60%, por lo menos un 70%, por lo menos un 80%, por lo menos un 85%, por lo menos un 90%, por lo menos un 95%, por lo menos un 96%, por lo menos un 97%, por lo menos un 98%, por lo menos un 99% o 100% idéntica al polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos enumerada en cualquiera de las SEQ ID NO: 1-26, y en donde el fragmento comprende por lo menos 30, por lo menos 35, por lo menos 40, por lo menos 45, por lo menos 50, por lo menos 55, por lo menos 60, por lo menos 65, por lo menos 70, por lo menos 75, por lo menos 80, por lo menos 85, por lo menos 90, por lo menos 95 o por lo menos 100 aminoácidos de la variante.

20 En algunas realizaciones, el ligando de ErbB3/4 es un ligando de origen no natural, por ejemplo, un ligando sintético o un anticuerpo anti-ErbB3/4. Los métodos para generar anticuerpos contra un objetivo de interés son bien conocidos en la técnica. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-ErbB3/4 es un anticuerpo anti-ErbB3/4 agonista. Preferiblemente, el anticuerpo es biológicamente activo. Puede usarse cualquier anticuerpo adecuado, por ejemplo, como se describe en la presente.

25 Los ligandos de ErbB3/4 pueden identificarse usando métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, unión de ligandos candidatos marcados con GST a receptores de ErbB expresados en células de insecto que provocan la fosforilación de tirosina (Carraway 3<sup>o</sup> et al., (1997) Nature 387(6632):512-6).

30 En algunas realizaciones, el ligando de ErbB3/4 comprende un dominio de EGF o un dominio similar a EGF. Los dominios de EGF y similares a EGF son dominios proteicos evolutivamente conservados que se reconocen en la técnica (ver, por ejemplo, Wouters et al. (2005) Protein Sci. 14(4): 1091-1103). Por consiguiente, en algunas realizaciones en las que el ligando de ErbB3/4 es un fragmento biológicamente activo de por lo menos un ligando de ErbB3/4 de origen natural, el fragmento comprende un dominio de EGF o un dominio similar a EGF.

35 En algunas realizaciones, el ligando de ErbB3/4 es neuregulina  $\beta$ -1 humana. En algunas realizaciones, la neuregulina  $\beta$ -1 humana tiene la secuencia de aminoácidos enumerada en la SEQ ID NO: 27. La neuregulina  $\beta$ -1 humana es un fragmento de un polipéptido de neuregulina, en donde el fragmento comprende un dominio similar a EGF. En una realización preferida, el ligando de ErbB3/4 comprende o consiste del dominio similar a EGF de la neuregulina  $\beta$ -1 humana.

40 En algunas realizaciones, el ligando de ErbB3/4 tiene una actividad biológica similar a la neuregulina  $\beta$ -1 humana recombinante.

45 En algunas realizaciones, el ligando de ErbB3/4 es un fragmento del polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos enumerada en la SEQ ID NO: 27, en donde el fragmento comprende por lo menos 30, por lo menos 35, por lo menos 40, por lo menos 45, por lo menos 50, por lo menos 55, por lo menos 60, por lo menos 62, o por lo menos 64 aminoácidos de la secuencia enumerada en la SEQ ID NO: 27.

50 En algunas realizaciones, el ligando de ErbB3/4 es una variante del polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos enumerada en la SEQ ID NO: 27, en donde la variante tiene una secuencia de aminoácidos que es por lo menos un 50%, por lo menos un 60%, por lo menos un 70%, por lo menos un 80%, por lo menos un 85%, por lo menos un 90%, por lo menos un 95%, por lo menos un 96%, por lo menos un 97%, por lo menos un 98%, por lo menos un 99% o 100% idéntica al polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos enumerada en la SEQ ID NO: 27.

55 En algunas realizaciones, el ligando de ErbB3/4 es una variante de un fragmento del polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos enumerada en la SEQ ID NO: 27, en donde el fragmento comprende por lo menos 30, por lo menos 35, por lo menos 40, por lo menos 45, por lo menos 50, por lo menos 55, por lo menos 60, por lo menos 62 o por lo menos 64 aminoácidos de la secuencia enumerada en la SEQ ID NO: 27, y en donde la variante tiene una secuencia de aminoácidos que es por lo menos un 50%, por lo menos un 60%, por lo menos un 70%, por lo menos un 80%, por lo menos un 85%, por lo menos un 90%, por lo menos un 95%, por lo menos un 96%, por lo menos un 97%, por lo menos un 98%, por lo menos un 99%, o 100% idéntica al fragmento.

65 En algunas realizaciones, el ligando de ErbB3/4 es un fragmento de una variante biológicamente activa del polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos enumerada en la SEQ ID NO: 27, donde la variante tiene una secuencia de aminoácidos que es por lo menos un 50%, por lo menos un 60%, por lo menos un 70%, por lo menos un 80%, por lo menos un 85%, por lo menos un 90%, por lo menos un 95%, por lo menos un 96%, por lo menos un 97%, por lo menos un 98%, por lo menos un 99% o 100% idéntica al fragmento.

un 80%, por lo menos un 85%, por lo menos un 90%, por lo menos un 95%, por lo menos un 96%, por lo menos un 97%, por lo menos un 98%, por lo menos un 99% o 100% idéntica al polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos enumerada en la SEQ ID NO: 27, y en donde el fragmento comprende por lo menos 30, por lo menos 35, por lo menos 40, por lo menos 45, por lo menos 50, por lo menos 55, por lo menos 60, por lo menos 62 o por lo menos 64 aminoácidos de la variante.

El ligando de ErbB3/4 puede estar presente en cualquier concentración adecuada. Por ejemplo, el ligando de ErbB3/4 puede estar presente en una concentración de entre 0,05 y 500 nM, entre 0,05 y 100 nM, entre 0,05 y 50 nM, entre 0,05 y 10 nM, entre 0,05 y 5 nM, entre 0,05 y 1 nM, entre 0,5 y 500 nM, entre 0,5 y 100 nM, entre 0,5 y 50 nM, entre 0,5 y 10 nM, entre 0,5 nM y 1 nM, entre 1 y 10 nM, entre 3 y 10 nM, entre 3 y 8 nM, entre 4 y 6 nM. Por ejemplo, el ligando de ErbB3/4 puede estar presente a una concentración de aproximadamente 5 nM. En algunas realizaciones, el ligando de ErbB3/4 se usa a una concentración de por lo menos 0,05 nM, por lo menos 0,5 nM, por lo menos 1 nM, por lo menos 3 nM, por lo menos 4 nM, por lo menos 5 nM, por lo menos 10 nM, por lo menos 50 nM, o por lo menos 100 nM.

Además del ligando de ErbB3/4, los medios de cultivo celular generalmente contienen una serie de componentes que son necesarios para apoyar el mantenimiento y/o expansión de las células cultivadas. Por lo tanto, un medio de cultivo celular de la invención contendrá normalmente muchos otros componentes además de un ligando de ErbB3/4, uno o más ligandos de FGFR2b y un agonista de Wnt. El experto en la técnica puede formular fácilmente combinaciones adecuadas de componentes, teniendo en cuenta la divulgación de la presente. Un medio de cultivo de acuerdo con la invención será generalmente una solución nutritiva que comprende componentes de cultivo celular estándar como aminoácidos, vitaminas, sales inorgánicas, una fuente de energía de carbono y un tampón como se describe con más detalle a continuación. Otros componentes estándar del cultivo celular que pueden incluirse en el cultivo incluyen hormonas, como progesterona, proteínas, como albúmina, catalasa, insulina y transferrina. Estos otros componentes estándar de cultivo celular componen el medio de cultivo "basal".

Un medio de cultivo de acuerdo con la invención puede generarse mediante la modificación de un medio de cultivo celular existente. El experto en la técnica comprenderá, a partir del conocimiento general común, los tipos de medios de cultivo que podrían ser adecuados para la modificación para su uso en cultivo de células madre epiteliales. Los medios de cultivo celular adecuados están disponibles comercialmente e incluyen, pero no están limitados a, medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM), medio mínimo esencial (MEM), Knockout-DMEM (KO-DMEM), medio mínimo esencial de Glasgow (G-MEM), medio de Eagle basal (BME), DMEM/F12 de Ham, DMEM/F12 de Ham avanzado, medio de Dulbecco modificado de Iscove y medio mínimo esencial (MEM), Ham's F-10, F12 de Ham, medio 199 y medio RPMI 164. También se proporcionan ejemplos de cultivos "basales" adecuados en la WO2012/168930, la WO2010/090513 y la WO 2012/014076.

En algunas realizaciones, el medio basal es AdDF+++. En algunas realizaciones, el AdDF+++ comprende DMEM/F12 avanzado (medio Eagle modificado de Dulbecco/F-12 de Ham), GlutaMax, HEPES, penicilina/estreptomicina, primocina.

En algunas realizaciones, el medio basal es D10F. En algunas realizaciones, el D10F comprende 31966-DMEM (medio Eagle modificado de Dulbecco), suero bovino fetal (FBS) y penicilina/estreptomicina.

Por tanto, en algunas realizaciones, se usa uno de estos medios de cultivo celular preexistentes como medio de cultivo basal al que se le añaden el uno o más ligandos de Erb3/4, uno o más ligandos de FGFR2b (por ejemplo, FGF7 y/o FGF10) y/o uno o más agonistas de Wnt (preferiblemente un ligando de Lgr5 agonista, preferiblemente Rspodina. En algunas realizaciones, el medio de cultivo de la invención comprende los siguientes componentes: (i) FGF7 y/o FGF10 y (ii) Rspodina. En algunas realizaciones, el medio de cultivo de la invención comprende los siguientes componentes: (i) FGF7 y/o FGF10, (ii) Rspodina y (iii) uno o más ligandos de receptor tirosina quinasa adicionales.

En algunas realizaciones, el medio de cultivo de la invención comprende además uno o más componentes seleccionados de: un inhibidor de BMP (por ejemplo, Noggin), B27, N-acetilcisteína, nicotinamida, un inhibidor de ROCK, un inhibidor de TGF-beta (por ejemplo, A83-01), un inhibidor de la quinasa MAP p38 (por ejemplo, SB 202190).

En algunas realizaciones, el medio de cultivo de la invención comprende un ligando de ErbB3/4, Rspodina, un inhibidor de BMP (por ejemplo, Noggin), B27, N-acetilcisteína, Nicotinamida, un inhibidor de ROCK, un inhibidor de TGF-beta (por ejemplo, A83-01), un inhibidor de quinasa p38 MAP (por ejemplo, SB 202190), FGF7 y FGF10, y opcionalmente uno o más componentes adicionales seleccionados de: uno o más ligandos del receptor de tirosina quinasa adicionales (por ejemplo, EGF, anfirregulina, TGF-alfa, PDGF), un agente estabilizador de p53 y un agonista de Wnt (por ejemplo, Wnt3a).

Como resultará 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 se usan a menudo

para apoyar el cultivo de células madre e inhibir su diferenciación. Una capa de células alimentadoras es generalmente una monocapa de células que se cocultiva con las células de interés y que proporciona una superficie adecuada para el crecimiento de las mismas. La capa de células alimentadoras proporciona un entorno en el que pueden crecer las células de interés. Las células alimentadoras a menudo se inactivan mitóticamente (por ejemplo, mediante irradiación o tratamiento con mitomicina C) para prevenir su proliferación. El uso de células alimentadoras no es deseable ya que complica el paso de las células (las células deben separarse de las células alimentadoras en cada pase, y se requieren nuevas células alimentadoras en cada pase). El uso de células alimentadoras también puede llevar 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. Los medios de cultivo de la invención son particularmente ventajosos porque pueden usarse para cultivar células sin contacto con células alimentadoras, es decir, los métodos de la invención no requieren una capa de células alimentadoras para apoyar las células cuyo crecimiento está siendo promocionando.

Por consiguiente, las composiciones pueden ser composiciones libres de células alimentadoras. Se considera convencionalmente que una composición está libre de células alimentadoras si las células de la composición se han cultivado durante por lo menos un pase en ausencia de una capa de células alimentadoras. Una composición libre de células alimentadoras 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 alimentadora.

#### Inhibidores de BMP

El medio de cultivo de la invención puede comprender además uno o más inhibidores de la proteína morfogenética ósea (BMP).

En algunas realizaciones, el medio de cultivo puede comprender cualquier inhibidor de BMP adecuado. Las BMP se unen como un ligando dimérico a un complejo receptor que consiste de dos receptores serina/treonina quinasa diferentes, receptores de tipo I y de tipo II. El receptor de tipo II fosforila al receptor de tipo I, lo que da como resultado la activación de este receptor quinasa. Posteriormente, el receptor tipo I fosforila sustratos de receptores específicos (SMAD), lo que da como resultado una vía de transducción de señales que lleva a la actividad transcripcional. Ventajosamente, los inhibidores de BMP promueven la expresión de Lgr5, por lo que la presencia de un inhibidor de BMP en un medio de cultivo de la invención probablemente dará como resultado más organoides proliferativos que si el inhibidor de BMP está ausente. En algunas realizaciones, las células cultivadas con un inhibidor de BMP han regulado por incremento la expresión de Lgr5 en comparación con las células cultivadas sin un inhibidor de BMP. Por lo tanto, la adición de un inhibidor de BMP típicamente da como resultado organoides más proliferativos.

Un inhibidor de 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 de BMP, por ejemplo, evitando o inhibiendo la unión de la molécula de BMP a un receptor de BMP. Alternativamente, dicho inhibidor es un agente que actúa como un antagonista o agonista inverso. Este tipo de inhibidor se une a un receptor de BMP y evita la unión de una 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 al anticuerpo.

Puede añadirse un inhibidor de BMP al medio en una cantidad eficaz para inhibir una actividad dependiente de BMP en una célula como máximo hasta el 90%, más preferido como máximo hasta el 80%, más preferido como máximo hasta el 70%, más preferido como máximo hasta el 50%, más preferido como máximo hasta el 30%, más preferido como máximo hasta el 10%, más preferido al 0%, con respecto a un nivel de actividad de BMP en ausencia de dicho inhibidor, evaluado en el mismo tipo de célula. Como es conocido por un experto en la técnica, 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.

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

Ejemplos de inhibidores de BMP para su uso en un método de la invención son Noggin, DAN y proteínas similares a DAN que incluyen Cerberus y Gremlin (R&D systems). Estas proteínas difusibles pueden unirse a un ligando de BMP con varios 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.

Un inhibidor de BMP preferido es Noggin. Por consiguiente, en algunas realizaciones, el medio de cultivo como se describe en la presente comprende Noggin. En el contexto de un medio de cultivo de la invención, también se hace referencia a Noggin en la presente como "No". Noggin se añade preferiblemente al medio de cultivo basal a una concentración de por lo menos 10 ng/ml, por ejemplo, por lo menos 20 ng/ml, más preferiblemente por lo menos 25 ng/ml. Una concentración aún más preferida es de aproximadamente 25 ng/ml.

Durante el cultivo de células madre, dicho inhibidor de BMP puede añadirse al medio de cultivo cuando se requiera, por ejemplo, diariamente o cada dos días. El inhibidor de BMP se añade preferiblemente al medio de cultivo cada dos días. El medio de cultivo puede renovarse cuando se requiera, por ejemplo, diariamente o cada dos días.

#### Agonistas de Wnt

Los medios de cultivo de la invención comprenden uno o más agonistas de Wnt. La vía de señalización de Wnt se define por una serie de eventos que se producen cuando se activa el complejo del receptor de Wnt de la superficie celular, que comprende un receptor Frizzled, LRP y LGR, que suele ser una molécula de señalización extracelular, como un miembro de la familia Wnt. Esto da como resultado la activación de proteínas de la familia Dishevelled que inhiben un complejo de proteínas que incluye axina, GSK-3 y la proteína APC para degradar la  $\beta$ -catenina intracelular. La  $\beta$ -catenina nuclear enriquecida resultante mejora la transcripción por los factores de transcripción de la familia TCF/LEF.

Un agonista de Wnt se define como un agente que activa la transcripción mediada por TCF/LEF en una célula. Por lo tanto, los agonistas de Wnt se seleccionan entre los verdaderos agonistas de Wnt que se unen y activan el complejo del receptor de Wnt, incluyendo todas y cada una de las proteínas de la familia Wnt, un inhibidor de la degradación intracelular de  $\beta$ -catenina, un inhibidor de GSK (como CHIR9901) y activadores de TCF/LEF..

En algunas realizaciones, un agonista de Wnt es una glicoproteína secretada que incluye Wnt-1/Int-1, Wnt-2/Irp (proteína relacionada con InM), 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, Wnt-12, Wnt-13, Wnt-14, Wnt-15, Wnt-16. Una descripción general de las proteínas Wnt humanas se proporciona en "THE WNT FAMILY OF SECRETED PROTEINS", Catálogo de R&D Systems, 2004. En algunas realizaciones, el agonista de Wnt es un inhibidor de RNF43 o ZNRF3. Se ha demostrado que RNF43 y ZNRF3 residen en la membrana celular y regulan negativamente los niveles del complejo receptor de Wnt en la membrana, probablemente por ubiquitinación de Frizzled. Por lo tanto, los inventores plantean la hipótesis de que la inhibición de RNF43 o ZNRF3 con anticuerpos antagonistas, ARNi o inhibidores de moléculas pequeñas estimularían indirectamente la vía Wnt. RNF43 y ZNRF3 tienen un dominio de anillo catalítico (con actividad de ubiquitinación), que puede dirigirse en el diseño de inhibidores de moléculas pequeñas. Varios anticuerpos anti-RNF43 y varios anticuerpos anti-ZNRF3 están disponibles comercialmente. En algunas realizaciones, tales anticuerpos son agonistas de Wnt adecuados en el contexto de la invención.

En una realización preferida, el agonista de Wnt en el medio de cultivo es cualquier agonista capaz de estimular la vía de Wnt a través del receptor de superficie celular Lgr5, es decir, en una realización preferida, el agonista de Wnt en el medio de cultivo es un agonista de Lgr5. Los agonistas de Lgr5 conocidos incluyen Rspodina, fragmentos y derivados de la misma, y anticuerpos anti-Lgr5 (por ejemplo, ver WO 2012/140274 y De Lau, W. et al. Nature, 4 de julio de 2011; 476(7360):293-7). Un agonista de Lgr5 preferido es Rspodina. Puede usarse cualquier Rspodina adecuada, por ejemplo, puede seleccionarse de una o más de Rspodina 1, Rspodina 2, Rspodina 3 y Rspodina 4 o derivados de las mismas. Por ejemplo, puede usarse cualquiera de Rspodina 1 (NU206, Nuvelo, San Carlos, CA), Rspodina 2 ((R&D Systems), Rspodina 3 y Rspodina 4). A la Rspodina 1, 2, 3 y 4 también se hace referencia en la presente como "Rspodina 1-4". Pueden usarse fragmentos de Rspodina como agonista de Wnt. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el agonista de Wnt es un fragmento de Rspodina que comprende o consiste del dominio furina. Ejemplos de fragmentos de Rspodina adecuados están representados por la secuencia de aminoácidos enumerada en la SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30 o SEQ ID NO: 31 o de secuencias con más del 70, 80, 90 o 99% de identidad con cualquiera de las SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30 o SEQ ID NO: 31. En algunas realizaciones, el agonista de Lgr5 es un anticuerpo anti-Lgr5, más preferiblemente un anticuerpo anti-Lgr5. Un ejemplo de un anticuerpo anti-Lgr5 agonista es 1D9 (disponible comercialmente de BD Biosciences, BDB562733, N°: 562733). Por lo tanto, en una realización, el agonista es el anticuerpo 1D9. La VL del anticuerpo 1D9 está representada por la SEQ ID NO: 32 y la VH está representada por la SEQ ID NO: 33. Por lo tanto, en una realización, el agonista es un anticuerpo que comprende o consiste de la SEQ ID NO: 32 y/o la SEQ ID NO: 33.

En algunas realizaciones, el agonista de Wnt en el medio de cultivo es cualquier agonista capaz de estimular la vía de Wnt a través del receptor de superficie celular Lgr4, es decir, en algunas realizaciones, el agonista de Wnt en el medio de cultivo es un agonista de Lgr4.

En algunas realizaciones, el agonista de Wnt en el medio de cultivo es cualquier agonista capaz de

estimular la vía de Wnt a través del receptor de superficie celular Lgr6, es decir, en algunas realizaciones, el agonista de Wnt en el medio de cultivo es un agonista de Lgr6.

5 El agonista de Wnt puede añadirse al medio en una cantidad eficaz para estimular la actividad de Wnt en una célula en por lo menos un 10%, más preferido por lo menos un 20%, más preferido por lo menos un 30%, más preferido por lo menos un 50%, más preferido por lo menos el 70%, más preferido por lo menos el 90%, más preferido por lo menos el 100%, con respecto al nivel de dicha actividad de Wnt en ausencia de dicha molécula, evaluado en el mismo tipo de célula. Como es conocido por un experto en la técnica, la actividad de Wnt puede determinarse midiendo la actividad transcripcional de Wnt, por ejemplo mediante constructos informadores de luciferasa pTOPFLASH y pFOPFLASH Tcf (Korinek et al., 1997. Science 275: 1784-1787).

15 Puede proporcionarse un agonista de Wnt soluble, como Wnt-3a, en forma de medio acondicionado con Wnt. Por ejemplo, puede usarse un medio acondicionado de aproximadamente el 10% a aproximadamente el 30%, por ejemplo, de aproximadamente 10 ng/ml a aproximadamente 10 µg/ml, preferiblemente de aproximadamente 1 µg/ml, Wnt.

20 La Rspodina 1-4 se puede proporcionar en forma de medio acondicionado con Rspo. Por ejemplo, pueden usarse medios acondicionados con Rspo de aproximadamente el 10% a aproximadamente el 30%, por ejemplo, de aproximadamente 10 ng/ml a aproximadamente 10 µg/ml, preferiblemente de aproximadamente 1 µg/ml.

25 En el medio de cultivo se usan uno o más, por ejemplo, 2, 3, 4 o más agonistas de Wnt. En una realización, el medio de cultivo comprende un agonista de Lgr5, por ejemplo Rspodina, y comprende adicionalmente un agonista de Wnt adicional. En este contexto, el agonista de Wnt adicional puede seleccionarse, por ejemplo, del grupo que consiste de Wnt-3a, un inhibidor de GSK (como CHIR99021), Wnt-5, Wnt-6a y Norrin. En una realización, el medio de cultivo comprende Rspodina y comprende adicionalmente un ligando de Wnt soluble, como Wnt3a. Se ha demostrado que la adición de un ligando de Wnt soluble es particularmente ventajosa para la expansión de células madre epiteliales humanas (como se describe en la WO2012/168930).

30 Puede usarse cualquier concentración adecuada de agonista de Wnt, por ejemplo, Rspodina, por ejemplo, por lo menos 200 ng/ml, más preferiblemente por lo menos 300 ng/ml, más preferiblemente por lo menos 500 ng/ml. Una concentración aún más preferida de Rspodina es por lo menos de 500 ng/ml o aproximadamente 1 µg/ml.

35 Durante el cultivo de células madre, dicho agonista de Wnt puede añadirse al medio de cultivo cuando sea necesario, por ejemplo, diariamente o cada dos días. El agonista de Wnt se añade preferiblemente al medio de cultivo cada dos días.

#### Anticuerpos

40 Los anticuerpos, como los anticuerpos anti-ErbB3/4, los anticuerpos anti-Lgr5 agonistas o los inhibidores de TGF-beta antagonistas (ver más abajo), usados en la invención pueden ser cualquier anticuerpo, fragmento, etc. Un anticuerpo convencional está compuesto de dos cadenas pesadas idénticas y dos cadenas ligeras idénticas que están unidas por enlaces disulfuro. Cada cadena pesada y ligera contiene una región constante y una región variable. Cada región variable contiene tres CDR que son principalmente responsables de unir un epítipo de un antígeno. Se denominan CDR1, CDR2 y CDR3, numeradas secuencialmente desde el extremo N-terminal, de las cuales la región CDR3 comprende la región más variable y normalmente proporciona una parte sustancial de los residuos de contacto a un objetivo. Las porciones más conservadas de las regiones variables se denominan "regiones marco".

50 El término anticuerpo se usa en la presente en el sentido más amplio y cubre específicamente, pero no se limita a, anticuerpos monoclonales (incluyendo anticuerpos monoclonales de longitud completa) de cualquier isotipo, como IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, anticuerpos policlonales incluyendo anticuerpos policlonales recombinantes., oligoclonales, anticuerpos multiespecíficos, anticuerpos quiméricos, nanocuerpos, diacuerpos, BiTE's, Tandabs, mimetocuerpos, anticuerpos biespecíficos, anticuerpos humanizados, anticuerpos humanos, anticuerpos desinmunizados y fragmentos de anticuerpos. Además, los andamiajes estarán cubiertos bajo este término, tales como Anticalinas, Ankarinas, etc. Un anticuerpo reactivo con los epítopos específicos de las proteínas Lgr analizadas anteriormente puede generarse mediante métodos recombinantes como la selección de bibliotecas de anticuerpos recombinantes en fagos o vectores similares, o inmunizando a un animal con los epítopos de Lgr de los ácidos nucleicos que los codifican.

60 En una realización, un anticuerpo de acuerdo con la invención comprende un anticuerpo de dominio único, un fragmento F(ab')<sub>2</sub>, Fab, Fab' o Fv de cadena sencilla (scFv). Puede estar presente un fragmento Fc, que por ejemplo activa el complemento y puede unirse a receptores Fc, pero no es necesario para un anticuerpo y variantes o derivados del mismo. Un fragmento scFv es un fragmento de unión a epítipo que contiene por lo menos un fragmento de una región variable de cadena pesada (VH) de anticuerpo unido a por lo menos un fragmento de una región variable de cadena ligera (VL) de anticuerpo. El conector puede ser un péptido corto y flexible seleccionado

65

para asegurar que se produzca el plegamiento tridimensional apropiado de las regiones VL y VH una vez que se enlazan para mantener la especificidad de unión a la molécula objetivo de todo el anticuerpo a partir del cual se deriva el fragmento de anticuerpo. El extremo terminal carboxilo de la secuencia de VL o VH puede enlazarse covalentemente mediante un conector al extremo terminal de aminoácido de una secuencia de VL o VH complementaria.

El anticuerpo puede ser un diacuerpo, mimeticuerpo, nanocuerpo y/o un anticuerpo biespecífico. Un nanocuerpo es un anticuerpo de dominio único que se encuentra de manera natural en los camélidos. Al contrario que los anticuerpos estándar, los nanocuerpos son proteínas relativamente simples que comprenden solo una región variable similar a una cadena pesada. Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos monoclonales diseñados artificialmente que consisten de dos sitios de unión distintos y son capaces de unirse a dos epítopos diferentes. Los ejemplos de anticuerpos biespecíficos se analizan con más detalle a continuación en la sección sobre agonistas de direccionamiento doble y de direccionamiento múltiple.

El anticuerpo puede ser un anticuerpo quimérico que comprende una porción de unión, por ejemplo, la región variable o parte de la misma de las cadenas pesada y ligera, de un anticuerpo no humano, mientras que la porción restante, por ejemplo, la región constante de las cadenas pesada y ligera, es de un anticuerpo humano. Un anticuerpo quimérico puede producirse mediante procesos recombinantes bien conocidos en la técnica, y tiene una región variable animal y una región constante humana.

El anticuerpo puede ser un anticuerpo humano o un anticuerpo humanizado. El término "anticuerpo humano" significa un anticuerpo en el que las secuencias de dominio variable y constante se derivan de secuencias humanas. En un anticuerpo humanizado, solo las regiones determinantes de la complementariedad (CDR), que son responsables de la unión y especificidad del antígeno se derivan de animal y tienen una secuencia de aminoácidos correspondiente al anticuerpo animal, y sustancialmente todas las porciones restantes de la molécula (excepto, en algunos casos, pequeñas porciones de las regiones marco dentro de la región variable) se derivan de humano y corresponden en la secuencia de aminoácidos a un anticuerpo humano. En la técnica se conocen métodos para humanizar anticuerpos no humanos. Como es conocido por el experto en la técnica, los anticuerpos como los anticuerpos de rata pueden humanizarse injertando sus CDR en los marcos de ligera variable (VL) y pesada variable (VH) de moléculas de Ig humana, mientras se retienen los residuos de marco de rata que se consideran esenciales para la especificidad y afinidad. En general, los anticuerpos injertados con CDR consisten de más del 80% de secuencias de aminoácidos humanos.

En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo desinmunizado en el que se han eliminado los epítopos de las células T y B. Tienen inmunogenicidad reducida cuando se aplican in vivo.

#### Inhibidor de TGF-Beta

Los medios de cultivo de la invención pueden comprender además un inhibidor de TGF-beta. La presencia de un inhibidor de TGF-beta en el medio es ventajosa ya que aumenta la eficiencia de formación de organoides humanos. La señalización de TGF-beta está implicada en muchas funciones celulares, incluyendo el crecimiento celular, el destino celular y la apoptosis. La señalización comienza típicamente 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. Luego, el receptor de tipo I fosforila los SMAD, que actúan como factores de transcripción en el núcleo y regulan la expresión del gen objetivo.

Los ligandos de la superfamilia TGF-beta comprenden proteínas morfogénicas óseas (BMP), factores de crecimiento y diferenciación (GDF), hormona anti-mülleriana (AMH), activina, nodal y TGF-beta. En general, Smad2 y Smad3 son fosforilados por los receptores de ALK4, 5 y 7 en la vía de TGF-beta/activina. Por el contrario, Smad1, Smad5 y Smad8 se fosforilan como parte de la vía de la proteína morfogenética ósea (BMP). Aunque hay algún cruce entre las vías, en el contexto de esta invención, un "inhibidor de TGF-beta" o un "inhibidor de la señalización de TGF-beta" es preferiblemente un inhibidor de la vía de TGF-beta que actúa a través de Smad2 y Smad3. Por lo tanto, en algunas realizaciones, el inhibidor de TGF-beta no es un inhibidor de BMP, por ejemplo, el inhibidor de TGF-beta no es Noggin. En algunas realizaciones, se añade un inhibidor de BMP al medio de cultivo además del inhibidor de TGF-beta (como antes).

Por tanto, el inhibidor de TGF-beta puede ser cualquier agente que reduzca la actividad de la vía de señalización de TGF-beta, preferiblemente la vía de señalización que actúa a través de Smad2 y/o Smad3, más preferiblemente la vía de señalización que actúa a través de ALK4, ALK5 o ALK7. Hay muchas formas de alterar la vía de señalización de TGF-beta que se conocen en la técnica y que pueden usarse junto con esta invención. Por ejemplo, la señalización de TGF-beta puede alterarse por: inhibición de la expresión de TGF-beta mediante una estrategia de ARN interferente pequeño; inhibición de furina (una proteasa activadora de TGF-beta); inhibición de la vía por inhibidores fisiológicos; neutralización de TGF-beta con un anticuerpo monoclonal; inhibición con inhibidores de moléculas pequeñas del receptor quinasa 1 del TGF-beta (también conocido 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, por ejemplo, mediante la sobreexpresión de su inhibidor fisiológico, Smad 7, o usando tioredoxina como un anclaje de Smad que impide la activación de Smad (Fuchs, O. Inhibition of TGF-Signaling for the Treatment of Tumor Metastasis and Fibrotic Diseases. Current Signal Transduction Therapy, volumen 6, número 1, enero de 2011, págs. 29-43 (15)).

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

Un inhibidor de TGF-beta de acuerdo con la presente invención puede ser una proteína, péptido, moléculas pequeñas, ARN interferente pequeño, oligonucleótido antisentido, aptámero o anticuerpo. El inhibidor puede ser de origen natural o sintético. En una realización, el inhibidor de TGF-beta es un inhibidor de ALK4, ALK5 y/o ALK7. Por ejemplo, el inhibidor de TGF-beta puede unirse e inhibir directamente ALK4, ALK5 y/o ALK7. Ejemplos de inhibidores de TGF-beta de moléculas pequeñas preferidos que pueden usarse en el contexto de esta invención incluyen los inhibidores de moléculas pequeñas enumerados en la Tabla 1:

**Tabla 1: Inhibidores de TGF-beta de moléculas pequeñas dirigidos a quinasas receptoras**

Inhibidor	Objetivos	IC50 (nM)	Mol Peso	Nombre	Fórmula
<b>A83-01</b>	ALK5 (TGF-βR1)	12	421,52	3-(6-metil-2-piridinil)-N-fenil-4-(4-quinolinil)-1H-pirazol-1-carbotioamida	C25H19N5S
	ALK4	45			
	ALK7	7.5			
<b>SB-431542</b>	ALK5	94	384,39	4-[4-(1,3-benzodioxol-5-il)-5-(2-piridinil)-1H-imidazol-2-il]benzamida	C22H16N4O3
	ALK4				
	ALK7				
<b>SB-505124</b>	ALK5	47	335,4	hidrato de clorhidrato de 2-(5-benzo[1,3]dioxol-5-il-2-terc-butil-3Himidazol-4-il)-6-metilpiridina	C20H21N3O2
	ALK4	129			
<b>SB-525334</b>	ALK5	14.3	343,42	6-[2-(1,1-dimetiletil)-5-(6-metil-2-piridinil)-1H-imidazol-4-il]quinoxalina	C21H21N5
<b>SD-208</b>	ALK5	49	352,75	2-(5-cloro-2-fluorofenil)-4-[(4-piridil)amino]pteridina	C17H10ClFN6
<b>LY-36494</b>	TGR-βRI	59	272,31	4-[3-(2-piridinilo)-1H-pirazol-4-il]-quinolina	C17H12N4
	TGF-βRII	400			
	MLK-7K	1400			
<b>SJN-2511</b>	ALK5	23	287,32	2-(3-(6-metilpiridina-2-il)-1H-pirazol-4-il)-1,5-naftiridina	C17H13N5

En algunas realizaciones, el inhibidor de TGF-beta es un inhibidor de moléculas pequeñas seleccionado opcionalmente del grupo que consiste de: A83-01, SB-431542, SB-505124, SB-525334, LY 364947, SD-208 y SJN 2511.

En algunas realizaciones, no está presente más de un inhibidor de TGF beta en el medio. En otras realizaciones, está presente más de un inhibidor de TGF beta en el medio, por ejemplo, 2, 3, 4 o más. En algunas realizaciones, un medio de la invención comprende además uno o más de cualquiera de los inhibidores enumerados en la tabla 1. Un medio puede comprender cualquier combinación de un inhibidor con otro inhibidor enumerado. Por ejemplo, un medio puede comprender SB-525334 o SD-208 o A83-01; o SD-208 y A83-01. El experto en la técnica apreciará que existen varios otros inhibidores de moléculas pequeñas que están diseñados principalmente para dirigirse a otras quinasas, pero a altas concentraciones también pueden inhibir las quinasas receptoras de TGF-beta. Por ejemplo, SB-203580 es un inhibidor de la quinasa MAP p38 que, a altas concentraciones (por ejemplo,

aproximadamente 10  $\mu\text{M}$  o más) se piensa que inhibe ALK5. En el contexto de esta invención también puede usarse cualquiera de tales inhibidores que inhiba la vía de señalización de TGF-beta.

5 En algunas realizaciones, el inhibidor de TGF beta está presente a por lo menos 5 nM, por ejemplo, por lo menos 50 nM, por lo menos 100 nM, por lo menos 300 nM, por lo menos 450 nM, por lo menos 475 nM, por ejemplo 5 nM-500 mM, 10 nM-100 mM, 50 nM-700  $\mu\text{M}$ , 50 nM-10  $\mu\text{M}$ , 100 nM-1000 nM, 350-650 nM o más preferiblemente aproximadamente 500 nM.

10 Puede añadirse A83-01 al medio a una concentración de entre 10 nM y 10  $\mu\text{M}$ , o entre 1  $\mu\text{M}$  y 8  $\mu\text{M}$ , o entre 4  $\mu\text{M}$  y 6  $\mu\text{M}$ . Por ejemplo, puede añadirse A83-01 al medio a aproximadamente 5  $\mu\text{M}$ . El experto en la técnica sabrá cómo determinar la concentración de otros inhibidores de TGF beta para su uso en la invención.

#### Ligandos de receptor tirosina quinasa

15 Los ligandos de ErbB3/4 son ligandos del receptor tirosina quinasa. El medio de cultivo de la invención puede comprender además uno o más ligandos del receptor tirosina quinasa adicionales que no son ellos mismos ligandos de ErbB3/4. Un ejemplo de un ligando del receptor de tirosina quinasa para su uso en la invención es EGF, que es el ligando para el receptor de tirosina quinasa de EGFR. Muchos ligandos del receptor tirosina quinasa también son factores de crecimiento mitógenos.

20 Los medios de cultivo de la invención pueden comprender además uno o más factores de crecimiento mitógenos. El uno o más factores de crecimiento mitógenos pueden seleccionarse de una familia de factores de crecimiento que comprenden factor de crecimiento epidérmico (EGF, Peprotech), factor de crecimiento transformante alfa (TGF-alfa, Peprotech), factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF, Peprotech), factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF, R&D Systems), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF, Peprotech), anfirregulina (R&D Systems). Un PDGF preferido es el PDGF-CC. En el contexto de un medio de cultivo de la invención, al EGF también se hace referencia en la presente como "E" y al FGF también se hace referencia en la presente como "F".

30 En algunas realizaciones, el ligando del receptor tirosina quinasa para su uso en la invención es uno o más factores de crecimiento mitógenos seleccionados de EGF humano, PDGF humano (por ejemplo, PDGF-CC humano), anfirregulina humana y TGF-alfa humano.

#### EGF

35 El EGF es un potente factor mitógeno para una variedad de células ectodérmicas y mesodérmicas cultivadas y tiene un profundo efecto sobre la diferenciación de células específicas in vivo e in vitro y de algunos fibroblastos en cultivo celular. El precursor de EGF existe como una molécula unida a la membrana que se escinde proteolíticamente para generar la hormona peptídica de 53 aminoácidos que estimula las células.

40 Los inventores han descubierto que el EGF no es esencial en el medio de cultivo de la invención para el crecimiento de organoides mamarios. Por lo tanto, en algunas realizaciones, el medio de cultivo de la invención no contiene EGF. Sin embargo, los inventores descubrieron que la adición de EGF puede ser beneficiosa para el crecimiento de organoides mamarios. Por lo tanto, en algunas realizaciones, el medio de cultivo de la invención comprende además EGF.

50 En realizaciones en las que el medio de cultivo de la invención comprende EGF, el EGF se añade preferiblemente al medio de cultivo basal a una concentración de entre 1 y 500 ng/ml o de por lo menos 1 y no mayor de 500 ng/ml. Una concentración preferida es por lo menos 1, 5, 10, 20, 25, 30, 40, 45 o 50 ng/ml y no mayor de 500, 450, 400, 350, 300, 250, 200, 150 o 100 ng/ml. Una concentración más preferida es de por lo menos 1 y no mayor de 100 ng/ml. Se podrían usar las mismas concentraciones para un factor de crecimiento mitógeno diferente, como un PDGF o un FGF. Si se usa más de un FGF, por ejemplo FGF7 y FGF10, la concentración de un FGF es como se ha definido anteriormente y se refiere a la concentración total de FGF usado.

#### Ligandos de FGFR2b

60 FGF7 y FGF10 son proteínas que pertenecen a la familia de proteínas del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF). Los miembros de la familia FGF poseen amplias actividades mitógenas y de supervivencia celular, y están implicadas en una variedad de procesos biológicos, que incluyen el desarrollo embrionario, el crecimiento celular, la morfogénesis, la reparación de tejidos, el crecimiento y la invasión tumoral. 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 las FGF se unen a más de un receptor (Ornitz J Biol Chem. 27 de febrero de 1998; 273 (9):5349-57). Sin embargo, FGF10 y FGF7 son únicos entre los FGF ya que interactúan solo con una isoforma específica de FGFR2,

designada FGFR2b que es expresada exclusivamente por células epiteliales (Igarashi, J Biol Chem. 1998 273(21):13230-5).

5 El medio de cultivo de la invención comprende un ligando de FGFR2b (por ejemplo, FGF1, FGF3, FGF7, FGF10 o FGF22). En algunas realizaciones, el ligando de FGFR2b es un ligando de alta afinidad de FGFR2b. En algunas realizaciones, el ligando de FGFR2b se une a FGFR2b pero no se une a ninguna otra isoforma de FGFR. En algunas realizaciones, el ligando de FGFR2b es un miembro de la subfamilia FGF7 (por ejemplo, FGF7, FGF10 o FGF22). En una realización preferida, el ligando de FGFR2b es FGF10 y/o FGF7. En algunas realizaciones, no se usa más de un ligando de FGFR2b. En otras realizaciones, se usan dos o más ligandos de FGFR2b, por ejemplo, 2, 10 3 o más. En algunas realizaciones, el medio de cultivo comprende FGF7 y FGF10. En algunas realizaciones, se usan fragmentos biológicamente activos o variantes de ligandos de FGFR2b de origen natural, por ejemplo, los fragmentos o variantes biológicamente activos de FGF7 y/o FGF10 como ligandos de FGFR2b. En algunas realizaciones, se usan ligandos sintéticos biológicamente activos como ligandos de FGFR2b en el medio de cultivo de la invención. "Biológicamente activo", como se usa en este contexto, significa que el ligando de FGFR2b, por 15 ejemplo, el fragmento o variante de un ligando de FGFR2b de origen natural, o un ligando de FGFR2b sintético, es capaz de unirse a FGFR2b y provocar una señalización en sentido descendente similar en comparación con FGF7 y/o FGF10, por ejemplo provocando la fosforilación de tirosina de FRS2 $\alpha$  (sustrato 2 $\alpha$  del receptor de FGF) o FRS2 $\beta$  (sustrato 2 $\beta$  del receptor de FGF). La fosforilación de tirosina de FRS2 $\alpha$  y/o FRS2 $\beta$  es el evento citosólico más temprano en las vías de señalización activadas por FGF7 y/o FGF10. En algunas realizaciones, el ligando de 20 FGFR2b se sustituye con un compuesto que activa la vía de FGFR2 o FGFR4 (un "activador de la vía de FGF").

En algunas realizaciones, el uno o más ligandos de FGFR2b usados en el medio de cultivo de la invención se seleccionan de los siguientes: FGF7 humano, FGF10 humano, FGF22 humano, FGF1 humano o FGF22 humano.

25 En una realización adicional, se añade una combinación de factores de crecimiento mitógenos como, por ejemplo, EGF y FGF7, o EGF y FGF10, al medio de cultivo basal. En una realización preferida adicional, se añade una combinación de factores de crecimiento mitógenos como, por ejemplo, (i) FGF7 y FGF10, (ii) EGF, FGF7 y FGF10, o (iii) PDGF, FGF7 y FGF10, o (iv) EGF, PDGF, anfirregulina, FGF7 y FGF10 al medio de cultivo.

30 En algunas realizaciones, se añaden TGF-alfa o anfirregulina al medio de cultivo basal. Estos factores de crecimiento mitógenos pueden reemplazar al EGF. En algunas realizaciones, se añade factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) al medio de cultivo.

35 Durante el cultivo de células madre, se añade preferiblemente al medio de cultivo una combinación de ligandos de receptor tirosina quinasa (por ejemplo, EGF, FGF10 y FGF7) cuando se requiera, por ejemplo, diariamente o cada dos días. Pueden añadirse individualmente o en combinación. Es preferible que se añadan cada dos días.

#### 40 Inhibidores de ROCK

Pueden incluirse inhibidores de ROCK, como Y-27632 (10  $\mu$ M; Sigma), en cualquiera de los medios descritos, en particular en los primeros días de cultivo antes de realizar experimentos de clasificación celular, porque se sabe que evita la anoikis (una forma de muerte celular programada que es inducida por células dependientes de anclaje que se desprenden de la matriz extracelular circundante). Por lo tanto, cualquiera de los medios definidos en 45 la presente puede comprender adicionalmente un inhibidor de ROCK durante los primeros días. En algunas realizaciones, el medio de cultivo de la invención comprende adicionalmente un inhibidor de ROCK, como Y-27632, por ejemplo, durante los primeros días de cultivo antes de realizar experimentos de clasificación celular.

50 En una realización adicional, un medio de cultivo de la invención comprende además un inhibidor de Rock (Rho-quinasa). Se descubrió que la adición de un inhibidor de Rock previene la anoikis, especialmente cuando se cultivan células madre individuales. Dicho inhibidor de Rock se selecciona preferiblemente de monohidrato de diclorhidrato de R-(+)-trans-4-(1-aminoetil)-N-(4-piridil ciclohexanocarboxamida (Y-27632, Sigma-Aldrich), 5-(1,4-diazepan-1-ilsulfonil)isoquinolina (fasudil o HA1077, Cayman Chemical) y diclorhidrato de (S)-(+)-2-metil-1-[(4-metil-5-isoquinolinil)sulfonil]-hexahidro-1H-1,4-diazepina (H-1152, Tocris Bioscience). Dicho inhibidor de la Rho-quinasa, por ejemplo Y-27632, se añade preferiblemente al medio de cultivo cada dos días durante los primeros siete días de cultivo de dichas células madre. Un inhibidor de Rock se incluye preferiblemente en el medio en los primeros días, por ejemplo, durante los primeros 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 días de cultivo después de la siembra unicelular o después de una escisión. Puede usarse cualquier concentración adecuada del inhibidor de Rock, por ejemplo, 1-200  $\mu$ M, 1-100  $\mu$ M, 5-50  $\mu$ M o aproximadamente 10  $\mu$ M. Una concentración preferida para Y27632 es 10  $\mu$ M. Por lo tanto, en 60 algunas realizaciones, se añade un inhibidor de Rock al medio de cultivo durante los primeros 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 días, opcionalmente cada dos días. En algunas realizaciones, el inhibidor de Rock no se añade al medio de cultivo después de los primeros 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 días.

65 La adición de un inhibidor de Rock es particularmente importante cuando se cultivan células madre individuales (como se ha mencionado anteriormente), es decir, cuando el material de partida para un organoide es

una célula madre individual. Por lo tanto, en algunas realizaciones, el método comprende cultivar células madre, opcionalmente células madre individuales, en edonde se añade un inhibidor de Rock al medio de cultivo durante los primeros 1, 2, 3, 4, 5., 6 o 7 días, opcionalmente cada dos días, y opcionalmente sin añadir el inhibidor de Rock al medio de cultivo después de los primeros 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 días.

El inhibidor de Rock es menos importante, y algunas veces no es necesario, cuando se cultivan múltiples células, por ejemplo, cuando el material de partida para un organoide es un fragmento de tejido. Por tanto, en algunas realizaciones, el método comprende cultivar células madre, opcionalmente un fragmento de tejido, en el que el inhibidor de Rock no se añade al medio de cultivo ni en absoluto ni después de los primeros 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 días.

Después de dividir las células en múltiples cultivos, puede añadirse un inhibidor de Rock al medio de cultivo de la misma manera, es decir, durante los primeros 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 días, opcionalmente cada dos días, después de la división, particularmente cuando la división implica tomar células madre individuales de un primer cultivo y colocarlas en un segundo cultivo. Si la división implica tomar múltiples células madre del primer cultivo y colocarlas en un segundo cultivo, la adición de un inhibidor de Rock es menos importante y, algunas veces, no es necesaria. Por lo tanto, en algunas realizaciones, en las que el método implica una división, opcionalmente cuando está implica una sola célula en la división, se añade un inhibidor de Rock al nuevo medio de cultivo durante los primeros 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 días, opcionalmente cada dos días, después de la división. En algunas realizaciones, en las que el método implica una división, opcionalmente cuando están implicadas múltiples células en la división, no se añade en absoluto al medio de cultivo ni después de los primeros 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 días.

#### Agonistas de Notch

En otra realización más, el medio de cultivo de la invención comprende además un agonista de Notch. Se ha demostrado que la señalización de Notch desempeña un papel importante en la determinación del destino celular, así como en la supervivencia y proliferación celular. Las proteínas receptoras de Notch pueden interactuar con una serie de ligandos secretados o unidos a la superficie, incluyendo pero no limitados a, Delta 1, Jagged 1 y 2, y similar a Delta 1, similar a Delta 3, similar a Delta 4. Tras la unión del ligando, los receptores de Notch se activan por eventos de escisión en serie que implican a miembros de la familia de proteasas ADAM, así como por una escisión intramembranosa regulada por la gamma secretasa presenilina. El resultado es una translocación del dominio intracelular de Notch al núcleo donde activa transcripcionalmente genes en sentido descendente. Un agonista de Notch preferido se selecciona de Jagged 1 y Delta 1, o un fragmento activo o derivado de los mismos. Un agonista de Notch más preferido es el péptido DSL (Dontu et al., 2004. Breast Cancer Res 6. R605-R615) con la secuencia CDDYYYGFGCNKFCRPR. Dicho péptido DSL se usa preferiblemente a una concentración entre 10  $\mu$ M y 100 nM o por lo menos 10  $\mu$ M y no mayor de 100 nM. La adición de un agonista de Notch, especialmente durante la primera semana de cultivo, aumenta la eficiencia del cultivo en un factor de 2-3. Dicho agonista de Notch se añade preferiblemente al medio de cultivo cada dos días durante los primeros siete días de cultivo de dichas células madre. Por lo tanto, en algunas realizaciones, se añade un agonista de Notch al medio de cultivo durante los primeros 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 días, opcionalmente cada dos días. En algunas realizaciones, el agonista de Notch no se añade en absoluto al medio de cultivo después de los primeros 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 días.

Un agonista de Notch se define como una molécula que estimula la actividad de Notch en una célula en por lo menos un 10%, más preferido por lo menos un 20%, más preferido por lo menos un 30%, más preferido por lo menos un 50%, más preferido por lo menos un 70%, más preferido por lo menos un 90%, más preferido por lo menos el 100%, con respecto al nivel de actividad de Notch en ausencia de dicha molécula. Como es conocido por un experto en la técnica, una actividad de Notch puede determinarse midiendo la actividad transcripcional de Notch, por ejemplo mediante un constructo informador 4xwtCBFI-luciferasa como se describe (Hsieh et al, 1996 Mol Cell. Biol. 16, 952-959).

#### Componentes adicionales

El medio de cultivo comprende opcionalmente nicotinamida y preferiblemente se suplementa con uno o más (por ejemplo, 1, 2, 3 o todos) de los compuestos seleccionados del grupo que consiste de B27, N-acetilcisteína y N2. Por tanto, en algunas realizaciones, el medio de cultivo comprende además uno o más componentes seleccionados del grupo que consiste de: nicotinamida, B27, N2 y N-acetilcisteína. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el medio de cultivo comprende además B27, N-acetilcisteína y nicotinamida.

Se cree que B27 (Invitrogen), N-acetilcisteína (Sigma) y N2 (Invitrogen) y nicotinamida (Sigma) controlan la proliferación de las células y ayudan a la estabilidad del ADN. En el contexto de la invención, también se hace referencia en la presente a la nicotinamida como "Nic".

En algunas realizaciones, la nicotinamida está presente a 7-15 mM, por ejemplo aproximadamente 10 mM.

En algunas realizaciones, el suplemento B27 es 'suplemento B27 menos vitamina A' (disponible de

Invitrogen, Carlsbad, CA.; [www.invitrogen.com](http://www.invitrogen.com); actualmente el N° de catálogo 12587010; y de PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria; [www.paa.com](http://www.paa.com); N° de catálogo F01-002; Brewer et al., J Neurosci Res., 35(5):567-76, 1993) puede usarse para formular un medio de cultivo que comprende biotina, colesterol, ácido linoleico, ácido linolénico, progesterona, putrescina, acetato de retinilo, selenito sódico, triyodotironina (T3), DL-alfa tocoferol (vitamina E), albúmina, insulina y transferrina.

El suplemento B27 suministrado por PAA Laboratories GmbH viene como un concentrado líquido 50x, que contiene entre otros ingredientes biotina, colesterol, ácido linoleico, ácido linolénico, progesterona, putrescina, retinol, acetato de retinilo, selenito sódico, triyodotironina (T3), DL-alfa tocoferol (vitamina E), albúmina, insulina y transferrina. De estos ingredientes, por lo menos el ácido linolénico, el retinol, el acetato de retinilo y la triyodotironina (T3) son agonistas del receptor de hormonas nucleares. El Suplemento B27 puede añadirse a un medio de cultivo como un concentrado o diluirse antes de añadirlo a un medio de cultivo. Puede usarse a una concentración final de 1x o a otras concentraciones finales. El uso del suplemento B27 es una manera conveniente de incorporar biotina, colesterol, ácido linoleico, ácido linolénico, progesterona, putrescina, retinol, acetato de retinilo, selenito sódico, triyodotironina (T3), DL-alfa tocoferol (vitamina E), albúmina, insulina y transferrina en un medio de cultivo de la invención. También se prevé que algunos o todos estos componentes puedan añadirse por separado al medio de cultivo en lugar de usar el suplemento B27. Por tanto, el medio de cultivo puede comprender algunos o todos estos componentes.

En algunas realizaciones, el ácido retinoico está ausente del suplemento B27 usado en el medio de cultivo y/o está ausente del medio de cultivo.

El suplemento N2 está disponible en Invitrogen, Carlsbad, CA.; [www.invitrogen.com](http://www.invitrogen.com); N° de catálogo 17502-048; y de PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria; [www.paa.com](http://www.paa.com); N° de catálogo F005-004; Bottenstein & Sato, PNAS, 76(1):514-517, 1979. El suplemento N2 suministrado por PAA Laboratories GmbH viene 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 selenito sódico. El suplemento N2 puede añadirse a un medio de cultivo como un concentrado o diluirse antes de la adición a un medio de cultivo. Puede usarse a una concentración final de 1x o a otras concentraciones finales. El uso del suplemento N2 es una forma conveniente de incorporar transferrina, insulina, progesterona, putrescina y selenito sódico en un medio de cultivo de la invención. Por supuesto, también se prevé que algunos o todos estos componentes puedan añadirse por separado al medio de cultivo en lugar de usar el suplemento N2. Por tanto, el medio de cultivo puede comprender algunos o todos estos componentes.

En algunas realizaciones en las que el medio comprende B27, tampoco comprende N2. Por lo tanto, las realizaciones de la presente invención pueden adaptarse para excluir N2 cuando hay B27, si se desea.

En algunas realizaciones, N2 no está presente en el medio de cultivo.

En algunas realizaciones en las que el medio comprende N2, tampoco comprende B27. Por tanto, las realizaciones de la presente invención pueden adaptarse para excluir B27 cuando está presente N2, si se desea.

En algunas realizaciones, B27 no está presente en el medio de cultivo.

En algunas realizaciones, el medio de cultivo se suplementa con B27 y/o N2.

En algunas realizaciones, el medio basal se suplementa con de 150 ng/ml a 250 ng/ml de N-acetilcisteína; preferiblemente, el medio basal se suplementa con aproximadamente 200 ng/ml de N-acetilcisteína.

En algunas realizaciones, el medio de cultivo comprende progestina. En otras realizaciones, el medio de cultivo no comprende progestina.

En algunas realizaciones, el medio de cultivo comprende estradiol. En otras realizaciones, el medio de cultivo no comprende estradiol.

En algunas realizaciones, el medio de cultivo comprende factor de crecimiento de hepatocitos. En otras realizaciones, el medio de cultivo no comprende factor de crecimiento de hepatocitos.

En algunas realizaciones, el medio de cultivo comprende el activador del receptor del ligando del factor nuclear kappa-B (RANKL). En otras realizaciones, el medio de cultivo no comprende RANKL. En algunas realizaciones, el medio de cultivo de la invención se suplementa con nicotinamida. Se ha descubierto que la adición de nicotinamida mejora la eficiencia del cultivo y la vida útil de los organoides humanos. Puede añadirse nicotinamida al medio de cultivo hasta una concentración final de entre 1 y 100 mM, entre 5 y 50 mM, o preferiblemente entre 5 y 20 mM. Por ejemplo, puede añadirse nicotinamida al medio de cultivo hasta una concentración final de aproximadamente 10 mM.

En algunas realizaciones, el medio de cultivo de la invención comprende además un agente estabilizador de p53. Puede añadirse un agente estabilizador de p53 al medio de cultivo para asegurar que la población celular sea predominantemente de células tumorales. Sin desear estar limitado por ninguna teoría, se cree que los agentes estabilizadores de p53 aumentan la concentración celular de p53 (por ejemplo, bloqueando la interacción entre p53 y Mdm2), estimulan la expresión dependiente de p53 e inducen la senescencia celular. Las mutaciones de p53 se producen comúnmente en células tumorales, lo que puede dar como resultado que la proteína p53 mutante no pueda ser estabilizada por un agente estabilizador de p53. Por tanto, un subconjunto de células tumorales con la proteína p53 mutante escaparía de la senescencia inducida por un agente estabilizador de p53 y superaría el crecimiento de las células normales en una población mixta. Un agente estabilizador de p53 preferido es un miembro de la familia Nutlin, por ejemplo, Nutlin-1, Nutlin-2 o Nutlin-3. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el agente estabilizador de p53 es Nutlin-3. Puede usarse cualquier concentración adecuada del agente estabilizador de p53, por ejemplo entre 1 nM y 10 mM, entre 10 nM y 1 mM, entre 100 nM y 100  $\mu$ M, entre 1  $\mu$ M y 10  $\mu$ M. Por ejemplo, puede añadirse Nutlin-3 al medio de cultivo de la invención hasta una concentración final de aproximadamente 5  $\mu$ M. Por consiguiente, en algunas realizaciones de los métodos de la invención en los que las células madre epiteliales de mama son células cancerosas, el medio de cultivo usado en el método comprende ventajosamente un agente estabilizador de p53. Sin embargo, otras realizaciones de tales métodos para cultivar células madre de cáncer epitelial de mama no usan un medio de cultivo que comprende un agente estabilizador de p53. También se prevé que el agente estabilizador de p53 pueda estar presente en el medio de cultivo cuando el método se usa para cultivar células madre epiteliales de mama normales, aunque no es necesario.

En algunas realizaciones, el medio de cultivo de la invención comprende además un inhibidor de la quinasa MAP p38. Un inhibidor de la quinasa MAP p38 es un inhibidor que regula negativamente directa o indirectamente la señalización de p38. En algunas realizaciones, el inhibidor de la quinasa MAP p38 es SB202190. Sin embargo, pueden usarse alternativamente otros inhibidores de la quinasa MAP p38 adecuados y estos están fácilmente disponibles para el experto en la técnica.

Puede usarse cualquier pH adecuado. Por ejemplo, el pH del medio puede estar en el intervalo de aproximadamente 7,0 a 7,8, en el intervalo de aproximadamente 7,2 a 7,6 o aproximadamente 7,4. El pH puede mantenerse usando un tampón. El experto en la técnica puede seleccionar fácilmente un tampón adecuado. Los tampones que pueden usarse incluyen tampones de carbonato (por ejemplo,  $\text{NaHCO}_3$ ) y fosfatos (por ejemplo,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ). Estos tampones se usan generalmente en aproximadamente 50 a aproximadamente 500 mg/l. También pueden usarse otros tampones como N-[2-hidroxietil]-piperazina-N'-[ácido 2-etanosulfónico] (HEPES) y ácido 3-[N-morfolino]-propanosulfónico (MOPS), normalmente a aproximadamente 1000 a aproximadamente 10.000 mg/l. Un medio de cultivo puede comprender un indicador de pH, como rojo fenol, para permitir que el estado del pH del medio se controle fácilmente (por ejemplo, de aproximadamente 5 a aproximadamente 50 mg/litro).

Un medio de cultivo para su uso en la invención puede comprender además uno o más aminoácidos. El experto en la técnica comprende los tipos y cantidades apropiados de aminoácidos para su uso en medios de cultivo de células madre. Los aminoácidos que pueden estar presentes incluyen L-alanina, L-arginina, L-asparagina, L-ácido aspártico, L-cisteína, L-cistina, L-ácido glutámico, L-glutamina, L-glicina, L-histidina, L-isoleucina, L-leucina, L-lisina, L-metionina, L-fenilalanina, L-prolina, L-serina, L-treonina, L-triptófano, L-tirosina, L-valina y combinaciones de los mismos. Algunos medios de cultivo contendrán todos estos aminoácidos. Generalmente, cada aminoácido cuando está presente está presente en de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 1 g/l de medio (generalmente de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,15 g/l), excepto por la L-glutamina que está presente en de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 1 g/l (habitualmente de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 0,75 g/l). Los aminoácidos pueden ser de origen sintético.

Un medio de cultivo para su uso en la invención puede comprender además una o más vitaminas. El experto en la técnica comprenderá los tipos y cantidades apropiados de vitaminas para su uso en medios de cultivo de células madre. Las vitaminas que pueden estar presentes incluyen tiamina (vitamina B1), riboflavina (vitamina B2), niacina (vitamina B3), pantotenato de calcio D (vitamina B5), piridoxal/piridoxamina/piridoxina (vitamina B6), ácido fólico (vitamina B9), cianocobalamina (vitamina B12), ácido ascórbico (vitamina C), calciferol (vitamina D2), DL-alfa tocoferol (vitamina E), biotina (vitamina H) y menadiona (vitamina K).

Un medio de cultivo para su uso en la invención puede comprender además una o más sales inorgánicas. El experto en la técnica comprenderá los tipos y cantidades apropiados de sales inorgánicas para su uso en medios de cultivo de células madre. Las sales inorgánicas se incluyen típicamente en los medios de cultivo para ayudar al mantenimiento del equilibrio osmótico de las células y para ayudar a regular el potencial de membrana. Las sales inorgánicas que pueden estar presentes incluyen sales de calcio, cobre, hierro, magnesio, potasio, sodio, zinc. Las sales se usan normalmente en forma de cloruros, fosfatos, sulfatos, nitratos y bicarbonatos. Las sales específicas que pueden usarse incluyen  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{KCl}$ ,  $\text{NaHCO}_3$ ,  $\text{NaCl}$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  y  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ .

La osmolaridad del medio puede estar en el intervalo de aproximadamente 200 a aproximadamente 400

mOsm/kg, en el intervalo de aproximadamente 290 a aproximadamente 350 mOsm/kg, o en el intervalo de aproximadamente 280 a aproximadamente 310 mOsm/kg. La osmolaridad del medio puede ser inferior a aproximadamente 300 mOsm/kg (por ejemplo, aproximadamente 280 mOsm/kg).

5 Un medio de cultivo para su uso en la invención puede comprender además una fuente de energía de carbono, en forma de uno o más azúcares. El experto en la técnica comprende los tipos y cantidades apropiados de azúcares para su uso en los medios de cultivo de células madre. Los azúcares que pueden estar presentes incluyen glucosa, galactosa, maltosa y fructosa. El azúcar es preferiblemente glucosa, particularmente D-glucosa (dextrosa). Normalmente, una fuente de energía de carbono estará presente entre aproximadamente 1 y aproximadamente 10 g/l.

10 Un medio de cultivo de la invención puede contener además suero. Puede usarse suero obtenido de cualquier fuente apropiada, incluyendo suero bovino fetal (FBS), suero de cabra o suero humano. Preferiblemente, se usa suero humano. El suero puede usarse entre aproximadamente el 1% y aproximadamente el 30% en volumen del medio, de acuerdo con técnicas convencionales.

15 En otras realizaciones, un medio de cultivo de la invención puede contener además un reemplazo de suero. Están disponibles comercialmente varias formulaciones de reemplazo de suero diferentes y son conocidas por los expertos. Cuando se usa un reemplazo de suero, puede usarse entre aproximadamente el 1% y aproximadamente el 30% en volumen del medio, de acuerdo con técnicas convencionales.

20 En otras realizaciones, un medio de cultivo de la invención puede estar libre de suero y/o libre de reemplazo de suero. Un medio libre de suero es aquel que no contiene suero animal de ningún tipo. Pueden preferirse los medios libres de suero para evitar una posible xenocontaminación de las células madre. Un medio libre de reemplazo de suero es aquel que no se ha suplementado con ninguna formulación comercial de reemplazo de suero.

25 En una realización preferida, el medio de cultivo celular se suplementa con un factor de crecimiento natural, semisintético y/o sintético purificado y no comprende un componente indefinido, como suero bovino fetal o suero de ternera fetal. Por ejemplo, los suplementos como B27 (Invitrogen), N-Acetilcisteína (Sigma) y N2 (Invitrogen) estimulan la proliferación de algunas células. En algunas realizaciones, el medio de cultivo celular se suplementa con uno o más de estos suplementos, por ejemplo, uno, dos cualesquiera o los tres de estos suplementos.

30 Un medio de cultivo para su uso en la invención puede comprender además uno o más oligoelementos, tales como iones de bario, bromo, cobalto, yodo, manganeso, cromo, cobre, níquel, selenio, vanadio, titanio, germanio, molibdeno, silicio, hierro, flúor, plata, rubidio, estaño, circonio, cadmio, zinc y/o aluminio.

35 El medio puede comprender un agente reductor, como beta-mercaptoetanol a una concentración de aproximadamente 0,1 mM.

40 Un medio de cultivo de la invención puede comprender uno o más agentes adicionales, como nutrientes o factores de crecimiento que se ha informado con anterioridad que mejoran el cultivo de células madre, como colesterol/transferrina/albumina/insulina/progesterona, putrescina, selenita/otros factores.

45 En algunas realizaciones, el medio de cultivo de la invención comprende neuregulina  $\beta$ -1 humana recombinante, una Rspodina (por ejemplo, Rspodina 1), Noggin, B27, N-Acetilcisteína, Nicotinamida, un inhibidor de ROCK 1,2 (por ejemplo, Y-27632), un inhibidor de ALK 4, 5, 7 (por ejemplo, A83-01), un inhibidor de quinasa p38 MAP (por ejemplo, SB 202190), FGF7 y FGF10.

50 En algunas realizaciones, el medio de cultivo de la invención comprende neuregulina  $\beta$ -1 humana recombinante, una Rspodina (por ejemplo, Rspodina 1), Noggin, B27, N-Acetilcisteína, Nicotinamida, un inhibidor de ROCK 1,2 (por ejemplo, Y-27632), un inhibidor de ALK 4, 5, 7 (por ejemplo, A83-01), un inhibidor de quinasa p38 MAP (por ejemplo, SB 202190), FGF7, FGF10 y PDGF-CC.

55 En algunas realizaciones, el medio de cultivo de la invención comprende neuregulina  $\beta$ -1 humana recombinante, una Rspodina (por ejemplo, Rspodina 1), Noggin, B27, N-Acetilcisteína, Nicotinamida, un inhibidor de ROCK 1,2 (por ejemplo, Y-27632), un inhibidor de ALK 4, 5, 7 (por ejemplo, A83-01), un inhibidor de quinasa p38 MAP (por ejemplo, SB 202190), FGF7, FGF10 y EGF.

60 En algunas realizaciones, el medio de cultivo de la invención comprende neuregulina  $\beta$ -1 humana recombinante, una Rspodina (por ejemplo, Rspodina 1), Noggin, B27, N-Acetilcisteína, Nicotinamida, un inhibidor de ROCK 1,2 (por ejemplo, Y-27632), un inhibidor de ALK 4, 5, 7 (por ejemplo, A83-01), un inhibidor de quinasa p38 MAP (por ejemplo, SB 202190), FGF7, FGF10, anfirregulina, TGF-alfa y EGF.

Matriz extracelular

Como se ha descrito anteriormente, el método de la invención puede comprender cultivar una o más células madre epiteliales en contacto con una matriz extracelular. Puede usarse cualquier matriz extracelular adecuada. Las células madre epiteliales de mama aisladas se cultivan preferiblemente en un microambiente que imita por lo menos en parte un nicho celular en el que residen de manera natural dichas células madre. Este nicho celular puede imitarse cultivando dichas células madre en presencia de biomateriales, como una matriz extracelular que proporciona señales reguladoras clave que controlan el destino de las células madre.

Un nicho celular está determinado en parte por las células madre y las células circundantes, y la matriz extracelular (MEC) que es producida por las células en dicho nicho. En un método preferido de la invención, las células madre epiteliales se cultivan en contacto con un ECM. "En contacto" significa un contacto físico, mecánico o químico, lo que significa que para separar dicho organoide resultante o población de células madre epiteliales de dicha matriz extracelular es necesario usar una fuerza. Preferiblemente, las células madre epiteliales de mama están incorporadas en la ECM.

Un medio de cultivo de la invención puede difundirse en una matriz extracelular (ECM). En un método preferido de la invención, los fragmentos de tejido aislados o las células madre epiteliales de mama aisladas se unen a una ECM. La ECM está compuesta por una variedad de polisacáridos, agua, elastina y glicoproteínas, en donde las glicoproteínas comprenden colágeno, entactina (nidogeno), fibronectina y laminina. La ECM es secretada por células epiteliales, células endoteliales, células similares al endodermo parietal (por ejemplo, células similares al endodermo parietal de Englebreth-Holm-Swarm descritas en Hayashi et al. (2004) Matrix Biology 23: 47-62) y células de 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 como, por ejemplo, células epiteliales, células endoteliales, células similares al endodermo parietal o células de fibroblastos, en un receptáculo, antes de la eliminación de estas células y la adición de fragmentos de tejido aislados o células madre epiteliales aisladas. Ejemplos de células productoras de la matriz extracelular son los condrocitos, que producen principalmente colágeno y proteoglicanos, células de fibroblastos, que producen principalmente colágeno tipo IV, laminina, procolágenos intersticiales y fibronectina, y miofibroblastos colónicos que producen principalmente colágeno (tipo I, III y V), condroitina sulfato proteoglicano, ácido hialurónico, fibronectina y tenascina-C. Alternativamente, dicha 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, extracto de la membrana basal Cultrex® (Trevigen, Inc.) o Matrigel™ (BD Biosciences)). Puede usarse un material sintético de matriz extracelular, como ProNectin (Sigma Z378666). Pueden usarse mezclas de materiales de matriz extracelular, si se desea. El uso de una ECM para cultivar células madre mejoró la supervivencia a largo plazo de las células madre y la presencia continuada de células madre indiferenciadas. En ausencia de una ECM, los cultivos de células madre no se pudieron cultivar durante períodos más largos y no se observó presencia continuada de células madre indiferenciadas. Además, la presencia de una ECM permitió el cultivo de organoides tisulares tridimensionales, que no podrían cultivarse en ausencia de una ECM. El material de la matriz extracelular será normalmente una gota en el fondo de la placa en la que están suspendidas las células. Típicamente, cuando la matriz se solidifica a 37° C, se añade el medio y se difunde en la ECM. Las células en el medio se adhieren a la ECM por interacción con su estructura de superficie, por ejemplo interacción con integrinas.

Un ejemplo de ECM para su uso en un método de la invención comprende por lo menos una glicoproteína, como laminina.

Una ECM preferida para su uso en un método de la invención comprende por lo menos dos glicoproteínas distintas, como dos tipos diferentes de colágeno o un colágeno y laminina. La ECM puede ser una matriz extracelular de hidrogel sintético o una ECM de origen natural. Una ECM preferida adicional comprende laminina, entactina y colágeno IV. Matrigel™ (BD Biosciences) proporciona una ECM preferida adicional, que comprende laminina, entactina y colágeno IV. En algunas realizaciones, la matriz extracelular es una matriz extracelular que contiene laminina como Matrigel™ (BD Biosciences). En algunas realizaciones, la ECM comprende laminina, entactina, colágeno IV y proteoglicano de sulfato de heparina (por ejemplo, extracto de membrana basal Cultrex® Tipo 2 (Trevigen, Inc.)).

En algunas realizaciones, la célula madre única, la población de células o el fragmento de tejido se incrusta en matrigel, que opcionalmente tiene un factor de crecimiento reducido y/o está libre de rojo fenol.

En algunas realizaciones, el medio de cultivo se coloca encima de la ECM. Luego, el medio de cultivo puede retirarse y reponerse cuando sea necesario. En algunas realizaciones, el medio de cultivo se repone cada 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 días. Si los componentes se "añaden" o "eliminan" de los medios, en algunas realizaciones esto puede significar que los medios en sí se eliminan de la ECM y luego se coloca un nuevo medio que contiene el componente "añadido" o con el componente "eliminado" excluido en la ECM.

En algunas realizaciones, el medio de cultivo de la invención está en contacto con una matriz extracelular o

una matriz 3D que imita la matriz extracelular por su interacción con las proteínas de la membrana celular, como las integrinas.

5 Se proporciona además un medio de cultivo de la invención y una matriz extracelular, por ejemplo, suministrada como un kit.

10 En algunas realizaciones, el medio de cultivo de la invención es adecuado para cultivar células madre de mama adultas. En algunas realizaciones, el medio de cultivo de la invención es adecuado para obtener organoides de mama. En algunas realizaciones, el medio de cultivo de la invención es adecuado para expandir una población de células madre de mama durante por lo menos 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o más de 14 pases.

15 Por tanto, la invención proporciona un medio de cultivo como se describe en la presente que comprende uno o más ligandos de ErbB3/4, uno o más ligandos de FGFR2b y un agonista de Wnt que es adecuado para expandir una población de células madre de mama durante por lo menos 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o más de 14 pases.

20 En algunas realizaciones, el medio de cultivo de la invención es adecuado para establecer poblaciones de organoides de mama con éxito en por lo menos el 50%, por lo menos el 60%, por lo menos el 70%, por lo menos el 80% o por lo menos el 90% de las inoculaciones. Un organoide de mama con éxito se define en la presente como un organoide que puede someterse a pases por lo menos cuatro veces.

25 Por tanto, la invención proporciona un medio de cultivo que comprende uno o más ligandos de ErbB3/4 que es adecuado para establecer poblaciones de organoides con éxito con una eficiencia de por lo menos el 50%, por lo menos el 60%, por lo menos el 70%, por lo menos el 80% o por lo menos el 90%.

**Usos de los medios de cultivo de la invención**

30 La divulgación proporciona el uso del medio de cultivo de la invención para expandir una célula madre epitelial, una población de células madre epiteliales, un fragmento de tejido u organoide.

La divulgación también proporciona el uso de un medio de cultivo de la invención para expandir una célula madre epitelial de mama, una población de células madre epiteliales de mama, un fragmento de tejido de mama o un organoide de mama.

35 En algunos casos, la célula madre, la población de células madre, el fragmento de tejido u organoide puede obtenerse de un tejido normal. Por ejemplo, en algunos casos, la célula madre, la población de células madre, el fragmento de tejido u organoide puede obtenerse de un tejido no canceroso.

40 En algunos casos, la célula madre, la población de células madre, el fragmento de tejido u organoide puede obtenerse de un tejido enfermo, por ejemplo, un tejido canceroso, como un adenoma, un fibroadenoma, un adenocarcinoma, un carcinoma, un sarcoma, células tumorales circulantes o cáncer metastatizado. Por consiguiente, en algunos casos, la célula madre, la población de células madre, el fragmento de tejido u organoide puede obtenerse de un tumor de mama benigno o maligno. En algunos casos, la célula madre, la población de células madre, el fragmento de tejido u organoide es o comprende una célula o células de cáncer de mama. En algunos casos, la célula madre, la población de células madre o el fragmento de tejido es una biopsia de un tumor de mama. El tumor es preferiblemente un tumor de mama por origen en lugar de ser un tumor metastático que se origina en un tejido diferente.

**Aislamiento de células madre epiteliales de mama para cultivo**

50 En una realización preferida, las células madre epiteliales de mama a cultivar en el método de la invención y/o de las que se derivan los organoides se obtienen de tejido adulto, es decir, las células madre epiteliales son células madre epiteliales de mama adultas. En este contexto, "adulto" significa tejido maduro, es decir, incluye bebé recién nacido o niño, pero excluye embrionario o fetal. En una realización preferida, las células madre epiteliales de mama no se derivan de células madre embrionarias o líneas de células madre embrionarias, por ejemplo, que se han diferenciado in vitro, por ejemplo, células madre embrionarias humanas o líneas de células madre embrionarias humanas.

60 Las células y tejidos son preferiblemente células y tejidos de mamíferos. Más preferiblemente, las células y tejidos son células y tejidos humanos. En algunas realizaciones, son de otros mamíferos, por ejemplo de un animal de laboratorio (por ejemplo, ratón, conejo, rata, cobaya), un animal de compañía (por ejemplo, perro, gato, caballo) o un animal de granja (por ejemplo, vaca, cerdo, oveja, cabra, etc.).

65 A las células extraídas directamente de tejido vivo, es decir, células recién aisladas, también se hace referencia como células primarias. En algunas realizaciones, las células madre epiteliales de mama son células

madre epiteliales de mama primarias. Las células primarias representan los mejores modelos experimentales para situaciones in vivo. En una realización preferida de la invención, las células madre epiteliales de mama son (o se derivan de) células madre epiteliales de mama primarias. Los cultivos de células primarias pueden pasarse para formar cultivos de células secundarias. Con la excepción de las células cancerosas, los cultivos de células secundarias tradicionales tienen una vida útil limitada. Después de un cierto número de duplicaciones de población (por ejemplo, 50-100 generaciones), las células experimentan el proceso de senescencia y dejan de dividirse. Las células de cultivos secundarios pueden immortalizarse para convertirse en líneas celulares continuas. La immortalización puede producirse espontáneamente, o puede ser inducida viral o químicamente. Las líneas celulares immortalizadas también se conocen como células transformadas. Al contrario, los métodos de la presente invención permiten el paso continuo de células madre epiteliales de mama sin immortalización o transformación. Por tanto, en algunas realizaciones, las células madre epiteliales de mama no son células immortalizadas o transformadas o no se derivan de una línea celular immortalizada o una línea celular transformada. Una ventaja de la presente invención es que las células madre epiteliales de mama, que experimentan múltiples series de expansión y pases, retienen las características de las células primarias y tienen cambios genotípicos o fenotípicos mínimos o nulos

Las células madre epiteliales de mama pueden obtenerse mediante cualquier método adecuado. En algunas realizaciones, las células se aíslan mediante digestión con colagenasa, por ejemplo, como se describe en los ejemplos y en Dorell et al., 2008 (Hepatology. octubre de 2008; 48(4):1282-91. . Surface markers for the murine oval cell response. Dorrell C, Erker L, Lanxon-Cookson KM, Abraham SL, Victoroff T, Ro S, Canaday P S, Streeter P R, Grompe M). En algunas realizaciones, la digestión con colagenasa se realiza en una biopsia de tejido. En algunas realizaciones, se usan la digestión con colagenasa y accutasa para obtener las células madre epiteliales de mama para su uso en la invención.

En algunas realizaciones, el tejido mamario puede trocearse, lavarse (por ejemplo, en medio de cultivo basal) e incubarse en un medio de cultivo de la invención suplementado con una proteasa (por ejemplo, colagenasa, dispasa o tripsina) (ver, por ejemplo, el Ejemplo 1). La proteasa puede estar en cualquier concentración adecuada, por ejemplo, entre 0,1 y 10 mg/ml, entre 0,1 y 1 mg/ml o entre 1 y 10 mg/ml. Por ejemplo, la proteasa puede estar presente entre 1 y 2 mg/ml. La incubación en el medio de cultivo suplementado con una proteasa puede durar cualquier período de tiempo adecuado. Por ejemplo, el tejido puede incubarse en el medio entre 10 minutos y 10 horas, entre 20 minutos y 5 horas, entre 30 minutos y 5 horas, entre 30 minutos y 3 horas, entre 30 minutos y 2 horas, entre 1 hora y 5 horas, entre 1 hora y 3 horas o entre 1 hora y 2 horas. En algunas realizaciones, el tejido se incuba en el medio durante por lo menos 10 minutos, por lo menos 20 minutos, por lo menos 30 minutos, por lo menos 1 hora, por lo menos 2 horas, por lo menos 3 horas o por lo menos 5 horas.

Luego, los fragmentos de tejido contenidos en la suspensión de tejido digerida resultante pueden reducirse aún más de tamaño. Por ejemplo, la suspensión puede cortarse. Pueden usarse pasos de filtración y/o centrifugación para aislar fragmentos de tejido o células aisladas. Los fragmentos de tejido aislados o las células aisladas pueden cultivarse luego en un medio de cultivo de la invención.

En algunas realizaciones, el método comprende cultivar un fragmento de tejido que comprende epitelio de mama. En algunas realizaciones, las células madre epiteliales de mama se aíslan de un fragmento de tejido.

En algunas realizaciones, las células madre epiteliales de mama se obtienen para cultivo basándose en la expresión de marcadores de superficie de células epiteliales, como EPCAM, MUC-1, KRT-5, KRT8 y KRT18. Por lo tanto, un método de la invención comprende preparar una suspensión celular a partir de dicho tejido epitelial como se ha descrito anteriormente, poner en contacto dicha suspensión celular con un compuesto de unión a marcador de superficie de células epiteliales (por ejemplo, compuestos de unión EPCAM, MUC-1, KRT-5, KRT8 y/o KRT18), aislar el compuesto de unión al marcador epitelial y aislar las células de dicho compuesto de unión.

En algunas realizaciones, las células madre epiteliales de mama se obtienen para el cultivo en base a la expresión de Lgr5 y/o Lgr6 en la superficie de las células madre epiteliales; estas proteínas pertenecen a la gran superfamilia de receptores acoplados a proteínas G (GPCR) (ver, por ejemplo, la 2009/022907). La subfamilia Lgr es única porque lleva un gran ectodominio rico en leucina importante para la unión a ligandos. Por tanto, en algunas realizaciones, un método de la invención comprende preparar una suspensión celular a partir de dicho tejido epitelial de mama como se ha descrito anteriormente, poner en contacto dicha suspensión celular con un compuesto de unión a Lgr5 y/o 6 (como un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal anti-Lgr5, por ejemplo, como se describe en la WO 2009/022907), aislar el compuesto de unión a Lgr5 y/o 6, y aislar las células madre de dicho compuesto de unión.

Un organoide se obtiene preferiblemente usando una célula de un tejido adulto, preferiblemente una célula madre epitelial de mama de un tejido adulto.

En algunas realizaciones, las células madre epiteliales de mama son células normales. En realizaciones alternativas, las células madre epiteliales de mama son células madre cancerosas. Por tanto, se prevé, por ejemplo, que las células madre epiteliales de mama puedan ser células madre cancerosas positivas para Lgr5. Por

consiguiente, las células pueden obtenerse de un tumor, si es necesario. En realizaciones alternativas, las células madre epiteliales de mama son células madre enfermas, por ejemplo células madre epiteliales de mama infectadas con patógenos intracelulares (por ejemplo, bacterias, virus o parásitos).

5 Los compuestos de unión que se unen a marcadores de células de cáncer de mama pueden usarse para el aislamiento de células madre de cáncer de mama para cultivo en un método de la invención. Ejemplos de marcadores de células de cáncer de mama incluyen antígeno de membrana epitelial, antígeno de cáncer 15-3 (CA 15-3), antígeno de cáncer 27.29 (CA 27.29), antígeno carcinoembrionario (CEA), activador de plasminógeno de uroquinasa (uPA), inhibidor del activador de plasminógeno (PAI-1), podocalixina, EZH2 y calicreína-10. Por ejemplo, pueden usarse compuestos de unión al antígeno de membrana epitelial (EMA) (por ejemplo, anticuerpos anti-EMA) para el aislamiento de células de cáncer de mama. En algunas realizaciones, un método de la invención comprende por lo tanto preparar una suspensión celular a partir de tejido canceroso primario o secundario, poner en contacto dicha suspensión celular con un compuesto de unión al marcador de células de cáncer de mama (por ejemplo, compuestos de unión a EMA), aislar el compuesto de unión al marcador de células de cáncer de mama y aislar las células de dicho compuesto de unión. En otra realización, un organoide de mama se origina a partir de una célula madre epitelial individual de cáncer, que opcionalmente expresa Lgr5. En algunas realizaciones, la célula individual comprende un constructo de ácido nucleico que comprende una molécula de ácido nucleico de interés.

20 Los compuestos de unión a Lgr5 y/o 6 preferidos comprenden anticuerpos, como los anticuerpos monoclonales que reconocen y se unen específicamente al dominio extracelular de cualquiera de Lgr5 o Lgr6, como los anticuerpos monoclonales, incluyendo los anticuerpos monoclonales de ratón y rata (ver, por ejemplo, la WO 2010/016766). Usando tal anticuerpo, las células madre que expresan Lgr5 y/o Lgr6 pueden aislarse, por ejemplo, con la ayuda de perlas magnéticas o mediante clasificación de células activadas por fluorescencia, como es evidente para un experto. Usando un método de la invención, es posible aislar una única célula que expresa Lgr5 y/o Lgr6 y aplicarle un método de la invención. Por tanto, un organoide o una población de células madre epiteliales de mama puede derivarse de una única célula. Por consiguiente, en algunas realizaciones, la célula de partida a cultivar es una única célula madre epitelial de mama.

30 Alternativamente, puede usarse una población de células como punto de partida, por ejemplo, una población de células contenidas en un fragmento de tejido de mama como se ha descrito anteriormente. Por tanto, los métodos de la invención no se limitan al uso de células individuales como punto de partida.

35 En un aspecto adicional, se proporciona un método para obtener un organoide que comprende cultivar células madre epiteliales de mama en un medio de cultivo de la invención. Preferiblemente, el método comprende cultivar las células madre epiteliales de mama en un medio de cultivo de la invención usando un método de cultivo como se describe en la presente.

40 En algunas realizaciones, el método comprende cultivar las células madre epiteliales de mama u obtener el organoide/población de células madre epiteliales de mama adultas de una única célula. Ventajosamente, esto permite que se forme una población homogénea de células. En algunas realizaciones, el método comprende cultivar las células madre en un medio de cultivo de la invención durante un período de tiempo, por ejemplo, de 3 días a 10 semanas, de 1 a 10 semanas, de 1 a 4 semanas o de 10 días a 3 semanas, y luego pasar las células (por ejemplo, disociar las células a una densidad celular única, sembrar una o más células en una proporción de 1 célula por recipiente (por ejemplo, por pocillo)), expandir las células usando un medio de cultivo de la invención durante un período de tiempo, por ejemplo, de 3 días a 10 semanas, de 1 a 10 semanas, de 1 a 4 semanas o de 10 días a 3 semanas y repetir los pases y expandir los pases por lo menos una vez, por lo menos dos veces, por lo menos tres veces, por lo menos cuatro veces, por lo menos cinco veces, por lo menos seis veces, por lo menos siete veces, por lo menos ocho veces, por lo menos nueve veces, por lo menos diez veces, por lo menos once veces, por lo menos doce veces, por lo menos trece veces o por lo menos catorce veces.

50 Después del cultivo, el método puede comprender además obtener y/o aislar una o más células madre epiteliales de mama o un organoide. Por ejemplo, después del cultivo de las células madre, puede ser útil eliminar una o más células madre y/o uno o más organoides cultivados en el medio de cultivo del medio de cultivo para su uso en aplicaciones posteriores. Puede usarse cualquiera de varios métodos físicos de separación conocidos en la técnica para seleccionar las células de la divulgación y distinguirlas de otros tipos de células. Tales métodos físicos pueden implicar FACS y varios métodos de inmunofluorescencia basados en marcadores expresados específicamente por las células. Como se describe en la presente, LGR5 es un marcador celular que puede expresarse en las células. Por lo tanto, solo a modo de ilustración, las células de la invención pueden aislarse mediante una serie de métodos físicos de separación, que se basan en la presencia de este marcador. De manera similar, puede usarse cualquiera de los otros marcadores expresados por las células.

65 En una realización, las células de la invención pueden aislarse mediante FACS utilizando un anticuerpo, por ejemplo, contra uno de estos marcadores. Como resultará evidente para un experto en la técnica, esto puede lograrse mediante un anticuerpo marcado con fluorescencia, o mediante un anticuerpo secundario marcado con fluorescencia con especificidad de unión para el anticuerpo primario. Ejemplos de marcadores fluorescentes

adecuados incluyen pero no se limitan a, 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 limitativa.

5 Será evidente para una persona experta en la técnica que el análisis FACS usando un anticuerpo anti-Lgr5 puede proporcionar una población de células purificadas. Sin embargo, en algunas realizaciones, puede ser preferible purificar adicionalmente la población celular realizando una serie adicional de análisis FACS usando uno o más de los otros marcadores identificables, por ejemplo, Sox9, Slug, CD44 y/o ALDH1, pero también pueden usarse otros.

10 En otra realización, las células madre epiteliales de mama pueden aislarse mediante purificación por inmunoafinidad, que es un método de separación bien conocido en la técnica. Sólo a modo de ilustración, las células pueden aislarse mediante purificación por inmunoafinidad dirigida hacia c-kit. Como resultará 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 luego en la columna, permitiendo que las células apropiadas se unan a los anticuerpos y, por lo tanto, se unan a la columna. Después de un paso de lavado, las células se eluyen de la columna usando un competidor que se une preferentemente al anticuerpo anti-c-kit inmovilizado y permite que las células se liberen de la columna.

15 Será evidente para un experto en la técnica que la purificación por inmunoafinidad usando un anticuerpo inmovilizado proporcionará una población de células purificadas. Sin embargo, en algunas realizaciones, puede ser preferible purificar adicionalmente la población celular realizando una serie adicional de purificación por inmunoafinidad usando uno o más de los otros marcadores identificables, por ejemplo, Sox9, Slug, CD44 y/o ALDH1, y usar una alícuota de los clones aislados para determinar la expresión de otros marcadores intracelulares relevantes.

20 Será evidente para un experto en la técnica que no es necesario que los pasos de purificación secuenciales impliquen el mismo método físico de separación. Por lo tanto, estará claro que, por ejemplo, las células pueden purificarse mediante un paso de FACS usando un anticuerpo anti-Lgr5, seguido de un paso de purificación por inmunoafinidad usando una columna de afinidad SSEA-1. En ciertas realizaciones, las células pueden cultivarse después del aislamiento durante por lo menos aproximadamente 15, por lo menos aproximadamente 20 días, por lo menos aproximadamente 25 días o por lo menos aproximadamente 30 días. En ciertos aspectos, las células se expanden en cultivo durante más tiempo para mejorar la homogeneidad del fenotipo celular en la población celular.

25 Otras características de este método se definen en la parte de la descripción dedicada a las definiciones. Normalmente se sembrarán suspensiones unicelulares o pequeñas agrupaciones de células (2-50 células/grupo), en lugar de grandes grupos de células, como se conoce en la técnica. A medida que se dividen, tales células se sembrarán sobre un soporte a una densidad que promueva la proliferación celular. Típicamente, cuando se aíslan células individuales, se usa una densidad de placa de por lo menos 1-500 células/pocillo, la superficie del pocillo es de 0,32 cm<sup>2</sup>. Cuando se siembran agrupaciones la densidad de placa es preferiblemente de 250-2500 células/cm<sup>2</sup>. Para volver a sembrar en placas, en algunas realizaciones puede usarse una densidad de entre aproximadamente 2500 células/cm<sup>2</sup> y aproximadamente 5000 células/cm<sup>2</sup>. Durante la resiembra en placas, normalmente se sembrarán suspensiones unicelulares o pequeñas agrupaciones de células, en lugar de grandes agrupaciones de células, como se conoce en la técnica.

30 En una realización, la invención proporciona una población de células madre epiteliales de mama o uno o más organoides de mama que comprenden dichas células madre epiteliales de mama que se han generado u obtenido mediante el cultivo de células madre epiteliales de mama o fragmentos de tejido de mama de acuerdo con la invención, que se han cultivado durante por lo menos 2 meses, por lo menos 3 meses, preferiblemente por lo menos 4 meses, por lo menos 5 meses, por lo menos 6 meses, por lo menos 7 meses, por lo menos 9 meses o por lo menos 12 meses o más, en donde las células madre se han pasado aproximadamente cada 1 a 4 semanas.

35 Una 'población' de células es cualquier número de células mayor que 1, pero preferiblemente de por lo menos 1 x 10<sup>3</sup> células, por lo menos 1 x 10<sup>4</sup> células, por lo menos 1 x 10<sup>5</sup> células, por lo menos 1 x 10<sup>6</sup> células, por lo menos 1 x 10<sup>7</sup> células, por lo menos 1 x 10<sup>8</sup> células, o por lo menos 1 x 10<sup>9</sup> células.

40 Las células madre o células progenitoras de la divulgación cultivadas de acuerdo con la invención pueden ser células madre humanas o células progenitoras humanas. Las células madre de la divulgación cultivadas de acuerdo con la invención pueden ser células madre epiteliales o células progenitoras epiteliales.

45 En algunos casos, las células madre de la divulgación y/o cultivadas de acuerdo con la divulgación no son células madre embrionarias. En algunos casos, las células madre de la divulgación y/o cultivadas de acuerdo con la divulgación no son células madre embrionarias humanas. Preferiblemente, las células madre de la divulgación son células madre adultas.

50

55

60

65

Las células madre expandidas mediante los métodos de la invención son células madre epiteliales de mama humanas. Las células madre epiteliales humanas incluyen células madre de origen tejido epitelial humano. Las células madre epiteliales pueden formar los distintos tipos de células que componen el epitelio.

5 Los organoides son organoides de mama humanos.

**Métodos y medios de cultivo para células cancerosas y organoides cancerosos**

10 En algunas realizaciones, la célula madre epitelial de mama es una célula cancerosa o una célula tumoral no cancerosa, por ejemplo, deriva de un tumor. En algunas realizaciones, la célula cancerosa es una célula tumoral circulante. En algunas realizaciones, la célula cancerosa no es una célula tumoral circulante. Cuando se usa el término "cáncer" en la presente, debe entenderse que se aplica de igual manera a tumores no cancerosos (benignos). Por consiguiente, en algunas realizaciones, la célula se deriva de un tumor maligno o de una metástasis. En algunas realizaciones, la célula se deriva de un tumor benigno. Las células cancerosas tienden a tener mutaciones que activan o desactivan constitutivamente ciertas vías de crecimiento y que significa que ciertos factores en el medio de cultivo que normalmente pueden ser necesarios para el crecimiento, ya no son necesarios. Por ejemplo, algunos cánceres dan como resultado la activación constitutiva de la vía de Wnt. En tales casos, un medio de cultivo puede no requerir un agonista de Lgr5 y/o puede no requerir un agonista de Wnt, pero uno o ambos de estos pueden estar todavía presentes en el medio de cultivo. Otras mutaciones permitirían dejar fuera de los medios de cultivo descritos en la presente otros factores. También pueden cultivarse otros cánceres epiteliales (carcinomas) o tumores no cancerosos (por ejemplo, adenomas) en los medios de cultivo de la invención.

25 En una realización preferida, un organoide de cáncer de mama obtenido cultivando células madre de cáncer de mama puede cultivarse en las mismas condiciones de cultivo que un organoide de mama normal obtenido cultivando células madre epiteliales de mama, opcionalmente con ciertos factores excluidos del medio. En muchas situaciones, puede ser preferible (o por lo menos más conveniente) cultivar organoides de cáncer en el medio de tejido normal (sin excluir ningún factor). Preferiblemente, el medio de tejido normal debería permitir que crezcan cánceres con todos los antecedentes genéticos, sin excluir ninguna mutación de cáncer en particular. Los métodos de la invención para cultivar células madre pueden ponerse en práctica en consecuencia.

30 En una realización preferida adicional, el organoide de cáncer mama se hace crecer en un medio de cultivo de la invención que comprende además un agente estabilizador de p53. Al medio de cultivo puede añadirse un agente estabilizador de p53 para asegurar que la población celular sea predominantemente de células tumorales. Los métodos de la invención para cultivar células madre pueden ponerse en práctica en consecuencia.

**Métodos**

40 La invención proporciona un método para cultivar una única célula madre epitelial de mama, una población de células madre epiteliales de mama o un fragmento de tejido mamario aislado, preferiblemente para generar un organoide, en donde el método comprende:

- 45 proporcionar una célula madre epitelial de mama, una población de células madre epiteliales de mama o un fragmento de tejido mamario aislado;
- proporcionar un medio de cultivo que comprende uno o más ligandos de ErbB3/4, uno o más ligandos de FGFR2b y/o uno o más agonistas de Wnt;
- poner en contacto la célula madre, la población de células madre o el fragmento de tejido mamario aislado con el medio de cultivo;
- 50 cultivar la célula madre, la población de células madre o el fragmento de tejido mamario aislado en condiciones apropiadas.

55 Preferiblemente, las células se expanden para generar uno o más (por ejemplo, por lo menos 2, 3, 4, 5, 6, 10, 15, 20 o más de 20) organoides.

El medio de cultivo usado en los métodos de la invención es un medio de cultivo de acuerdo con la invención.

60 Un método para 'expandir' una población de células o fragmentos de tejido aislados es aquel que implica mantener o aumentar el número de células madre en una población inicial para generar una población expandida de células madre que conservan su fenotipo indiferenciado y propiedades de autorrenovación.

65 Sin embargo, también puede incluir la producción de una progenie diferenciadora, que puede, por ejemplo, formar estructuras similares a tejidos que contribuyen a la formación de organoides. Por tanto, en la presente se

proporcionan métodos para obtener un organoide de mama que comprende cultivar células madre o fragmentos de tejido que comprenden dichas células madre en un medio de cultivo de la invención. La invención proporciona un método para expandir una sola célula madre epitelial de mama o una población de células madre epiteliales de mama, preferiblemente para generar un organoide, en donde el método comprende cultivar la célula madre epitelial de mama individual o la población de células madre epiteliales de mama en un medio de cultivo de acuerdo con la invención. Como se ha mencionado anteriormente, el organoide puede ser un organoide normal o puede ser un organoide de cáncer, por ejemplo, un organoide de carcinoma o un organoide de adenocarcinoma, o un organoide de tumor benigno, por ejemplo. En algunas realizaciones, el método para expandir una células madre epitelial de mama individual o una población de células madre epiteliales de mama, preferiblemente para generar un organoide de mama, comprende expandir la célula madre epitelial de mama, la población de células madre epiteliales de mama o fragmento de tejido en un medio de cultivo de acuerdo con la invención.

Por tanto, la invención proporciona un método para expandir una célula madre epitelial de mama individual o una población de células madre epiteliales de mama, preferiblemente para generar un organoide, en donde el método comprende:

proporcionar una célula madre epitelial de mama, una población de células madre epiteliales de mama o un fragmento de tejido de mama aislado;

proporcionar un medio de cultivo de acuerdo con la invención;

poner en contacto las células madre con el medio de cultivo;

cultivar las células en condiciones apropiadas.

En algunas realizaciones, el método comprende poner en contacto la célula madre epitelial de mama, la población de células madre epiteliales de mama o el fragmento de tejido de mama aislado y el medio de cultivo con una matriz extracelular o una matriz 3D como se describe en la presente, por ejemplo, una matriz 3D que imita la matriz extracelular mediante su interacción con las proteínas de la membrana celular como las integrinas, por ejemplo una matriz extracelular que contiene laminina como Matrigel™ (BD Biosciences) o extracto de membrana basal Cultrex® (Trevigen, Inc.). En algunas realizaciones, el medio de cultivo se difunde en la matriz extracelular.

La invención proporciona métodos para cultivar células madre epiteliales de mama. La invención proporciona además métodos para expandir células madre epiteliales de mama y métodos para obtener organoides de mama.

El término "expansión de células madre" es sinónimo de "obtención de organoides de mama".

#### Aislamiento y cultivo de fragmentos de tejido y células madre

El experto en la técnica podrá determinar las condiciones de cultivo apropiadas para los métodos de la invención.

En algunas realizaciones, los fragmentos de tejido de mama o las células madre epiteliales de mama aisladas se cultivan en placas de suspensión. En algunas realizaciones, los fragmentos de tejido de mama o las células madre epiteliales de mama aisladas se cultivan entre 35° C y 39° C o entre 36° C y 38° C. Por ejemplo, los fragmentos de tejido o las células aisladas pueden cultivarse a aproximadamente 37° C.

En algunas realizaciones, los fragmentos de tejido de mama o las células madre epiteliales de mama aisladas se cultivan a niveles ambientales de O<sub>2</sub>. Alternativamente, en algunas realizaciones el nivel de O<sub>2</sub> puede estar, por ejemplo, entre el 0,5% y el 4%, entre el 1% y el 4%, entre el 1% y el 3% o entre el 2% y el 4%. Por ejemplo, los fragmentos de tejido de mamada o las células madre epiteliales de mama aisladas pueden cultivarse en condiciones de aproximadamente 2% de O<sub>2</sub>. Los fragmentos de tejido de mama o las células madre epiteliales de mama aisladas pueden cultivarse en condiciones de entre el 3% y el 7% de CO<sub>2</sub> o entre el 4% y el 6% de CO<sub>2</sub>. Por ejemplo, los fragmentos de tejido de mama o las células madre epiteliales de mama aisladas pueden cultivarse en condiciones de aproximadamente el 5% de CO<sub>2</sub>.

El medio de cultivo puede cambiarse en cualquier intervalo adecuado, por ejemplo, cada 1-7 días, cada 2-6 días o cada 3-5 días. Por ejemplo, el medio de cultivo puede cambiarse cada 4 días.

Los organoides pueden pasarse en cualquier intervalo adecuado, por ejemplo, de cada 3 días a cada 10 semanas, cada 1 a 10 semanas, cada 1 a 4 semanas o cada 10 días a 3 semanas. En algunas realizaciones, los organoides se pasan aproximadamente cada 10 días a 3 semanas.

En algunas realizaciones, la cadencia para el pase de los organoides está determinado por los organoides

que alcanzan un tamaño particular (por ejemplo, un tamaño medio de aproximadamente 100-200  $\mu\text{m}$ ) y/o una reducción en la viabilidad que puede manifestarse en la pérdida de integridad del epitelio, los organoides tienen una apariencia densa y/o la presencia de células muertas.

## 5 Organoides

La divulgación proporciona un organoide o una población de células madre epiteliales que pueden obtenerse o se obtienen mediante un método de la invención. Por tanto, en algunos casos, el método comprende además obtener y/o aislar un organoide. El organoide o población de células madre epiteliales de la divulgación comprende células de mama. Por consiguiente, se proporciona un organoide de mama que comprende una población de células madre epiteliales de mama. Preferiblemente, el organoide o la población de células madre epiteliales de la divulgación consiste de células de mama.

Los métodos para expandir las células mamarias se describen actualmente en Pasic et al. (2011) Genes & Development 25: 1641-1653, pero los métodos de cultivo y las estructuras celulares resultantes son diferentes de los métodos de cultivo y las estructuras celulares resultantes proporcionados por la presente divulgación. Los métodos descritos en Pasic et al. usan un sistema de cultivo que comprende (i) anfirregulina o EGF (que son ligandos de HER1) y (ii) FGF2 o FGF7. No usan medios de cultivo que comprenden un ligando de ErbB3/4 en combinación con un agonista de Lgr5 o un ligando de FGFR2b, como se usa en la presente divulgación. Pasic et al. probaron un medio de cultivo que comprende un ligando de ErbB3/4, NRG1- $\beta$ 1, pero no descubrieron que los organoides de mama son capaces de crecer en este medio de cultivo. Pasic et al. no probaron un medio de cultivo que comprende un ligando de ErbB3/4 combinado con un agonista de Lgr5 o un ligando de FGFR2b. El uso del sistema de cultivo de Pasic et al. da como resultado la formación de estructuras celulares que tienen una morfología distinta de la de los organoides de la presente divulgación. En particular, las estructuras celulares de Pasic et al. tienen una morfología de gemación en la que las estructuras tienen un borde rugoso, mientras que los organoides obtenidos usando los métodos de la presente divulgación no tienen esta morfología, sino que tienen una estructura suave similar a un quiste o una morfología similar a un racimo de uvas. Se ha observado que los cultivos que usan el sistema de Pasic et al. dejan de expandirse después de 2-3 pases (ver Ejemplo 4 en la presente), mientras que los inventores han descubierto que en algunas realizaciones que usan un método de la invención es posible expandir las células madre epiteliales de mama durante más de 14 pases.

Los métodos de cultivo de células tumorales circulantes se describen en Yu et al. (2014) Science 345(6193):216-220. Sin embargo, los autores de este artículo no proporcionaron ninguna orientación con respecto al cultivo de células madre epiteliales de mama obtenidas de tejido mamario normal, tumor primario o metástasis. De nuevo, el sistema de cultivo es diferente al de la presente invención y da como resultado estructuras diferentes en comparación con los organoides de la presente divulgación. En particular, Yu usa un método de cultivo que comprende EGF y FGF2. No usan medios de cultivo que comprenden un ligando de ErbB3/4 en combinación con un agonista de Lgr5 o un ligando de FGFR2b, como se usa en la presente invención. De hecho, no usan ningún medio de cultivo que comprenda un ligando de ErbB3/4. El método de Yu da como resultado la formación de agregados de células tumorales individuales sin una fuerte adhesión intercelular. Usando este método no se forma epitelio continuo. Por el contrario, los organoides obtenidos usando los métodos de la presente invención presentan adhesión intercelular y un epitelio continuo. En algunos casos, la adhesión intercelular es fuerte.

Por consiguiente, la divulgación proporciona un organoide de mama que tiene una estructura similar a un quiste. En algunos casos, la estructura similar a un quiste comprende una luz central. En algunos casos, la luz central de la estructura similar a un quiste no comprende ninguna célula. En otros casos, la luz central de la estructura similar a un quiste comprende células madre epiteliales de mama, opcionalmente en donde la luz central está llena de células madre epiteliales de mama. La divulgación proporciona además un organoide de mama que tiene una morfología similar a un racimo de uvas. La divulgación proporciona además una célula madre epitelial de mama, una población de células madre epiteliales de mama o un organoide de mama que se ha cultivado o puede cultivarse durante más de 3 pases. La divulgación proporciona además un medio de cultivo que comprende un ligando de ErbB3/4 combinado con un agonista de Lgr5 y/o un ligando de FGFR2b.

Los organoides de la divulgación, que pueden obtenerse mediante la expansión de células madre, proporcionan una población de células que se asemeja a sus contrapartes in vivo.

En algunos casos, un organoide comprende por lo menos una célula madre epitelial. El término "célula madre" se refiere preferiblemente a una célula que puede dividirse y producir células madre epiteliales adicionales o puede generar progenie diferenciada, por ejemplo, células progenitoras, que pueden dividirse y diferenciarse adicionalmente en uno o más tipos de células. Sin embargo, en algunos casos, el término "célula madre" y "célula progenitora" pueden usarse indistintamente. En algunos casos, una célula progenitora puede desdiferenciarse en una célula madre y, por lo tanto, cultivar una célula progenitora en el medio de cultivo de la invención puede dar como resultado que la célula progenitora se desdiferencie en una célula madre. Por ejemplo, debe entenderse que en un organoide preferido, la mayoría de las células son células en expansión (es decir, células en división) que retienen un fenotipo indiferenciado. Aunque puede producirse alguna diferenciación espontánea, la población celular

es generalmente una población en expansión. Las células madre epiteliales usadas en la divulgación son preferiblemente células madre adultas específicas de órganos multipotentes, oligopotentes o unipotentes. Las células madre no son células madre totipotentes. En algunos casos, las células madre no son células madre pluripotentes. Los organoides también tienen una estructura distintiva que surge de estas propiedades celulares, como se describe con detalle a continuación.

Puede usarse análisis de imágenes para evaluar las características de las células en cultivo, como la morfología celular; estructuras celulares; evidencia de apoptosis o lisis celular; y composición y estructura de organoides. Muchos tipos de análisis de imagenología son bien conocidos en la técnica, como microscopía electrónica, microscopía confocal, estereomicroscopía, microscopía de fluorescencia. El análisis histológico puede revelar la arquitectura básica y los tipos de células.

Un organoide de la divulgación tiene preferiblemente una estructura tridimensional, es decir, el organoide es preferiblemente un organoide tridimensional. En un caso preferido, el organoide comprende solo células epiteliales, es decir, las células no epiteliales están ausentes del organoide. Esto se debe a que el medio de cultivo de la divulgación está diseñado específicamente para expandir células madre epiteliales, por ejemplo, células madre epiteliales Lgr5+. Por lo tanto, incluso si otros tipos de células se revelan transitoriamente en el medio de cultivo, por ejemplo, en el fragmento de tejido que es el material de partida de la divulgación, es poco probable que estas células sobrevivan y, en cambio, serán reemplazadas por la expansión a más largo plazo de las células madre que generar una población pura de células epiteliales.

En algunos casos, las células epiteliales rodean una luz. En algunos casos, las células epiteliales que rodean la luz están polarizadas (lo que significa que las proteínas se expresan diferencialmente en el lado apical o basolateral de la célula epitelial). En algunos casos, los organoides comprenden células madre que pueden dividirse activamente y que preferiblemente pueden diferenciarse a todos los linajes celulares diferenciados principales presentes en el tejido in vivo correspondiente.

En algunos casos, los organoides de la divulgación tienen una sección que está formada por múltiples capas. En algunos casos, los organoides de la divulgación tienen una sección monocapa que parece estar formada por múltiples capas a las que se hace referencia en la presente como regiones de células "pseudoestratificadas". En algunos casos, la monocapa de células pseudoestratificadas se pliega de tal manera que encierra las luces entre los pliegues.

En algunos casos, los organoides de la divulgación comprenden monocapas individuales que se pliegan (o invaginan) para formar dos o más capas. A veces puede resultar difícil distinguir entre monocapas plegadas (o invaginadas) y regiones de células estratificadas. En algunos casos, un organoide comprende tanto regiones de células estratificadas como regiones de monocapas plegadas. En algunos casos, los organoides de la divulgación tienen una sección que está formada por múltiples capas y una sección que comprende una única monocapa de células. En algunos casos, los organoides de la divulgación comprenden o consisten de una única monocapa de células.

En algunos casos, los organoides de la divulgación comprenden o consisten de células epiteliales. En algunos casos, los organoides comprenden o consisten de una única capa de células epiteliales. En algunos casos, las células no epiteliales están ausentes de los organoides.

En las figuras acompañantes se dan ejemplos ilustrativos de organoides generados de acuerdo con la divulgación. En un caso, un organoide de la divulgación tiene una estructura esencialmente como se presenta en la Figura 2 (por ejemplo, en algunos casos, un organoide normal tiene una estructura esencialmente como se presenta para las líneas de organoide W894N o R1100N en la Figura 2B o un organoide de cáncer tiene una estructura esencialmente como se presenta para las líneas de organoides W1007T, W1012T o W859T en la Figura 2A) o en la Figura 6. En un caso, un organoide de la divulgación presenta tinción celular esencialmente como se presenta en la Figura 5 o la Figura 6.

En algunos casos, los organoides son principalmente estructuras quísticas con pocas estructuras en gemación. En algunos casos, los organoides generados de acuerdo con la divulgación no tienen estructuras de gemación. Las estructuras quísticas comprenden principalmente monocapas, pero pueden estar presentes algunas regiones de células estratificadas.

Por "quístico" se entiende que el organoide es aproximadamente esférico. Por "gemación" se entiende que el organoide tiene múltiples regiones que crecen fuera de la estructura básica.

En las condiciones de cultivo mejoradas de la divulgación, los organoides de mama mostraban estructuras organoides quísticas, en lugar de las estructuras en gemación observadas en condiciones de cultivo previas.

La divulgación también proporciona un organoide, preferiblemente obtenible mediante los métodos de la

invención, que es un organoide tridimensional que comprende células epiteliales que rodean una luz central.

En algunos casos, dicho organoide comprende una única capa de células. En otros casos, dicho organoide comprende un epitelio multicapa.

En algunos casos, el organoide se obtiene a partir de tejido de mama normal y tiene una estructura quística. En algunos casos, dicho organoide normal comprende una monocapa de células basales y luminales que rodean una luz central.

En algunos casos, el organoide se obtiene a partir de tejido mamario canceroso y tiene una estructura quística. En algunos casos, dicho organoide comprende: (i) una luz central, múltiples luces pequeñas o ninguna luz y/o (ii) una monocapa de células epiteliales o un epitelio multicapa. Por tanto, en algunos casos, el organoide de cáncer de mama de la divulgación comprende una monocapa de células epiteliales que rodean una luz. En otros casos, el organoide de cáncer de mama comprende un epitelio multicapa y múltiples luces pequeñas. En casos adicionales, el organoide de cáncer de mama comprende un epitelio multicapa y no tiene luz. Los organoides de cáncer de mama comprenden opcionalmente bolas sólidas de células tumorales.

El estado tumoral de las células cancerosas o de los organoides cancerosos puede confirmarse usando cualquier método adecuado. Por ejemplo, puede realizarse el cariotipado de células u organoides para evaluar si hay aneuploidía, lo que sugeriría que las células u organoides son células tumorales u organoides tumorales.

Las células tumorales o los organoides cancerosos también pueden identificarse añadiendo un agente estabilizador de p53 al medio de cultivo. Las células tumorales y los organoides cancerosos contienen comúnmente mutaciones de p53 que dan como resultado agentes estabilizadores de p53 que no tienen ningún efecto sobre la degradación de p53. Por tanto, las células tumorales, a diferencia de las células normales, pueden a menudo escapar de la senescencia desencadenada por la adición de un agente estabilizador de p53 (por ejemplo, Nutlin-3) a un medio de cultivo.

En algunos casos, los organoides de cáncer de mama se tiñen positivamente para marcadores de células luminales, por ejemplo, queratina-8 (Krt-8), y se tiñen negativamente para marcadores de células basales, por ejemplo queratina-14 (Krt-14) o queratina-5 (Krt-5). Por tanto, en algunos casos, el organoide de cáncer de mama comprende células luminales pero no comprende células basales. En algunos casos, los organoides de cáncer de mama expresan KRT-8 a niveles que son comparables a los observados en el tejido de mama normal o en los organoides de mama no cancerosos. En algunos casos, los organoides de cáncer de mama expresan KRT-5 y/o KRT-14 a niveles que están reducidos en comparación con los observados en el tejido de mama normal o en los organoides de mama no cancerosos.

Los organoides de cáncer de mama de la divulgación pueden expresar niveles de CDH1 que están reducidos en comparación con los observados en el tejido de mama normal o en los organoides de mama no cancerosos. Los marcadores de transición epitelial a mesenquimatoso (por ejemplo, VIM, ZEB1) pueden expresarse más en los organoides de cáncer de mama en comparación con el tejido de mama normal o los organoides de mama no cancerosos. Los organoides de cáncer de mama pueden mostrar un nivel reducido de expresión de E-cadherina en comparación con el tejido mamario normal o los organoides de mama no cancerosos.

Los organoides de cáncer de mama de la divulgación pueden expresar otros marcadores de células de cáncer de mama como antígeno de membrana epitelial, antígeno de cáncer 15-3 (CA 15-3), antígeno de cáncer 27.29 (CA 27.29), antígeno carcinoembrionario (CEA), activador de plasminógeno de uroquinasa (uPA), inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-1), podocalyxina, EZH2 y/o caliceína-10.

Se proporciona un organoide o una población de células madre epiteliales que se ha cultivado en el medio de cultivo de la divulgación durante por lo menos 2 meses, por ejemplo, por lo menos 10 semanas, por lo menos 12 semanas, por lo menos 14 semanas, por lo menos 16 semanas, por lo menos 4 meses, por lo menos 5 meses, por lo menos 6 meses, por lo menos 9 meses, por lo menos un año. Preferiblemente, las células son células humanas. Preferiblemente, las células se han pasado aproximadamente cada 1 a 4 semanas.

También se proporciona un organoide o una población de células madre epiteliales que han sido pasadas o que pueden ser pasadas por más de 3 pases, más de 4 pases, más de 5 pases, más de 6 pases, más de 7 pases, más de 8 pases, más de 9 pases, más de 10 pases, más de 11 pases, más de 12 pases, más de 13 pases o más de 14 pases.

Ventajosamente, el uso de un ligando de ErbB3/4 permite cultivar las células mamarias y los organoides a largo plazo. No es posible cultivar y expandir células madre epiteliales de mama u organoides de mama humanos durante dos meses o más en el medio de cultivo descrito en Pasic et al., la WO2012/014076 o la WO2012/168930, en donde las células u organoides se pasan por lo menos tres veces. Por tanto, tales organoides de mama o poblaciones de células madre epiteliales de mama que se habían cultivado a largo plazo no existían antes de la

presente divulgación. Por consiguiente, se proporciona un organoide o una población de células madre que ha sido cultivada/pasada o que es capaz de ser cultivada/pasada como se describe en la presente.

5 Dentro del contexto de la divulgación, un fragmento de tejido es parte de un tejido adulto, preferiblemente un tejido adulto humano, como parte de una mama humana. El tejido puede ser tejido normal (sano) o puede ser tejido enfermo o infectado. Preferiblemente, un organoide como se identifica en la presente no es por lo tanto un fragmento de tejido. Un organoide se obtiene preferiblemente usando una célula de un tejido adulto, preferiblemente una célula madre epitelial de un tejido adulto, opcionalmente de un fragmento de tejido adulto. En algunos casos, un organoide se obtiene usando una célula madre epitelial de un tejido adulto o un fragmento de tejido adulto que expresa Lgr5. Por lo tanto, dentro del contexto de esta divulgación, en algunos casos un fragmento de tejido comprende células madre Lgr5+.

15 En un caso, un organoide es un organoide que todavía se está cultivando usando un método de la invención (usando un medio de cultivo de la invención) y, por lo tanto, está en contacto con una matriz extracelular. Preferiblemente, un organoide está incrustado en una matriz extracelular no mesenquimatosa. Dentro del contexto de la divulgación, "en contacto" significa un contacto físico o mecánico o químico, lo que significa que para separar dicho organoide de dicha matriz extracelular es necesario usar una fuerza. En algunos casos, la matriz extracelular es una mezcla de proteínas gelatinosas secretadas por células de sarcoma de ratón de Engelbreth-Holm-Swarm (EHS), como Matrigel (BD Biosciences) o extracto de membrana basal Cultrex® (Trevigen, Inc.). Por consiguiente, el medio de cultivo de la invención puede comprender además opcionalmente una población de células de la divulgación y/o uno o más organoides de la divulgación.

20 La divulgación proporciona una composición que comprende un organoide o célula de la divulgación, una matriz extracelular y un medio de cultivo, preferiblemente un medio de cultivo de la divulgación.

25 **Usos de organoides**

Hay un interés en los medios y los métodos de cultivo para cultivar células madre para la formación, mantenimiento y expansión de organoides, como organoides de mama. Un organoide comprende células madre, como las células madre epiteliales, que conservan su fenotipo no diferenciado y sus propiedades de autorrenovación, pero también tienen una progenie diferenciadora que crece en estructuras similares a los tejidos. De manera similar a las poblaciones de células relacionadas o idénticas, los organoides mamarios, que imitan más de cerca la fisiología básica del tejido mamario, pueden usarse en ensayos de toxicidad o ensayos de fármacos. También pueden ser útiles para cultivar patógenos que actualmente carecen de cultivos de tejidos o modelos animales adecuados. Además, tales organoides pueden ser útiles en medicina regenerativa, por ejemplo en la reparación de la mama después de la radiación y/o después de la cirugía.

40 Está claro que hay muchas aplicaciones clínicas y de investigación para las células madre y su progenie diferenciada. Para todas estas aplicaciones, los métodos de cultivo reproducibles son de suma importancia para proporcionar un número adecuado de células de calidad adecuada. Por ejemplo, para una selección de fármacos eficaz, las condiciones deben controlarse cuidadosamente requiriendo métodos de cultivo precisos para controlar la diferenciación y la proliferación de células, de tal manera que puedan generarse poblaciones puras de células fenotípicamente y cariotípicamente idénticas. De manera similar, para las terapias basadas en células, en las que las células cultivadas pueden proporcionarse directamente a los pacientes, las células deben ser genéticamente y fenotípicamente sanas para evitar respuestas inmunitarias indeseables o destinos celulares cuando se proporcionen al paciente.

50 La divulgación proporciona el uso de un organoide o población expandida de células de la divulgación para su uso en medicina. Por consiguiente, la divulgación proporciona el uso de un organoide o una población expandida de células de la divulgación para su uso en el tratamiento de un trastorno, afección o enfermedad. La divulgación proporciona el uso de un organoide o una población expandida de células de la divulgación para su uso en la selección de fármacos, la validación del objetivo (fármaco), el descubrimiento del objetivo (fármaco), toxicología y pruebas de toxicología, medicina personalizada, medicina regenerativa y/o modelos ex vivo de células/órganos, como modelos de enfermedades.

55 Se piensa que las células y los organoides cultivados de acuerdo con los medios y métodos de la invención representan fielmente la situación in vivo. Esto es cierto tanto para poblaciones expandidas de células y organoides que crecen a partir de tejido normal como para poblaciones expandidas de células y organoides que crecen a partir de tejido enfermo. Por lo tanto, además de proporcionar modelos ex vivo de células/órganos normales, los organoides o la población expandida de células de la divulgación pueden usarse como modelos de enfermedades ex vivo.

60 Los organoides de la divulgación también pueden usarse para cultivar un patógeno y, por tanto, pueden usarse como modelos de infección ex vivo. Los ejemplos de patógenos que pueden cultivarse usando un organoide de la divulgación incluyen virus, bacterias, priones u hongos que provocan enfermedades en su huésped animal. Por

tanto, un organoide de la divulgación puede usarse como modelo de enfermedad que representa un estado infectado. En algunas realizaciones de la divulgación, los organoides pueden usarse en el desarrollo y/o producción de vacunas.

5 Las enfermedades que pueden ser estudiadas por los organoides de la divulgación incluyen, por tanto, enfermedades genéticas, enfermedades metabólicas, enfermedades patógenas, enfermedades inflamatorias, etc., que incluyen, por ejemplo, pero no se limitan a: cáncer de mama, adenoma, ectasia del conducto mamario, cambios fibroquísticos (por ejemplo, adenosis, metaplasia, displasia, hiperplasia, lesiones ductales, lesiones lobulillares, papilomas), mastitis, sífilis de la mama, tuberculosis de la mama y actinomicosis de la mama.

10 Tradicionalmente, las líneas celulares y, más recientemente, las células iPS se han usado como modelos de células/órganos y/o enfermedades ex vivo (por ejemplo, ver Robinton et al. Nature 481, 295, 2012). Sin embargo, estos métodos adolecen de una serie de desafíos y desventajas. Por ejemplo, las líneas celulares no pueden obtenerse de todos los pacientes (solo ciertas biopsias dan como resultado líneas celulares con éxito) y, por lo tanto, las líneas celulares no pueden usarse en diagnósticos y medicinas personalizadas. Las células iPS habitualmente requieren algún nivel de manipulación genética para reprogramar las células en destinos celulares específicos. Alternativamente, están sujetas a condiciones de cultivo que afectan a la integridad carotípica y, por tanto, el tiempo de cultivo debe mantenerse al mínimo (este también es el caso de las células madre embrionarias humanas). Esto significa que las células iPS no pueden representar con precisión la situación in vivo, sino que son un intento de imitar el comportamiento de las células in vivo. Las líneas celulares y las células iPS también sufren de inestabilidad genética.

25 Por el contrario, los organoides de la divulgación proporcionan una plataforma genéticamente estable que representa fielmente la situación in vivo. Los organoides de la divulgación también pueden expandirse de manera continua, proporcionando una buena fuente de células genéticamente estables. En particular, una población en expansión puede "dividirse", lo que significa que el organoide se divide y todas las células del organoide se dividen en nuevas placas o matraces de cultivo. Las células divididas se eliminan del organoide y luego ellas mismas pueden cultivarse y expandirse para producir nuevos organoides que contienen poblaciones más expandidas que luego pueden dividirse de nuevo. A las divisiones también se hace referencia en la presente como "pases". Un organoide de la divulgación puede cultivarse durante 1 o más pases, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30 o más pases, por ejemplo, 20-30 pases, 30-35 pases, 32-40 pases o más. En algunos casos, una población de células en expansión u organoide se divide de cada 3 días a cada 10 semanas, cada 1 a 10 semanas, cada 1 a 4 semanas o cada 10 días a 3 semanas. En algunos casos, los organoides se pasan aproximadamente de cada 10 días a 3 semanas. Por tanto, los organoides de la divulgación pueden proporcionar una fuente continua de material celular genéticamente estable. Por tanto, los organoides de la divulgación pueden usarse para obtener una visión mecanicista de una variedad de enfermedades y agentes terapéuticos, para llevar a cabo una selección de fármacos in vitro, para evaluar agentes terapéuticos potenciales, para identificar posibles objetivos (por ejemplo, proteínas) para el desarrollo futuro de nuevas terapias (fármacos) y/o explorar la reparación de genes junto con la terapia de reemplazo celular.

40 Por estas razones, los organoides o las poblaciones expandidas de células de la divulgación pueden ser una herramienta para la selección de fármacos, la validación de objetivos, el descubrimiento de objetivos, la toxicología y los cribados de toxicología y la medicina personalizada.

#### 45 **Selección de fármacos**

50 Preferiblemente, para propósitos de alto rendimiento, dicha población de células madre expandida u organoide de la divulgación se cultiva en placas de múltiples pocillos como, por ejemplo, placas de 96 pocillos o placas de 384 pocillos. Se usan bibliotecas de moléculas para identificar una molécula que afecta a dichos organoides. Las bibliotecas preferidas comprenden bibliotecas de fragmentos de anticuerpos, bibliotecas de presentación en fagos de péptidos, 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, pueden usarse bibliotecas genéticas que induzcan o repriman la expresión de uno o más genes en la progenie de las células madre. Estas bibliotecas genéticas comprenden bibliotecas de ADNc, bibliotecas antisentido y ARNip u otras bibliotecas de ARN no codificantes. Las células se exponen preferiblemente a múltiples concentraciones 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, incluyendo pero no limitado a, una reducción o pérdida de la proliferación, un cambio morfológico y muerte celular. Dicha población de células madre expandida u organoide de la divulgación también puede usarse para identificar fármacos que se dirigen específicamente a las células de cáncer de mama, por ejemplo, las células de cáncer de mama o los organoides de cáncer de mama de la divulgación, pero no las células de mama normales, por ejemplo, no dicha población de células madre expandida normales u organoide normal de la divulgación. Por supuesto, no es necesario que la selección de fármacos sea siempre de alto rendimiento y los organoides y las células de la divulgación también pueden ser útiles para probar candidatos de fármacos individuales.

Los organoides también son útiles para propósitos más amplios de descubrimiento de fármacos. El experto en la técnica entenderá que los organoides de la divulgación serían ampliamente aplicables como herramientas de selección de fármacos para patologías infecciosas, inflamatorias y neoplásicas de la mama humana y otras enfermedades de la mama. En algunos casos, los organoides de la divulgación podrían usarse para la selección de fármacos contra el cáncer.

En algunos casos, las poblaciones de células expandidas, por ejemplo, los organoides de la divulgación u organoides obtenidos usando medios y métodos de la invención pueden usarse para probar bibliotecas de sustancias químicas, anticuerpos, productos naturales (extractos de plantas), etc. o fármacos conocidos específicos por su idoneidad para su uso como fármacos, cosméticos y/o medicinas preventivos. Por ejemplo, en algunos casos, una biopsia celular de un paciente de interés, como las células tumorales de un paciente con cáncer, puede cultivarse usando medios de cultivo y métodos de la invención y luego tratarse con un compuesto químico o una biblioteca química o uno o más fármacos de interés. Entonces es posible determinar qué compuestos modifican, matan y/o tratan eficazmente las células del paciente. Esto permite probar la respuesta de un paciente específico a un fármaco en particular, lo que permite que el tratamiento se adapte a un paciente específico. Por lo tanto, esto permite un enfoque de medicina personalizado. La ventaja adicional de usar los organoides para identificar fármacos de esta manera es que también es posible seleccionar organoides normales (organoides derivados de tejido sano) para comprobar qué fármacos y compuestos tienen un efecto mínimo sobre el tejido sano. Esto permite la selección de fármacos con una actividad mínima fuera del objetivo o con efectos secundarios no deseados.

De esta manera pueden detectarse fármacos para varias enfermedades. Por ejemplo, los organoides de la divulgación pueden usarse para la selección de fármacos para cáncer de mama, adenoma, ectasia del conducto mamario, cambios fibroquísticos (por ejemplo, adenosis, metaplasia, displasia, hiperplasia, lesiones ductales, lesiones lobulillares, papilomas), mastitis, sífilis de la mama, tuberculosis de la mama y actinomicosis de la mama.

Los parámetros de prueba dependen de la enfermedad de interés. Por ejemplo, cuando se realizan pruebas de selección de fármacos contra el cáncer, la muerte de las células cancerosas suele ser el objetivo final. En otros casos, se puede evaluar la expresión génica o metabólica para estudiar los efectos de los compuestos y fármacos de la selección sobre las células u organoides de interés.

Por lo tanto, la divulgación proporciona un método para la selección de un fármaco terapéutico o profiláctico, en donde el método comprende:

cultivar una población de células expandida (por ejemplo, un organoide) de la divulgación, por ejemplo con un medio de cultivo de la invención;

exponer dicha población de células expandida (por ejemplo, un organoide) de la divulgación a una o una biblioteca de moléculas candidatas;

evaluar dichas poblaciones de células expandidas (por ejemplo, organoides) para detectar cualquier efecto, por ejemplo, cualquier cambio en la célula, como una reducción o pérdida de la proliferación, un cambio morfológico y/o muerte celular;

identificar la molécula candidata que provoca dichos efectos como fármaco potencial.

En algunos casos, se emplean métodos de recopilación de datos y cultivo asistidos por ordenador o robot para aumentar el rendimiento de la selección.

En algunos casos, la población de células expandida (por ejemplo, un organoide) se obtiene a partir de una biopsia de un paciente. En algunos casos, la molécula candidata que provoca un efecto deseado sobre la población de células expandida cultivada (por ejemplo, un organoide) se administra a dicho paciente.

Por consiguiente, en un aspecto, se proporciona un método para tratar a un paciente que comprende:

- (a) obtener una biopsia del tejido enfermo de interés en el paciente;
- (b) seleccionar un fármaco adecuado usando un método de selección de la divulgación, por ejemplo:

cultivar una población de células expandida (por ejemplo, un organoide) de la divulgación con un medio de cultivo de la divulgación;

exponer dicha población de células expandida (por ejemplo, un organoide) de la divulgación a una biblioteca de fármacos conocidos;

evaluar dichas poblaciones de células expandidas (por ejemplo, organoides) para detectar cualquier efecto, por ejemplo, cualquier cambio en la célula, como una reducción o pérdida de la proliferación, un cambio morfológico y/o muerte celular;

identificar la molécula candidata que provoca dichos efectos como un fármaco adecuado; y

(c) tratar a dicho paciente con el fármaco obtenido en el paso (b).

Por ejemplo, la divulgación proporciona un método para tratar el cáncer de mama en un paciente, que comprende probar la capacidad de respuesta del paciente a uno o más fármacos de interés usando un método de selección de fármacos de la divulgación y luego tratar a un paciente con el fármaco si se descubre que el paciente es sensible al fármaco.

De manera similar, se proporciona un fármaco contra el cáncer de mama para su uso en el tratamiento de un paciente con cáncer de mama, en donde dicho tratamiento comprende probar la capacidad de respuesta del paciente al fármaco usando un método de selección de fármacos de la divulgación y tratar al paciente con el fármaco si se descubre que el paciente responde al fármaco.

Ejemplos de fármacos para su uso en la divulgación que pueden probarse usando un enfoque de medicina personalizada como se ha indicado anteriormente incluyen abitrexato (metotrexato), abraxane (formulación de nanopartículas estabilizadas con albúmina de paclitaxel), ado-trastuzumab emtansina, adriamicina PFS (clorhidrato de doxorubicina), adriamicina RDF (clorhidrato de doxorubicina), adrucil (fluorouracilo), afinitor (everolimus), anastrozol, aredia (pamidronato disódico), arimidex (anastrozol), aromasina (exemestano), capecitabina, clafen (ciclofosfamida), ciclofosfamida, citoxano (ciclofosfamida), docetaxel clorhidrato de doxorubicina, Efudex (fluorouracilo), Ellence (clorhidrato de epirubicina), clorhidrato de epirubicina, Everolimus, Exemestano, Fareston (Toremifeno), Faslodex (Fulvestrant), Femara (Letrozol), Fluoroplex (fluorouracilo), fluorouracilo, Folex (Metotrexato), Folex PFS (metotrexato), fulvestrant, clorhidrato de gemcitabina, Gemzar (clorhidrato de gemcitabina), acetato de goserelina, Herceptin (Trastuzumab), Ixabepilona, Ixempra (Ixabepilona), Kadcyla (Ado-Trastuzumab Emtansina), ditosilato de Lapatinib, letrozol, Megace (acetato de Megestrol), acetato de Megestrol, metotrexato, metotrexato LPF (metotrexato), mexato (metotrexato), mexato-AQ (metotrexato), Neosar (ciclofosfamida), Nolvadex (citrato de tamoxifeno), Novaldex (citrato de tamoxifeno), Paclitaxel, formulación de nanopartículas estabilizada con albúmina de Paclitaxel, pamidronato disódico, Perjeta (Pertuzumab), Pertuzumab, citrato de Tamoxifeno, Taxol (Paclitaxel), Taxotere (Docetaxel), Trastuzumab, Toremifeno, Tykerb (Lapatinib Ditosilato), Xeloda (Capecitabina) y Zoladex (Acetato de Goserelina).

Los fármacos para su uso en la divulgación que pueden probarse usando un enfoque de medicina personalizada pueden probarse solos o en combinación con uno o más de otros fármacos.

Por ejemplo, (a) el clorhidrato de doxorubicina, adriamicina PFS (clorhidrato de doxorubicina) o adriamicina RDF (clorhidrato de doxorubicina) pueden probarse en combinación con (b) ciclofosfamida, Clafen (ciclofosfamida), citoxano (ciclofosfamida) o Neosar (ciclofosfamida) y, opcionalmente, en combinación adicional con (c) (i) Paclitaxel, formulación de nanopartículas estabilizadas con albúmina de paclitaxel, Abraxane (formulación de nanopartículas estabilizadas con albúmina de paclitaxel) o Taxol (Paclitaxel), (c) (ii) fluorouracilo, Aducil (fluorouracilo), Efudex (fluorouracilo) o Fluoroplex (fluorouracilo) o (c) (iii) Docetaxel o Taxotere (Docetaxel). Por tanto, las combinaciones de fármacos AC, AC-T, CAF y TAC pueden probarse usando un enfoque de medicina personalizada de acuerdo con la divulgación.

Por ejemplo, (a) ciclofosfamida, clafen (ciclofosfamida), Citoxano (ciclofosfamida) o Neosar (ciclofosfamida) pueden probarse en combinación con (b) fluorouracilo, Aducil (fluorouracilo), Efudex (fluorouracilo) o Fluoroplex (fluorouracilo) y (c)(i) Metotrexato, Abitrexato (Metotrexato), Folex (Metotrexato), Folex PFS (Metotrexato), Metotrexato LPF (Metotrexato), Mexato (Metotrexato) o Mexato-AQ (Metotrexato) o (c)(ii) clorhidrato de epirubicina o Ellence (clorhidrato de epirubicina). Por tanto, las combinaciones de fármacos CMF y FEC pueden probarse usando un enfoque de medicina personalizada de acuerdo con la divulgación.

En algunos casos, el fármaco se usa para tratar, prevenir o mejorar los síntomas de enfermedades genéticas, enfermedades metabólicas, enfermedades patógenas, enfermedades inflamatorias, etc., que incluyen por ejemplo, pero no se limitan a: cáncer de mama, adenoma, ectasia del conducto mamario, cambios fibroquísticos (por ejemplo, adenosis, metaplasia, displasia, hiperplasia, lesiones ductales, lesiones lobulillares, papilomas), mastitis, sífilis de la mama, tuberculosis de la mama y actinomicosis de la mama.

### Descubrimiento de objetivo

En algunos casos, los organoides de la divulgación o las células cultivadas usando los medios de cultivo y los métodos de la divulgación pueden usarse para el descubrimiento de objetivos. Las células de los organoides que se originan a partir de tejido sano o enfermo pueden usarse para la identificación de objetivos. Los organoides de la divulgación pueden usarse para el descubrimiento de objetivos farmacológicos para: cáncer de mama, adenoma, ectasia del conducto mamario, cambios fibroquísticos (por ejemplo, adenosis, metaplasia, displasia, hiperplasia, lesiones ductales, lesiones lobulillares, papilomas), mastitis, sífilis de la mama, tuberculosis de la mama y actinomicosis de mama.

Se cree que las células y los organoides cultivados de acuerdo con los medios y métodos de la invención representan fielmente la situación in vivo. Por esta razón, pueden ser una herramienta para encontrar nuevos objetivos (moleculares) en enfermedades específicas.

5 Para buscar un nuevo objetivo farmacológico puede usarse una biblioteca de compuestos (como ARNip) para transducir las células e inactivar genes específicos. En algunos casos, las células se transducen con ARNip para inhibir la función de un grupo (grande) de genes. Puede usarse cualquier lectura funcional del grupo de genes o función celular específica para determinar si un objetivo es relevante para el estudio. Puede determinarse una lectura específica de la enfermedad usando ensayos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, se analiza la proliferación celular para detectar genes implicados en el cáncer. Por ejemplo, un ensayo Topflash como se describe en la presente, puede usarse para detectar cambios en la actividad de Wnt provocados por la inhibición del ARNip. Cuando se produce la reducción del crecimiento o la muerte celular, los genes relacionados con el ARNip correspondientes pueden identificarse mediante métodos conocidos en la técnica. Estos genes son posibles objetivos para inhibir el crecimiento de estas células. Tras la identificación, la especificidad del objetivo identificado para el proceso celular que se estudió deberá determinarse mediante métodos bien conocidos en la técnica. Usando estos métodos, pueden identificarse nuevas moléculas como posibles objetivos farmacológicos para terapia.

### Selecciones de validación de fármacos y objetivos

20 Los organoides específicos del paciente obtenidos de tejido enfermo y/o normal pueden usarse para la validación de moléculas identificadas en selecciones de alto rendimiento. Lo mismo ocurre con la validación de compuestos que se identificaron como posibles fármacos terapéuticos en selecciones de alto rendimiento. El uso de material de paciente primario expandido en el sistema de cultivo de organoides puede ser útil para probar falsos positivos, etc. a partir de estudios de líneas celulares de descubrimiento de fármacos de alto rendimiento.

25 En algunos casos, la población de células madre expandida (por ejemplo, el organoide de la divulgación) puede usarse para la validación de compuestos que se han identificado como posibles fármacos o cosméticos en una selección de alto rendimiento.

### 30 Ensayo de toxicidad

Dicha población de células madre expandida (por ejemplo, el organoide de la divulgación) puede reemplazar adicionalmente el uso de líneas celulares en ensayos de toxicidad de nuevos fármacos potenciales o de fármacos conocidos. Preferiblemente, se usan células u organoides normales para estos casos. Sin embargo, también se prevé que puedan usarse células cancerosas u organoides.

40 Las selecciones de toxicología funcionan de manera similar a las selecciones de fármacos (como se ha descrito anteriormente) pero prueban los efectos tóxicos de los fármacos y no los efectos terapéuticos. Por lo tanto, en algunos casos, los efectos de los compuestos candidatos son tóxicos.

### Cultivo de patógenos

45 Además, dicha población de células madre expandida (por ejemplo, el organoide de la divulgación) puede usarse para el cultivo de un patógeno como el virus del tumor mamario del ratón (MMTV), el virus del tumor mamario humano (HMTV), el virus de Epstein Barr (EBV), virus del papiloma humano de alto riesgo (VPH), *Mycobacterium tuberculosis*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* o *Streptococcus agalactiae*.

### 50 Monitorización de terapia e identificación de las causas de resistencia a los fármacos

55 Además, dicha población de células madre expandida (por ejemplo, el organoide de la divulgación) puede usarse para monitorizar la progresión de una enfermedad en la población de células madre expandida junto con la monitorización de la progresión de una enfermedad en un paciente. Por tanto, por ejemplo, podría obtenerse una población expandida de células madre de cáncer de mama de un paciente con cáncer de mama, el paciente podría tratarse con un determinado fármaco o combinación de fármacos, y si el paciente desarrolla resistencia al fármaco o combinación de fármacos entonces podría obtenerse del paciente una segunda población expandida de células madre de cáncer de mama y compararla con la primera población de células madre de cáncer de mama, para identificar las causas de la resistencia a los fármacos y una terapia adecuada.

60 Por consiguiente, dicha población de células madre expandida (por ejemplo, el organoide de la divulgación) puede usarse para identificar las causas de la resistencia a los fármacos. Así, por ejemplo, podría obtenerse una población expandida de células madre de cáncer de mama de un paciente con cáncer de mama, el paciente podría tratarse luego con un determinado fármaco o combinación de fármacos, y si el paciente desarrolla resistencia al fármaco o combinación de fármacos entonces podría obtenerse del paciente una segunda población expandida de células madre de cáncer de mama y compararla con la primera población de células madre de cáncer de mama para

65

identificar las causas de la resistencia a los fármacos.

Las causas de la resistencia a los fármacos pueden identificarse identificando cambios genéticos en la población resistente de células madre en comparación con la población de células madre que responde al tratamiento con el fármaco.

### Medicina regenerativa y trasplante

Los cultivos que comprenden la población expandida de células madre (por ejemplo, el organoide de la divulgación) son útiles en la medicina regenerativa, por ejemplo, en la reparación posradiación y/o posquirúrgica del tejido mamario, por ejemplo, después de la mastectomía, o en la reparación tisular de tejido mamario lesionado. Por ejemplo, pueden obtenerse células madre epiteliales de mama con mutaciones de BRCA de un paciente con cáncer, las mutaciones de BRCA pueden repararse, dando como resultado la generación de células madre epiteliales de mama autólogas, que luego pueden trasplantarse de nuevo al paciente con cáncer.

En un caso alternativo, las células madre epiteliales expandidas se reprograman en destinos de tejidos relacionados. Será evidente para una persona experta en la técnica que puede usarse adicionalmente terapia génica en un método dirigido a reparar tejido dañado o enfermo. Puede usarse, por ejemplo, un vehículo de administración de genes adenovirales o retrovirales para administrar información genética, como ADN y/o ARN a células madre. Un experto en la técnica puede reemplazar o reparar genes específicos dirigidos a la terapia génica. Por ejemplo, puede insertarse un gen normal en una localización 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. Un ejemplo adicional es la alteración de la regulación (el grado en que un gen se activa o desactiva) de un gen particular. Preferiblemente, las células madre se tratan *ex vivo* mediante un enfoque de terapia génica y posteriormente se transfieren al mamífero, preferiblemente a un humano con necesidad de tratamiento.

Como las pequeñas biopsias tomadas de donantes adultos pueden expandirse sin ningún límite aparente o daño genético, la tecnología puede servir para generar epitelio trasplantable con propósitos regenerativos. Además, en algunos casos, los organoides incrustados en, o en contacto con, una ECM pueden trasplantarse a un mamífero, preferiblemente a un humano. En otro caso, los organoides y ECM pueden trasplantarse simultáneamente a un mamífero, preferiblemente en un humano.

El experto en la técnica entenderá que puede usarse una ECM como un andamiaje 3D para obtener estructuras similares a tejidos que comprenden poblaciones expandidas de células u organoides de acuerdo con la divulgación. Luego tales estructuras pueden trasplantarse a un paciente mediante métodos bien conocidos en la técnica. Puede fabricarse un andamiaje de ECM sintéticamente usando proteínas de ECM, como colágeno y/o laminina, o alternativamente puede obtenerse un andamiaje de ECM "descelularizando" un órgano aislado o fragmento de tejido para dejar un andamiaje que consiste de la ECM (por ejemplo, ver Macchiarini et al. *The Lancet*, Volumen 372, Número 9655, Páginas 2023-2030, 2008). En algunos casos, puede obtenerse un andamiaje de ECM descelularizando un órgano o fragmento de tejido, en donde opcionalmente dicho órgano o fragmento de tejido es de la mama.

Como se ha mencionado anteriormente, la divulgación proporciona un organoide o una población de células de la divulgación para su uso en el trasplante en un mamífero, preferiblemente en un humano.

Ventajosamente, la divulgación permite tomar una biopsia pequeña de un donante adulto y expandirla sin ningún límite aparente o daño genético y, por lo tanto, la tecnología proporcionada en la presente puede servir para generar epitelio trasplantable con propósitos regenerativos.

El paciente es preferiblemente un humano, pero alternativamente puede ser un mamífero no humano, como un gato, un perro, un caballo, una vaca, un cerdo, una oveja, un conejo o un ratón.

Por tanto, se incluyen dentro del alcance de la divulgación los métodos de tratamiento de un paciente animal humano o no humano a través de la terapia celular. Tal terapia celular abarca la aplicación de las células madre u organoides de la divulgación al paciente a través de cualquier medio apropiado. Específicamente, tales métodos de tratamiento implican la regeneración de tejido dañado. De acuerdo con la divulgación, un paciente puede ser tratado con células madre u organoides alogénicos o autólogos. Las células "autólogas" son células que se originaron en el mismo organismo en el que se reintroducen para la terapia celular, por ejemplo, para permitir la regeneración de tejidos. Sin embargo, las células no se han aislado necesariamente del mismo tejido que el tejido en el que se introducen. Una célula autóloga no requiere compatibilidad con el paciente para superar los problemas de rechazo. Las células "alogénicas" son células que se originaron a partir de un individuo que es diferente del individuo en el que se introducen las células para 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 de pacientes para prevenir los problemas de rechazo.

5 Generalmente, las células u organoides de la divulgación se introducen en el cuerpo del paciente mediante inyección o implantación. Generalmente, las células se inyectarán directamente en el tejido en el que se pretende que actúen. Se incluyen dentro del alcance de la divulgación una jeringuilla que contiene células de la divulgación y un portador farmacéuticamente aceptable. Se incluyen dentro del alcance de la divulgación Un catéter unido a una jeringuilla que contiene células de la divulgación y un portador farmacéuticamente aceptable.

10 El experto en la técnica podrá seleccionar un método y una vía de administración apropiados dependiendo del material que se esté trasplantando (es decir, población de células, células individuales en suspensión celular, organoides o fragmentos de organoides).

15 Como se ha analizado anteriormente, las células de la divulgación pueden usarse en la regeneración de tejido. Para lograr esta función, las células pueden inyectarse o implantarse directamente en el tejido dañado, donde pueden multiplicarse y eventualmente diferenciarse en el tipo celular requerido. Alternativamente, el organoide puede inyectarse o implantarse directamente en el tejido dañado. Los tejidos mamarios que son susceptibles de tratamiento incluyen todos los tejidos dañados, particularmente incluyendo aquellos que pueden haber sido dañados por una enfermedad (por ejemplo, cáncer), lesión, trauma, una reacción autoinmune o por una infección viral o bacteriana. En algunos casos de la divulgación, las células u organoides de la divulgación se usan para regenerar la mama.

20 Por ejemplo, en una caso, las células u organoides de la divulgación se inyectan en un paciente usando una jeringuilla Hamilton. Por consiguiente, la divulgación proporciona una jeringuilla que comprende las células u organoides de la divulgación.

25 El experto en la técnica sabrá cuál será la dosificación apropiada de células u organoides de la divulgación para una afección particular a tratar.

30 En una caso, las células u organoides de la divulgación, ya sea en solución, en microesferas o en micropartículas de una variedad de composiciones, se administrarán en la arteria que irriga el tejido o la parte del órgano dañado que necesita regeneración. Generalmente, dicha administración se realizará usando un catéter. El catéter puede ser uno de la gran variedad de catéteres de balón usados para angioplastia y/o administración de células o un catéter diseñado con el propósito específico de llevar las células a un lugar particular del cuerpo. Para ciertos usos, las células u organoides pueden encapsularse en microesferas hechas de una serie de compuestos biodegradables diferentes y con un diámetro de aproximadamente 15  $\mu\text{m}$ . Este método puede permitir que las células u organoides administrados por vía intravascular permanezcan en el sitio del daño, y no atravesar la red capilar y entrar en la circulación sistémica en el primer pase. La retención en el lado arterial de la red capilar también puede facilitar su translocación al espacio extravascular.

40 En otro caso, las células u organoides de la divulgación pueden implantarse en el tejido dañado adherido a un implante biocompatible. En este caso, las células pueden adherirse al implante biocompatible in vitro, antes de la implantación en el paciente. Como resultará evidente para un experto en la técnica, puede usarse cualquiera de una serie de adherentes para adherir las células al implante, antes de la implantación. A modo de ejemplo solamente, tales adherentes pueden incluir fibrina, uno o más miembros de la familia de las integrinas, uno o más miembros de la familia de las cadherinas, uno o más miembros de la familia de las selectinas, una o más moléculas de adhesión celular (CAM), una o más de la familia de las inmunoglobulinas y uno o más adherentes artificiales. Esta lista se proporciona solo a modo de ilustración y no se pretende que sea limitativa. Será evidente para un experto en la técnica que puede usarse cualquier combinación de uno o más adherentes.

50 En otro caso, las células u organoides de la divulgación pueden incrustarse en una matriz, antes de la implantación de la matriz en el paciente. Generalmente, la matriz se implantará en el tejido dañado del paciente. Los ejemplos de matrices incluyen matrices basadas en colágeno, matrices basadas en fibrina, matrices basadas en laminina, matrices basadas en fibronectina y matrices artificiales. Esta lista se proporciona solo a modo de ilustración y no se pretende que sea limitativa.

55 En un caso adicional, las células u organoides de la divulgación pueden implantarse o inyectarse en el paciente junto con un componente formador de matriz. Esto puede permitir que las células formen una matriz después de la inyección o implantación, asegurando que las células u organoides permanezcan en la localización apropiada dentro del paciente. Ejemplos de componentes formadores de matriz incluyen alquilo líquido de pegamento de fibrina, monómeros de cianoacrilato, plastificantes, polisacáridos como dextrano, oligómeros que contienen óxido de etileno, copolímeros de bloque como poloxámero y Pluronic, surfactantes no iónicos como Tween y Triton '8', y componentes formadores de matrices artificiales. Esta lista se proporciona solo a modo de ilustración y no se pretende que sea limitativa. Será evidente para un experto en la técnica que puede usarse cualquier combinación de uno o más componentes formadores de matrices.

65 En un caso adicional, las células u organoides de la divulgación pueden estar contenidos dentro de una

microesfera. En este caso, las células pueden encapsularse dentro del centro de la microesfera. También dentro de este caso, las células pueden incrustarse en el material de matriz de la microesfera. El material de la matriz puede incluir cualquier polímero biodegradable adecuado, incluyendo pero no limitado a, alginatos, polietilenglicol (PLGA) y poliuretanos. Esta lista se proporciona solo a modo de ejemplo y no se pretende que sea limitativa.

5 En un caso adicional, las células u organoides de la divulgación pueden adherirse a un dispositivo médico destinado a la implantación. Ejemplos de tales dispositivos médicos incluyen suturas y piel artificial. Esta lista se proporciona solo a modo de ilustración y no se pretende que sea limitativa. Será evidente para un experto en la técnica que las células pueden adherirse al dispositivo médico mediante una variedad de métodos. Por ejemplo, las células u organoides pueden adherirse al dispositivo médico usando fibrina, uno o más miembros de la familia de las integrinas, uno o más miembros de la familia de las cadherinas, uno o más miembros de la familia de las selectinas, una o más moléculas de adhesión celular. (CAM), uno o más de la familia de las inmunoglobulinas y uno o más adherentes artificiales. Esta lista se proporciona a modo de ilustración solamente y no se pretende que sea limitativa. Será evidente par aun experto en la técnica que puede usarse cualquier combinación de uno o más adherentes.

#### 15 **Otros usos de los organoides de la divulgación**

Las células u organoides de la divulgación pueden usarse para definir grupos de pacientes para el desarrollo de fármacos. Las células u organoides de la divulgación también pueden usarse para la preselección de pacientes en ensayos de fase I o fase II. Por ejemplo, las células u organoides de la divulgación pueden usarse para identificar pacientes en los que realizar un ensayo clínico. Las células u organoides de la divulgación también pueden usarse en diagnósticos después de que se haya aprobado un fármaco. Por ejemplo, las células u organoides de la divulgación pueden usarse para identificar a los pacientes que tienen más probabilidades de beneficiarse de un fármaco particular, para identificar a los pacientes que probablemente tengan un mayor riesgo de sufrir efectos secundarios graves como resultado del tratamiento con un fármaco particular o para monitorizar la respuesta al tratamiento con un fármaco particular con el propósito de ajustar el tratamiento para lograr una mayor seguridad o eficacia.

30 En algunos casos, las células u organoides de la divulgación pueden usarse para terapias veterinarias. Por ejemplo, las células u organoides pueden usarse en el tratamiento de mastitis en vacas.

#### 30 **Composiciones y otras formas de la divulgación**

35 La divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende las células u organoides de la divulgación y que además comprende un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable.

La divulgación proporciona una composición que comprende un medio de cultivo de acuerdo con la invención y células madre. La divulgación también proporciona una composición que comprende un medio de cultivo de acuerdo con la divulgación y organoides. Además, la divulgación proporciona una composición que comprende un medio de cultivo de acuerdo con la divulgación y una matriz extracelular.

40 La divulgación también proporciona una composición que comprende un medio de cultivo de la divulgación, una matriz extracelular y células madre de la divulgación. La divulgación también proporciona una composición que comprende un medio de cultivo de la divulgación, una matriz extracelular y uno o más organoides de la divulgación. La divulgación también proporciona un suplemento de medio de cultivo que puede usarse para producir un medio de cultivo como se divulga en la presente. Un 'suplemento de medio de cultivo' es una mezcla de ingredientes que por sí misma no puede soportar las células madre, pero que permite o mejora el cultivo de células madre cuando se combina con otros ingredientes del cultivo celular. Por lo tanto, el suplemento puede usarse para producir un medio de cultivo celular funcional de la divulgación combinándolo con otros ingredientes de cultivo celular para producir una formulación de medio apropiada. El uso de suplementos de medio de cultivo es bien conocido en la técnica.

50 La divulgación proporciona un suplemento de medio de cultivo que comprende un ligando de ErbB3/4 de acuerdo con la divulgación. El suplemento puede contener cualquier ligando de ErbB3/4 (o combinación de ligando de ErbB3/4) divulgado en la presente. El suplemento también puede contener uno o más ingredientes de cultivo celular adicionales como se divulga en la presente, por ejemplo, uno o más ingredientes de cultivo celular seleccionados del grupo que consiste de aminoácidos, vitaminas, sales inorgánicas, fuentes de energía de carbono y tampones.

60 Un medio de cultivo o un suplemento de medio de cultivo puede ser un medio de cultivo o un suplemento líquido concentrado (por ejemplo, un medio de cultivo o un suplemento líquido concentrado de 2x a 250x) o puede ser un medio de cultivo o un suplemento seco. los medios de cultivo o los suplementos tanto líquidos como secos son bien conocidos en la técnica. Un medio de cultivo o un suplemento puede liofilizarse.

65 Un medio de cultivo o suplemento de la divulgación se esterilizará típicamente antes de su uso para evitar la contaminación, por ejemplo, por luz ultravioleta, calentamiento, irradiación o filtración. Un medio de cultivo o un

suplemento de medio de cultivo puede congelarse (por ejemplo, a  $-20^{\circ}\text{C}$  o  $-80^{\circ}\text{C}$ ) para su almacenamiento o transporte. En algunos casos, el medio de cultivo puede almacenarse como un líquido (por ejemplo, a aproximadamente  $4^{\circ}\text{C}$ ). En algunos casos, el medio de cultivo puede dividirse y almacenarse como dos componentes: un componente congelado (por ejemplo, entre aproximadamente  $-20^{\circ}\text{C}$  y aproximadamente  $-80^{\circ}\text{C}$ ) y un componente líquido (por ejemplo, aproximadamente a  $4^{\circ}\text{C}$ ). En particular, en el componente congelado se incluye preferiblemente el material degradable sensible a la temperatura o sensible al tiempo, mientras que el material menos sensible (por ejemplo DMEM o FCS) puede almacenarse en la forma líquida e incluirse por tanto en el componente líquido para su almacenamiento y envío.

La divulgación también proporciona un recipiente herméticamente cerrado que contiene un medio de cultivo o un suplemento de medio de cultivo de la divulgación. Pueden preferir recipientes herméticamente sellados para el transporte o almacenamiento de los medios de cultivo o los suplementos de los medios de cultivo divulgados en la presente, para evitar la contaminación. El recipiente puede ser cualquier recipiente adecuado, como un matraz, un plato, una botella, un frasco, un vial o una bolsa.

La divulgación también proporciona un kit que comprende un medio de cultivo, un suplemento de medio de cultivo y/o una composición de la divulgación. En algunos casos, el kit comprende además por lo menos otro componente adicional, por ejemplo seleccionado de la lista que comprende: una ECM (por ejemplo, Matrigel™ o extracto de membrana basal Cultrex®), una población de células y un organoide.

## General

El término "que comprende" abarca "que incluye" así como "que consiste", por ejemplo, una composición "que comprende" X puede consistir exclusivamente de X o puede incluir algo adicional, por ejemplo, X + Y.

La palabra "sustancialmente" no excluye "completamente", por ejemplo, una composición que está "sustancialmente libre" de Y puede estar completamente libre de Y. Cuando sea necesario, la palabra "sustancialmente" puede omitirse de la definición de la invención.

El término "aproximadamente" en relación con un valor numérico x es opcional y significa, por ejemplo,  $x \pm 10\%$ .

A menos que se indique específicamente, un proceso que comprende un paso de mezclar dos o más componentes no requiere ningún orden específico de mezclado. Por tanto, los componentes pueden mezclarse en cualquier orden. Cuando hay tres componentes, entonces pueden combinarse dos componentes entre sí, y luego la combinación puede combinarse con el tercer componente, etc.

A continuación se describen varios aspectos y realizaciones de la divulgación con más detalle a modo de ejemplo.

## EJEMPLOS

### EJEMPLO 1 - procesamiento de tejidos y cultivo de organoides mamarios

#### Descripción general

Se muestrearon 20 tumores de mama, tres de los cuales fueron triple negativos (15%, Figura 1A y Figura 13). Establecimos con éxito tres líneas de organoides tumorales (relación de división  $> 1:2$ , pase  $> 7$ ). 8 cultivos adicionales se están expandiendo actualmente y, según nuestra experiencia, lo más probable es que generen líneas de organoides exitosas (Figura 2 y Figura 13). Una selección para un subtipo específico no es evidente (Figura 1B).

De las 19 muestras normales obtenidas, hasta ahora establecimos tres cultivos prometedores (Figura 2, Figura 13).

#### Condiciones de cultivo

Las primeras 12 muestras se usaron para optimizar el aislamiento celular y las condiciones de cultivo de organoides. Las muestras 13-20 se cultivaron en seis condiciones diferentes.

#### *Parámetros alterados para el aislamiento celular*

Para el aislamiento de células viables probamos varias enzimas digestivas (colagenasa, dispasa, tripsina) a diferentes concentraciones (1-5 mg/ml) en diferentes medios (AdDF+++ , medio base, medio base-F<sub>7/10</sub>N) durante diferentes períodos de tiempo (1-2 h, 12 h) con o sin agitación. Las composiciones de estos medios base se muestran en la Figura 14. El protocolo óptimo se resume a continuación.

**Parámetros alterados para cultivo de organoides**

Para permitir el crecimiento de organoides, probamos varias condiciones de cultivo en paralelo (6-12 condiciones/muestra). Basándonos en la experiencia anterior con otros tejidos humanos, probamos varios factores de crecimiento además de nuestro medio base (Figura 14). Otros parámetros probados incluyeron densidad de BME (extracto de membrana basal) (50-100%) en lugar de Matrigel, el uso de cultivo de tejidos tratado frente a placas de suspensión y cultivo al 2% frente a O<sub>2</sub> ambiental. Se proporciona un ejemplo del efecto de diferentes condiciones de cultivo para líneas organoides normales y tumorales obtenidas del paciente W855 (Figura 3).

**Protocolo para el procesamiento de tejidos y cultivo de organoides mamarios**

Tras su llegada, los tejidos se fotografiaron y se cortaron en piezas de 1-3 mm<sup>3</sup>. Se congelaron instantáneamente dos piezas al azar y se almacenaron a -80° C para el aislamiento del ADN, se fijaron dos piezas aleatorias en formalina para análisis histopatológico e inmunohistoquímica, y el resto se procesó para el aislamiento de células viables. El tejido restante se trituró, se lavó con 10 ml de AdDF+++ y se digirió en 10 ml de medio base-F<sub>7/10</sub>N que contenía 1-2 mg/ml de colagenasa (Sigma-C9407) a 120 rpm y 37° C durante 1-2 h. La suspensión de tejido digerida se cortó secuencialmente usando pipetas Pasteur de plástico y vidrio flameado de 10 ml y 5 ml. Después de cada paso de cizallamiento, la suspensión se filtró sobre un filtro de 100 µm con piezas de tejido retenidas que entraron en un paso de cizallamiento posterior con ~10 ml de AdDF++. Se añadió FCS al 2% a la suspensión filtrada antes de la centrifugación a 400 g. El sedimento se resuspendió en 10 ml de AdDF+++ y se centrifugó de nuevo a 400°C. En el caso de un sedimento rojo visible, los eritrocitos se lisaron en 2 ml de tampón de lisis de glóbulos rojos (Roche-11814389001) durante 5 min a temperatura ambiente antes de la adición de 10 ml de AdDF+++ y centrifugación a 400 g. El sedimento se resuspendió en 10 mg/ml de BME tipo 2 reducido con factor de crecimiento Cultrex frío (Trevigen-3533-010-02) y se dejaron solidificar gotas de 40 µl de suspensión celular de BME en placas de cultivo en suspensión de 24 pocillos precalentadas (Greiner- M9312) a 37° C durante 10-20 min. Una vez completada la gelificación, se añadieron 400 µl de medio organoide (base-F<sub>7/10</sub>N, base-F<sub>7/10</sub>EN o base-F<sub>7/10</sub>PN) a cada pocillo y las placas se transfirieron a incubadoras humidificadas a 37° C con 5% de CO<sub>2</sub> al 2% o a O<sub>2</sub> ambiental.

El medio se cambió cada 4 días y los organoides se pasaron cada 1-4 semanas: los organoides quísticos se resuspendieron en 2 ml de AdDF+++ frío y se cortaron mecánicamente a través de pipetas Pasteur de vidrio flameado. Los organoides densos se disociaron mediante resuspensión en 2 ml de TrypLE Express (Invitrogen-12605036), incubación durante 1-5 min a temperatura ambiente y cizallamiento mecánico a través de pipetas Pasteur de vidrio flameado. Tras la adición de 10 ml de AdDF+++ y la centrifugación a 300 g o 400 g respectivamente, los fragmentos de organoides se resuspendieron en BME fría y se volvieron a sembrar como anteriormente a proporciones (1:1 - 1:6) permitiendo la formación de nuevos organoides. Las suspensiones de células individuales se sembraron inicialmente a alta densidad y se volvieron a sembrar a una densidad más baja después de ~1 semana.

**EJEMPLO 2 - Caracterización de líneas de organoides de tumores mamarios establecidas**

Las líneas de organoides de tumores mamarios W854T, W855T y W859T se expanden fácilmente en medio base F<sub>7/10</sub>N y, por lo tanto, se caracterizaron con más detalle.

Su estado tumoral se confirmó mediante cariotipado que revela aneuploidía en varios grados (Figura 4).

Además, la línea W854T creció fácilmente en medio que contenía Nutlin-3 5 µM, lo que indica la presencia de p53 mutante. El ARN y el ADN se aislaron y enviaron a BI para realizar el perfil de expresión génica y la secuenciación del exoma.

El análisis histológico e inmunofluorescente confirmó que el estado de ER, PR y HER2 se conserva entre el tumor de origen y la línea organoide tumoral establecida después de >7 pases (Figuras 5 y 6).

Mientras que la línea normal de organoides W855N consiste de células basales y luminales mutuamente excluyentes, los organoides tumorales expresan únicamente el marcador de células luminales queratina-8 (Figuras 6 y 7). La expresión de E-cadherina está presente pero disminuida en el tumor en comparación con las líneas de organoides normales, lo que indica su origen epitelial (Figuras 6 y 7). Sin embargo, los marcadores de transición epitelial a mesenquimatososa (EMT) están levemente regulados por incremento en las líneas de organoides tumorales W855T y W859T correspondientes a su fenotipo incoherente (Figuras 6 y 7).

**EJEMPLO 3 – Selección de fármacos de bajo rendimiento**

Para probar la viabilidad de los organoides tumorales mamarios para la selección de fármacos, las líneas W854T, W855T y W859T se sembraron en placas por duplicado en un formato de 96 pocillos y se expusieron a

medio que contenía el inhibidor de EGFR Iressa (1 nM-30 µM a 1:3 pasos de dilución, S1025 Selleck Chemicals) o el estabilizador de p53 Nutlin-3 (1 nM-30 µM a 1:3 pasos de dilución, 10004372 Cayman Chemicals) durante 7 días. Los organoides se fotografiaron cada 3-4 días (Figura 8) y la viabilidad celular medida el día 7 usando el ensayo CellTiter-Glo 2.0 (G9241, Promega) (Figura 9).

5 Las tres líneas de organoides responden a Iressa a concentraciones de ~10 µM, lo que indica una dependencia de la señalización de EGFR. Quizás con la excepción de W855T, Nutlin-3 no inhibe el crecimiento a concentraciones de hasta 30 µM, lo que indica la presencia de p53 mutante (Figura 9). Los organoides de tumores mamarios son adecuados para selecciones de fármacos de bajo rendimiento basadas en la viabilidad celular en un formato de 96 pocillos. Actualmente estamos probando el ensayo en un formato de placa de 384 pocillos que se ha establecido con éxito para los organoides de cáncer de colon.

**EJEMPLO 4 – El medio de cultivo de Pasic et al. no soporta el crecimiento a largo plazo**

15 Los organoides mamarios normales en el medio de cultivo de Pasic ralentizaron la expansión en el pase 2 y se detuvieron en el pase 3; los organoides del mismo paciente cultivados en base-F<sub>7/10</sub>E continuaron expandiéndose hasta el pase 4 (ver la Figura 10). Los organoides mamarios normales de diferentes pacientes se expanden por lo menos hasta el pase 6 en medio base F<sub>7/10</sub>EN.

20 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> KONINKLIJKE NEDERLANDSE AKADEMIE VAN WETENSCHAPPEN

25 <120> Medio de cultivo

<130> P064831WO

<141> 2015-11-27

30 <150> GB1421094.2

<151> 2014-11-27

<160> 33

35 <170> SeqWin2010, versión 1.0

<210> 1

<211> 607

<212> PRT

40 <213> Homo sapiens

<400> 1

ES 2 883 159 T3

	Met	Gly	Lys	Gly	Arg	Ala	Gly	Arg	Val	Gly	Thr	Thr	Ala	Leu	Pro	Pro
	1				5					10					15	
5	Arg	Leu	Lys	Glu	Met	Lys	Ser	Gln	Glu	Ser	Ala	Ala	Gly	Ser	Lys	Leu
				20					25					30		
	Val	Leu	Arg	Cys	Glu	Thr	Ser	Ser	Glu	Tyr	Ser	Ser	Leu	Arg	Phe	Lys
			35					40					45			
10	Trp	Phe	Lys	Asn	Gly	Asn	Glu	Leu	Asn	Arg	Lys	Asn	Lys	Pro	Gln	Asn
	50						55					60				
	Ile	Lys	Ile	Gln	Lys	Lys	Pro	Gly	Lys	Ser	Glu	Leu	Arg	Ile	Asn	Lys
15	65					70					75					80
	Ala	Ser	Leu	Ala	Asp	Ser	Gly	Glu	Tyr	Met	Cys	Lys	Val	Ile	Ser	Lys
					85					90					95	
20	Leu	Gly	Asn	Asp	Ser	Ala	Ser	Ala	Asn	Ile	Thr	Ile	Val	Glu	Ser	Asn
				100					105					110		
	Glu	Ile	Ile	Thr	Gly	Met	Pro	Ala	Ser	Thr	Glu	Gly	Ala	Tyr	Val	Ser
25			115					120					125			
	Ser	Ala	Thr	Ser	Thr	Ser	Thr	Thr	Gly	Thr	Ser	His	Leu	Val	Lys	Cys
		130					135					140				
30	Ala	Glu	Lys	Glu	Lys	Thr	Phe	Cys	Val	Asn	Gly	Gly	Glu	Cys	Phe	Met
	145					150					155					160
	Val	Lys	Asp	Leu	Ser	Asn	Pro	Ser	Arg	Tyr	Leu	Cys	Lys	Cys	Pro	Asn
					165					170					175	
35	Glu	Phe	Thr	Gly	Asp	Arg	Cys	Gln	Asn	Tyr	Val	Met	Ala	Ser	Phe	Tyr
				180					185					190		
	Lys	His	Leu	Gly	Ile	Glu	Phe	Met	Glu	Ala	Glu	Glu	Leu	Tyr	Gln	Lys
40			195					200					205			
	Arg	Val	Leu	Thr	Ile	Thr	Gly	Ile	Cys	Ile	Ala	Leu	Leu	Val	Val	Gly

ES 2 883 159 T3

	210		215		220														
5	Ile 225	Met	Cys	Val	Val	Ala 230	Tyr	Cys	Lys	Thr	Lys 235	Lys	Gln	Arg	Lys	Lys	240		
	Leu	His	Asp	Arg	Leu 245	Arg	Gln	Ser	Leu	Arg 250	Ser	Glu	Arg	Asn	Asn	Met	255		
10	Met	Asn	Ile	Ala 260	Asn	Gly	Pro	His	His 265	Pro	Asn	Pro	Pro	Pro	Glu	Asn	270		
	Val	Gln	Leu 275	Val	Asn	Gln	Tyr	Val 280	Ser	Lys	Asn	Val	Ile 285	Ser	Ser	Glu			
15	His	Ile 290	Val	Glu	Arg	Glu	Ala 295	Glu	Thr	Ser	Phe	Ser 300	Thr	Ser	His	Tyr			
	Thr 305	Ser	Thr	Ala	His	His 310	Ser	Thr	Thr	Val	Thr 315	Gln	Thr	Pro	Ser	His	320		
20	Ser	Trp	Ser	Asn	Gly 325	His	Thr	Glu	Ser	Ile 330	Leu	Ser	Glu	Ser	His	Ser	335		
25	Val	Ile	Val	Met 340	Ser	Ser	Val	Glu	Asn 345	Ser	Arg	His	Ser	Ser	Pro	Thr	350		
	Gly	Gly	Pro 355	Arg	Gly	Arg	Leu	Asn 360	Gly	Thr	Gly	Gly	Pro 365	Arg	Glu	Cys			
30	Asn 370	Ser	Phe	Leu	Arg	His	Ala 375	Arg	Glu	Thr	Pro	Asp 380	Ser	Tyr	Arg	Asp			
35	Ser 385	Pro	His	Ser	Glu	Arg 390	Tyr	Val	Ser	Ala	Met 395	Thr	Thr	Pro	Ala	Arg	400		
	Met	Ser	Pro	Val	Asp 405	Phe	His	Thr	Pro	Ser	Ser	Pro	Lys	Ser	Pro	Pro	415		
40	Ser	Glu	Met	Ser 420	Pro	Pro	Val	Ser	Ser	Met	Thr	Val	Ser	Met	Pro	Ser	430		
	Met	Ala	Val 435	Ser	Pro	Phe	Met	Glu 440	Glu	Glu	Arg	Pro	Leu 445	Leu	Leu	Val			
45	Thr 450	Pro	Pro	Arg	Leu	Arg	Glu 455	Lys	Lys	Phe	Asp	His 460	His	Pro	Gln	Gln			
50	Phe 465	Ser	Ser	Phe	His	His 470	Asn	Pro	Ala	His	Asp 475	Ser	Asn	Ser	Leu	Pro	480		
	Ala	Ser	Pro	Leu	Arg 485	Ile	Val	Glu	Asp	Glu	Glu	Tyr	Glu	Thr	Thr	Gln	495		
55	Glu	Tyr	Glu	Pro 500	Ala	Gln	Glu	Pro	Val 505	Lys	Lys	Leu	Ala	Asn	Ser	Arg	510		
	Arg	Ala	Lys 515	Arg	Thr	Lys	Pro	Asn 520	Gly	His	Ile	Ala	Asn 525	Arg	Leu	Glu			
60	Val 530	Asp	Ser	Asn	Thr	Ser	Ser 535	Gln	Ser	Ser	Asn	Ser 540	Glu	Ser	Glu	Thr			
65	Glu	Asp	Glu	Arg	Val	Gly	Glu	Asp	Thr	Pro	Phe	Leu	Gly	Ile	Gln	Asn			



ES 2 883 159 T3

	Met	Gln	Ile	Pro	Lys	His	Ile	Ser	Ile	Glu	Asp	Ile	Thr	Ala	Thr	Ser	
	1				5					10					15		
5	Thr	Ser	Thr	Thr	Gly	Thr	Ser	His	Leu	Val	Lys	Cys	Ala	Glu	Lys	Glu	
					20				25					30			
	Lys	Thr	Phe	Cys	Val	Asn	Gly	Gly	Glu	Cys	Phe	Met	Val	Lys	Asp	Leu	
			35					40					45				
10	Ser	Asn	Pro	Ser	Arg	Tyr	Leu	Cys	Lys	Cys	Gln	Pro	Gly	Phe	Thr	Gly	
		50					55					60					
15	Ala	Arg	Cys	Thr	Glu	Asn	Val	Pro	Met	Lys	Val	Gln	Asn	Gln	Glu	Lys	
	65					70					75					80	
	Ala	Glu	Glu	Leu	Tyr	Gln	Lys	Arg	Val	Leu	Thr	Ile	Thr	Gly	Ile	Cys	
					85					90					95		
20	Ile	Ala	Leu	Leu	Val	Val	Gly	Ile	Met	Cys	Val	Val	Ala	Tyr	Cys	Lys	
				100					105					110			
25	Thr	Lys	Lys	Gln	Arg	Lys	Lys	Leu	His	Asp	Arg	Leu	Arg	Gln	Ser	Leu	
			115					120					125				
	Arg	Ser	Glu	Arg	Asn	Asn	Met	Met	Asn	Ile	Ala	Asn	Gly	Pro	His	His	
		130					135					140					
30	Pro	Asn	Pro	Pro	Pro	Glu	Asn	Val	Gln	Leu	Val	Asn	Gln	Tyr	Val	Ser	
	145					150					155					160	
	Lys	Asn	Val	Ile	Ser	Ser	Glu	His	Ile	Val	Glu	Arg	Glu	Ala	Glu	Thr	
					165					170					175		
35	Ser	Phe	Ser	Thr	Ser	His	Tyr	Thr	Ser	Thr	Ala	His	His	Ser	Thr	Thr	
				180					185					190			
40	Val	Thr	Gln	Thr	Pro	Ser	His	Ser	Trp	Ser	Asn	Gly	His	Thr	Glu	Ser	
			195					200					205				
	Ile	Leu	Ser	Glu	Ser	His	Ser	Val	Ile	Val	Met	Ser	Ser	Val	Glu	Asn	
		210					215					220					
45	Ser	Arg	His	Ser	Ser	Pro	Thr	Gly	Gly	Pro	Arg	Gly	Arg	Leu	Asn	Gly	
	225					230					235					240	
	Thr	Gly	Gly	Pro	Arg	Glu	Cys	Asn	Ser	Phe	Leu	Arg	His	Ala	Arg	Glu	
50																	
					245						250					255	
	Thr	Pro	Asp	Ser	Tyr	Arg	Asp	Ser	Pro	His	Ser	Glu	Arg	His	Asn	Leu	
55				260					265					270			
	Ile	Ala	Glu	Leu	Arg	Arg	Asn	Lys	Ala	His	Arg	Ser	Lys	Cys	Met	Gln	
			275					280					285				
60	Ile	Gln	Leu	Ser	Ala	Thr	His	Leu	Arg	Ser	Ser	Ser	Ile	Pro	His	Leu	
		290					295					300					
	Gly	Phe	Ile	Leu													
65	305																

ES 2 883 159 T3

<210> 3  
 <211> 624  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

5

<400> 3

10	Met	Gly	Lys	Gly	Arg	Ala	Gly	Arg	Val	Gly	Thr	Thr	Ala	Leu	Pro	Pro
	1				5					10					15	
15	Arg	Leu	Lys	Glu	Met	Lys	Ser	Gln	Glu	Ser	Ala	Ala	Gly	Ser	Lys	Leu
				20					25					30		
20	Val	Leu	Arg	Cys	Glu	Thr	Ser	Ser	Glu	Tyr	Ser	Ser	Leu	Arg	Phe	Lys
			35					40					45			
25	Trp	Phe	Lys	Asn	Gly	Asn	Glu	Leu	Asn	Arg	Lys	Asn	Lys	Pro	Gln	Asn
	50						55					60				
30	Ile	Lys	Ile	Gln	Lys	Lys	Pro	Gly	Lys	Ser	Glu	Leu	Arg	Ile	Asn	Lys
	65					70					75					80
35	Ala	Ser	Leu	Ala	Asp	Ser	Gly	Glu	Tyr	Met	Cys	Lys	Val	Ile	Ser	Lys
					85					90					95	
40	Leu	Gly	Asn	Asp	Ser	Ala	Ser	Ala	Asn	Ile	Thr	Ile	Val	Glu	Ser	Asn
				100					105					110		
45	Glu	Ile	Ile	Thr	Gly	Met	Pro	Ala	Ser	Thr	Glu	Gly	Ala	Tyr	Val	Ser
			115					120					125			
50	Ser	Glu	Ser	Pro	Ile	Arg	Ile	Ser	Val	Ser	Thr	Glu	Gly	Ala	Asn	Thr
		130					135					140				
55	Ser	Ser	Ser	Thr	Ser	Thr	Ser	Thr	Thr	Gly	Thr	Ser	His	Leu	Val	Lys
	145					150					155					160
60	Cys	Ala	Glu	Lys	Glu	Lys	Thr	Phe	Cys	Val	Asn	Gly	Gly	Glu	Cys	Phe
					165					170					175	
65	Met	Val	Lys	Asp	Leu	Ser	Asn	Pro	Ser	Arg	Tyr	Leu	Cys	Lys	Cys	Pro
				180					185					190		
70	Asn	Glu	Phe	Thr	Gly	Asp	Arg	Cys	Gln	Asn	Tyr	Val	Met	Ala	Ser	Phe
			195					200					205			
75	Tyr	Lys	His	Leu	Gly	Ile	Glu	Phe	Met	Glu	Ala	Glu	Glu	Leu	Tyr	Gln
		210					215					220				
80	Lys	Arg	Val	Leu	Thr	Ile	Thr	Gly	Ile	Cys	Ile	Ala	Leu	Leu	Val	Val

ES 2 883 159 T3

	225				230					235				240		
	Gly	Ile	Met	Cys	Val	Val	Ala	Tyr	Cys	Lys	Thr	Lys	Lys	Gln	Arg	Lys
5					245					250				255		
	Lys	Leu	His	Asp	Arg	Leu	Arg	Gln	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Arg	Asn	Asn
				260					265					270		
10	Met	Met	Asn	Ile	Ala	Asn	Gly	Pro	His	His	Pro	Asn	Pro	Pro	Pro	Glu
			275					280					285			
	Asn	Val	Gln	Leu	Val	Asn	Gln	Tyr	Val	Ser	Lys	Asn	Val	Ile	Ser	Ser
		290					295					300				
15	Glu	His	Ile	Val	Glu	Arg	Glu	Ala	Glu	Thr	Ser	Phe	Ser	Thr	Ser	His
	305					310						315				320
	Tyr	Thr	Ser	Thr	Ala	His	His	Ser	Thr	Thr	Val	Thr	Gln	Thr	Pro	Ser
20					325					330					335	
	His	Ser	Trp	Ser	Asn	Gly	His	Thr	Glu	Ser	Ile	Leu	Ser	Glu	Ser	His
				340					345					350		
25	Ser	Val	Ile	Val	Met	Ser	Ser	Val	Glu	Asn	Ser	Arg	His	Ser	Ser	Pro
			355					360					365			
	Thr	Gly	Gly	Pro	Arg	Gly	Arg	Leu	Asn	Gly	Thr	Gly	Gly	Pro	Arg	Glu
		370					375					380				
30	Cys	Asn	Ser	Phe	Leu	Arg	His	Ala	Arg	Glu	Thr	Pro	Asp	Ser	Tyr	Arg
	385					390					395					400
	Asp	Ser	Pro	His	Ser	Glu	Arg	Tyr	Val	Ser	Ala	Met	Thr	Thr	Pro	Ala
35				405						410					415	
	Arg	Met	Ser	Pro	Val	Asp	Phe	His	Thr	Pro	Ser	Ser	Pro	Lys	Ser	Pro
				420					425					430		
40	Pro	Ser	Glu	Met	Ser	Pro	Pro	Val	Ser	Ser	Met	Thr	Val	Ser	Met	Pro
			435					440					445			
	Ser	Met	Ala	Val	Ser	Pro	Phe	Met	Glu	Glu	Glu	Arg	Pro	Leu	Leu	Leu
		450					455					460				
45	Val	Thr	Pro	Pro	Arg	Leu	Arg	Glu	Lys	Lys	Phe	Asp	His	His	Pro	Gln
	465					470					475					480
	Gln	Phe	Ser	Ser	Phe	His	His	Asn	Pro	Ala	His	Asp	Ser	Asn	Ser	Leu
50					485					490					495	
	Pro	Ala	Ser	Pro	Leu	Arg	Ile	Val	Glu	Asp	Glu	Glu	Tyr	Glu	Thr	Thr
				500					505					510		
55	Gln	Glu	Tyr	Glu	Pro	Ala	Gln	Glu	Pro	Val	Lys	Lys	Leu	Ala	Asn	Ser
			515					520					525			
	Arg	Arg	Ala	Lys	Arg	Thr	Lys	Pro	Asn	Gly	His	Ile	Ala	Asn	Arg	Leu
		530					535					540				
60	Glu	Val	Asp	Ser	Asn	Thr	Ser	Ser	Gln	Ser	Ser	Asn	Ser	Glu	Ser	Glu
	545					550					555					560
	Thr	Glu	Asp	Glu	Arg	Val	Gly	Glu	Asp	Thr	Pro	Phe	Leu	Gly	Ile	Gln
65																

ES 2 883 159 T3

				565					570				575			
	Asn	Pro	Leu	Ala	Ala	Ser	Leu	Glu	Ala	Thr	Pro	Ala	Phe	Arg	Leu	Ala
5				580					585				590			
	Asp	Ser	Arg	Thr	Asn	Pro	Ala	Gly	Arg	Phe	Ser	Thr	Gln	Glu	Glu	Ile
			595					600					605			
10	Gln	Ala	Arg	Leu	Ser	Ser	Val	Ile	Ala	Asn	Gln	Asp	Pro	Ile	Ala	Val
	610						615					620				

15 <210> 4  
 <211> 590  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

20 <400> 4

ES 2 883 159 T3

	Met	Gly	Lys	Gly	Arg	Ala	Gly	Arg	Val	Gly	Thr	Thr	Ala	Leu	Pro	Pro
	1				5					10					15	
5	Arg	Leu	Lys	Glu	Met	Lys	Ser	Gln	Glu	Ser	Ala	Ala	Gly	Ser	Lys	Leu
				20					25					30		
	Val	Leu	Arg	Cys	Glu	Thr	Ser	Ser	Glu	Tyr	Ser	Ser	Leu	Arg	Phe	Lys
			35					40					45			
10	Trp	Phe	Lys	Asn	Gly	Asn	Glu	Leu	Asn	Arg	Lys	Asn	Lys	Pro	Gln	Asn
	50						55					60				
	Ile	Lys	Ile	Gln	Lys	Lys	Pro	Gly	Lys	Ser	Glu	Leu	Arg	Ile	Asn	Lys
15	65					70					75					80
	Ala	Ser	Leu	Ala	Asp	Ser	Gly	Glu	Tyr	Met	Cys	Lys	Val	Ile	Ser	Lys
					85					90					95	
20	Leu	Gly	Asn	Asp	Ser	Ala	Ser	Ala	Asn	Ile	Thr	Ile	Val	Glu	Ser	Asn
				100					105					110		
	Ala	Thr	Ser	Thr	Ser	Thr	Thr	Gly	Thr	Ser	His	Leu	Val	Lys	Cys	Ala
25			115					120					125			
	Glu	Lys	Glu	Lys	Thr	Phe	Cys	Val	Asn	Gly	Gly	Glu	Cys	Phe	Met	Val
		130					135					140				
30	Lys	Asp	Leu	Ser	Asn	Pro	Ser	Arg	Tyr	Leu	Cys	Lys	Cys	Pro	Asn	Glu
	145					150					155					160
	Phe	Thr	Gly	Asp	Arg	Cys	Gln	Asn	Tyr	Val	Met	Ala	Ser	Phe	Tyr	Lys
35					165					170					175	
	His	Leu	Gly	Ile	Glu	Phe	Met	Glu	Ala	Glu	Glu	Leu	Tyr	Gln	Lys	Arg
				180					185					190		
40	Val	Leu	Thr	Ile	Thr	Gly	Ile	Cys	Ile	Ala	Leu	Leu	Val	Val	Gly	Ile
			195					200					205			
	Met	Cys	Val	Val	Ala	Tyr	Cys	Lys	Thr	Lys	Lys	Gln	Arg	Lys	Lys	Leu
		210					215					220				
45	His	Asp	Arg	Leu	Arg	Gln	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Arg	Asn	Asn	Met	Met
	225					230					235				240	
50	Asn	Ile	Ala	Asn	Gly	Pro	His	His	Pro	Asn	Pro	Pro	Pro	Glu	Asn	Val

ES 2 883 159 T3

				245					250					255		
	Gln	Leu	Val	Asn 260	Gln	Tyr	Val	Ser	Lys 265	Asn	Val	Ile	Ser	Ser	Glu	His
5	Ile	Val	Glu 275	Arg	Glu	Ala	Glu	Thr 280	Ser	Phe	Ser	Thr	Ser	His	Tyr	Thr
10	Ser	Thr 290	Ala	His	His	Ser	Thr 295	Thr	Val	Thr	Gln	Thr 300	Pro	Ser	His	Ser
	Trp	Ser	Asn	Gly	His	Thr 310	Glu	Ser	Ile	Leu	Ser	Glu 315	Ser	His	Ser	Val 320
15	Ile	Val	Met	Ser	Ser	Val	Glu	Asn	Ser	Arg 330	His	Ser	Ser	Pro	Thr 335	Gly
20	Gly	Pro	Arg	Gly 340	Arg	Leu	Asn	Gly	Thr 345	Gly	Gly	Pro	Arg	Glu	Cys	Asn
	Ser	Phe	Leu 355	Arg	His	Ala	Arg	Glu 360	Thr	Pro	Asp	Ser	Tyr 365	Arg	Asp	Ser
25	Pro	His 370	Ser	Glu	Arg	Tyr	Val 375	Ser	Ala	Met	Thr	Thr 380	Pro	Ala	Arg	Met
	Ser	Pro	Val	Asp	Phe	His	Thr 390	Pro	Ser	Ser	Pro	Lys 395	Ser	Pro	Pro	Ser 400
30	Glu	Met	Ser	Pro	Pro	Val	Ser	Ser	Met	Thr 410	Val	Ser	Met	Pro	Ser	Met 415
35	Ala	Val	Ser	Pro 420	Phe	Met	Glu	Glu	Glu 425	Arg	Pro	Leu	Leu	Leu	Val	Thr
	Pro	Pro	Arg 435	Leu	Arg	Glu	Lys	Lys 440	Phe	Asp	His	His	Pro 445	Gln	Gln	Phe
40	Ser	Ser	Phe	His	His	Asn	Pro 455	Ala	His	Asp	Ser	Asn 460	Ser	Leu	Pro	Ala
	Ser	Pro	Leu	Arg	Ile	Val	Glu 470	Asp	Glu	Glu	Tyr	Glu 475	Thr	Thr	Gln	Glu 480
45	Tyr	Glu	Pro	Ala	Gln	Glu	Pro	Val	Lys	Lys 490	Leu	Ala	Asn	Ser	Arg	Arg 495
50	Ala	Lys	Arg	Thr 500	Lys	Pro	Asn	Gly	His 505	Ile	Ala	Asn	Arg	Leu	Glu	Val 510
	Asp	Ser	Asn 515	Thr	Ser	Ser	Gln	Ser 520	Ser	Asn	Ser	Glu	Ser 525	Glu	Thr	Glu
55	Asp	Glu	Arg	Val	Gly	Glu	Asp 535	Thr	Pro	Phe	Leu	Gly 540	Ile	Gln	Asn	Pro
	Leu	Ala	Ala	Ser	Leu	Glu	Ala 550	Thr	Pro	Ala	Phe	Arg 555	Leu	Ala	Asp	Ser 560
60	Arg	Thr	Asn	Pro	Ala	Gly	Arg 565	Phe	Ser	Thr 570	Gln	Glu	Glu	Ile	Gln	Ala 575
65	Arg	Leu	Ser	Ser	Val	Ile	Ala	Asn	Gln	Asp	Pro	Ile	Ala	Val		

ES 2 883 159 T3

	580		585		590											
5	<210> 5 <211> 194 <212> PRT <213> Homo sapiens															
	<400> 5															
10	Met	Ser	Glu	Arg	Lys	Glu	Gly	Arg	Gly	Lys	Gly	Lys	Gly	Lys	Lys	Lys
	1				5					10					15	
15	Glu	Arg	Gly	Ser	Gly	Lys	Lys	Pro	Glu	Ser	Ala	Ala	Gly	Ser	Gln	Ser
				20					25					30		
20	Pro	Ala	Leu	Pro	Pro	Arg	Leu	Lys	Glu	Met	Lys	Ser	Gln	Glu	Ser	Ala
			35					40					45			
25	Ala	Gly	Ser	Lys	Leu	Val	Leu	Arg	Cys	Glu	Thr	Ser	Ser	Glu	Tyr	Ser
		50					55						60			
30	Ser	Leu	Arg	Phe	Lys	Trp	Phe	Lys	Asn	Gly	Asn	Glu	Leu	Asn	Arg	Lys
	65					70					75					80
35	Asn	Lys	Pro	Gln	Asn	Ile	Lys	Ile	Gln	Lys	Lys	Pro	Gly	Lys	Ser	Glu
				85						90					95	
40	Leu	Arg	Ile	Asn	Lys	Ala	Ser	Leu	Ala	Asp	Ser	Gly	Glu	Tyr	Met	Cys
				100					105						110	
45	Lys	Val	Ile	Ser	Lys	Leu	Gly	Asn	Asp	Ser	Ala	Ser	Ala	Asn	Ile	Thr
			115					120					125			
50	Ile	Val	Glu	Ser	Asn	Glu	Ile	Ile	Thr	Gly	Met	Pro	Ala	Ser	Thr	Glu
		130					135					140				
55	Gly	Ala	Tyr	Val	Ser	Ser	Ala	Thr	Ser	Thr	Ser	Thr	Thr	Gly	Thr	Ser
	145					150					155					160
60	His	Leu	Val	Lys	Cys	Ala	Glu	Lys	Glu	Lys	Thr	Phe	Cys	Val	Asn	Gly
				165						170					175	
65	Gly	Glu	Cys	Phe	Met	Val	Lys	Asp	Leu	Ser	Asn	Pro	Ser	Arg	Tyr	Leu
			180						185					190		
70	Cys		Lys													
75	<210> 6 <211> 459 <212> PRT <213> Homo sapiens															
80	<400> 6															

ES 2 883 159 T3

Met Ser Glu Arg Lys Glu Gly Arg Gly Lys Gly Lys Gly Lys Lys Lys  
1 5 10 15

5 Glu Arg Gly Ser Gly Lys Lys Pro Glu Ser Ala Ala Gly Ser Gln Ser  
20 25 30

Pro Ala Leu Pro Pro Arg Leu Lys Glu Met Lys Ser Gln Glu Ser Ala  
35 40 45

10 Ala Gly Ser Lys Leu Val Leu Arg Cys Glu Thr Ser Ser Glu Tyr Ser

ES 2 883 159 T3

	50					55						60				
5	Ser 65	Leu	Arg	Phe	Lys	Trp 70	Phe	Lys	Asn	Gly	Asn 75	Glu	Leu	Asn	Arg	Lys 80
	Asn	Lys	Pro	Gln	Asn 85	Ile	Lys	Ile	Gln	Lys 90	Lys	Pro	Gly	Lys	Ser 95	Glu
10	Leu	Arg	Ile	Asn 100	Lys	Ala	Ser	Leu	Ala 105	Asp	Ser	Gly	Glu	Tyr	Met	Cys
	Lys	Val	Ile 115	Ser	Lys	Leu	Gly	Asn 120	Asp	Ser	Ala	Ser	Ala	Asn	Ile	Thr
15	Ile	Val	Glu	Ser	Asn	Glu	Ile	Ile 135	Thr	Gly	Met	Pro	Ala	Ser	Thr	Glu
	Gly	Ala	Tyr	Val	Ser	Ser	Glu	Ser 150	Pro	Ile	Arg	Ile	Ser	Val	Ser	Thr 160
20	Glu	Gly	Ala	Asn	Thr 165	Ser	Ser	Ser	Thr	Ser	Thr	Ser	Thr	Thr	Gly	Thr 175
25	Ser	His	Leu	Val 180	Lys	Cys	Ala	Glu	Lys 185	Glu	Lys	Thr	Phe	Cys	Val	Asn
	Gly	Gly	Glu	Cys 195	Phe	Met	Val	Lys	Asp 200	Leu	Ser	Asn	Pro	Ser	Arg	Tyr
30	Leu	Cys	Lys	Cys	Pro	Asn	Glu	Phe 215	Thr	Gly	Asp	Arg	Cys	Gln	Asn	Tyr
	Val	Met	Ala	Ser	Phe	Tyr	Lys	Ala 230	Glu	Glu	Leu	Tyr	Gln	Lys	Arg	Val 240
35	Leu	Thr	Ile	Thr	Gly 245	Ile	Cys	Ile	Ala	Leu	Leu	Val	Val	Gly	Ile	Met 255
40	Cys	Val	Val	Ala 260	Tyr	Cys	Lys	Thr	Lys 265	Lys	Gln	Arg	Lys	Lys	Leu	His 270
	Asp	Arg	Leu	Arg	Gln	Ser	Leu	Arg 280	Ser	Glu	Arg	Asn	Asn	Met	Met	Asn 285
45	Ile	Ala	Asn	Gly	Pro	His	His	Pro 295	Asn	Pro	Pro	Pro	Glu	Asn	Val	Gln
	Leu	Val	Asn	Gln	Tyr	Val	Ser	Lys 310	Asn	Val	Ile	Ser	Ser	Glu	His	Ile 320
50	Val	Glu	Arg	Glu	Ala 325	Glu	Thr	Ser	Phe	Ser	Thr	Ser	His	Tyr	Thr	Ser 335
55	Thr	Ala	His	His 340	Ser	Thr	Thr	Val	Thr 345	Gln	Thr	Pro	Ser	His	Ser	Trp 350
	Ser	Asn	Gly	His	Thr	Glu	Ser	Ile 360	Leu	Ser	Glu	Ser	His	Ser	Val	Ile 365
60	Val	Met	Ser	Ser	Val	Glu	Asn	Ser 375	Arg	His	Ser	Ser	Pro	Thr	Gly	Gly
	Pro	Arg	Gly	Arg	Leu	Asn	Gly	Thr	Gly	Gly	Pro	Arg	Glu	Cys	Asn	Ser 380
65																

ES 2 883 159 T3

	385				390					395				400		
	Phe	Leu	Arg	His	Ala	Arg	Glu	Thr	Pro	Asp	Ser	Tyr	Arg	Asp	Ser	Pro
5					405					410				415		
	His	Ser	Glu	Arg	His	Asn	Leu	Ile	Ala	Glu	Leu	Arg	Arg	Asn	Lys	Ala
				420					425					430		
10	His	Arg	Ser	Lys	Cys	Met	Gln	Ile	Gln	Leu	Ser	Ala	Thr	His	Leu	Arg
			435					440					445			
	Ser	Ser	Ser	Ile	Pro	His	Leu	Gly	Phe	Ile	Leu					
15		450					455									
	<210> 7															
	<211> 207															
	<212> PRT															
20	<213> Homo sapiens															
	<400> 7															
	Met	Ser	Glu	Arg	Lys	Glu	Gly	Arg	Gly	Lys	Gly	Lys	Gly	Lys	Lys	Lys
25	1				5					10					15	
	Glu	Arg	Gly	Ser	Gly	Lys	Lys	Pro	Glu	Ser	Ala	Ala	Gly	Ser	Gln	Ser
				20					25					30		
30	Pro	Ala	Leu	Pro	Pro	Arg	Leu	Lys	Glu	Met	Lys	Ser	Gln	Glu	Ser	Ala
			35					40					45			
	Ala	Gly	Ser	Lys	Leu	Val	Leu	Arg	Cys	Glu	Thr	Ser	Ser	Glu	Tyr	Ser
35		50					55					60				
	Ser	Leu	Arg	Phe	Lys	Trp	Phe	Lys	Asn	Gly	Asn	Glu	Leu	Asn	Arg	Lys
	65					70					75					80
40	Asn	Lys	Pro	Gln	Asn	Ile	Lys	Ile	Gln	Lys	Lys	Pro	Gly	Lys	Ser	Glu
				85						90					95	
	Leu	Arg	Ile	Asn	Lys	Ala	Ser	Leu	Ala	Asp	Ser	Gly	Glu	Tyr	Met	Cys
				100					105					110		
45	Lys	Val	Ile	Ser	Lys	Leu	Gly	Asn	Asp	Ser	Ala	Ser	Ala	Asn	Ile	Thr
			115					120					125			
50	Ile	Val	Glu	Ser	Asn	Ala	Thr	Ser	Thr	Ser	Thr	Thr	Gly	Thr	Ser	His
		130					135						140			
	Leu	Val	Lys	Cys	Ala	Glu	Lys	Glu	Lys	Thr	Phe	Cys	Val	Asn	Gly	Gly
	145					150					155					160
55	Glu	Cys	Phe	Met	Val	Lys	Asp	Leu	Ser	Asn	Pro	Ser	Arg	Tyr	Leu	Cys
				165						170					175	
	Lys	Cys	Pro	Asn	Glu	Phe	Thr	Gly	Asp	Arg	Cys	Gln	Asn	Tyr	Val	Met
60				180					185					190		
	Ala	Ser	Phe	Tyr	Ser	Thr	Ser	Thr	Pro	Phe	Leu	Ser	Leu	Pro	Glu	
			195					200					205			

ES 2 883 159 T3

<210> 8  
 <211> 177  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 5  
 <400> 8  
 Met Ser Glu Arg Lys Glu Gly Arg Gly Lys Gly Lys Gly Lys Lys Lys  
 1 5 10 15  
 Glu Arg Gly Ser Gly Lys Lys Pro Glu Ser Ala Ala Gly Ser Gln Ser  
 20 25 30  
 Pro Ala Leu Pro Pro Arg Leu Lys Glu Met Lys Ser Gln Glu Ser Ala  
 35 40 45  
 Ala Gly Ser Lys Leu Val Leu Arg Cys Glu Thr Ser Ser Glu Tyr Ser  
 50 55 60  
 Ser Leu Arg Phe Lys Trp Phe Lys Asn Gly Asn Glu Leu Asn Arg Lys  
 65 70 75 80  
 Asn Lys Pro Gln Asn Ile Lys Ile Gln Lys Lys Pro Gly Lys Ser Glu  
 85 90 95  
 Leu Arg Ile Asn Lys Ala Ser Leu Ala Asp Ser Gly Glu Tyr Met Cys  
 100 105 110  
 Lys Val Ile Ser Lys Leu Gly Asn Asp Ser Ala Ser Ala Asn Ile Thr  
 115 120 125  
 Ile Val Glu Ser Asn Ala Thr Ser Thr Ser Thr Thr Gly Thr Ser His  
 130 135 140  
 Leu Val Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn Gly Gly  
 145 150 155 160  
 Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr Leu Cys  
 165 170 175  
 Lys  
 45  
 <210> 9  
 <211> 420  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 50  
 <400> 9

ES 2 883 159 T3

	Met	Ser	Glu	Arg	Lys	Glu	Gly	Arg	Gly	Lys	Gly	Lys	Gly	Lys	Lys	Lys
	1				5					10					15	
5	Glu	Arg	Gly	Ser	Gly	Lys	Lys	Pro	Glu	Ser	Ala	Ala	Gly	Ser	Gln	Ser
				20					25					30		
	Pro	Ala	Leu	Pro	Pro	Arg	Leu	Lys	Glu	Met	Lys	Ser	Gln	Glu	Ser	Ala
			35					40					45			
10	Ala	Gly	Ser	Lys	Leu	Val	Leu	Arg	Cys	Glu	Thr	Ser	Ser	Glu	Tyr	Ser
		50					55						60			
	Ser	Leu	Arg	Phe	Lys	Trp	Phe	Lys	Asn	Gly	Asn	Glu	Leu	Asn	Arg	Lys
15	65					70					75					80
	Asn	Lys	Pro	Gln	Asn	Ile	Lys	Ile	Gln	Lys	Lys	Pro	Gly	Lys	Ser	Glu
				85						90					95	
20	Leu	Arg	Ile	Asn	Lys	Ala	Ser	Leu	Ala	Asp	Ser	Gly	Glu	Tyr	Met	Cys

ES 2 883 159 T3

					100					105					110			
	Lys	Val	Ile	Ser	Lys	Leu	Gly	Asn	Asp	Ser	Ala	Ser	Ala	Asn	Ile	Thr		
			115					120					125					
5																		
	Ile	Val	Glu	Ser	Asn	Glu	Ile	Ile	Thr	Gly	Met	Pro	Ala	Ser	Thr	Glu		
		130					135					140						
10																		
	Gly	Ala	Tyr	Val	Ser	Ser	Glu	Ser	Pro	Ile	Arg	Ile	Ser	Val	Ser	Thr		
	145					150					155					160		
	Glu	Gly	Ala	Asn	Thr	Ser	Ser	Ser	Thr	Ser	Thr	Ser	Thr	Thr	Gly	Thr		
				165						170					175			
15																		
	Ser	His	Leu	Val	Lys	Cys	Ala	Glu	Lys	Glu	Lys	Thr	Phe	Cys	Val	Asn		
				180					185					190				
20																		
	Gly	Gly	Glu	Cys	Phe	Met	Val	Lys	Asp	Leu	Ser	Asn	Pro	Ser	Arg	Tyr		
			195					200					205					
	Leu	Cys	Lys	Cys	Pro	Asn	Glu	Phe	Thr	Gly	Asp	Arg	Cys	Gln	Asn	Tyr		
		210					215					220						
25																		
	Val	Met	Ala	Ser	Phe	Tyr	Lys	Ala	Glu	Glu	Leu	Tyr	Gln	Lys	Arg	Val		
	225					230					235					240		
	Leu	Thr	Ile	Thr	Gly	Ile	Cys	Ile	Ala	Leu	Leu	Val	Val	Gly	Ile	Met		
					245					250					255			
30																		
	Cys	Val	Val	Ala	Tyr	Cys	Lys	Thr	Lys	Lys	Gln	Arg	Lys	Lys	Leu	His		
				260					265					270				
35																		
	Asp	Arg	Leu	Arg	Gln	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Arg	Asn	Asn	Met	Met	Asn		
			275					280					285					
	Ile	Ala	Asn	Gly	Pro	His	His	Pro	Asn	Pro	Pro	Pro	Glu	Asn	Val	Gln		
		290					295						300					
40																		
	Leu	Val	Asn	Gln	Tyr	Val	Ser	Lys	Asn	Val	Ile	Ser	Ser	Glu	His	Ile		
		305				310					315					320		
	Val	Glu	Arg	Glu	Ala	Glu	Thr	Ser	Phe	Ser	Thr	Ser	His	Tyr	Thr	Ser		
					325					330					335			
45																		
	Thr	Ala	His	His	Ser	Thr	Thr	Val	Thr	Gln	Thr	Pro	Ser	His	Ser	Trp		
				340					345					350				
50																		
	Ser	Asn	Gly	His	Thr	Glu	Ser	Ile	Leu	Ser	Glu	Ser	His	Ser	Val	Ile		
			355					360					365					
	Val	Met	Ser	Ser	Val	Glu	Asn	Ser	Arg	His	Ser	Ser	Pro	Thr	Gly	Gly		
		370					375					380						
55																		
	Pro	Arg	Gly	Arg	Leu	Asn	Gly	Thr	Gly	Gly	Pro	Arg	Glu	Cys	Asn	Ser		
						390					395					400		
60																		
	Phe	Leu	Arg	His	Ala	Arg	Glu	Thr	Pro	Asp	Ser	Tyr	Arg	Asp	Ser	Pro		
					405					410					415			
	His	Ser	Glu	Arg														
				420														
65																		

ES 2 883 159 T3

<210> 10  
 <211> 211  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 5  
 <400> 10  
 Met Ser Glu Arg Lys Glu Gly Arg Gly Lys Gly Lys Gly Lys Lys Lys  
 1 5 10 15  
 Glu Arg Gly Ser Gly Lys Lys Pro Glu Ser Ala Ala Gly Ser Gln Ser  
 20 25 30  
 Pro Ala Leu Pro Pro Arg Leu Lys Glu Met Lys Ser Gln Glu Ser Ala  
 35 40 45  
 Ala Gly Ser Lys Leu Val Leu Arg Cys Glu Thr Ser Ser Glu Tyr Ser  
 50 55 60  
 Ser Leu Arg Phe Lys Trp Phe Lys Asn Gly Asn Glu Leu Asn Arg Lys  
 65 70 75 80  
 Asn Lys Pro Gln Asn Ile Lys Ile Gln Lys Lys Pro Gly Lys Ser Glu  
 85 90 95  
 Leu Arg Ile Asn Lys Ala Ser Leu Ala Asp Ser Gly Glu Tyr Met Cys  
 100 105 110  
 Lys Val Ile Ser Lys Leu Gly Asn Asp Ser Ala Ser Ala Asn Ile Thr  
 115 120 125  
 Ile Val Glu Ser Asn Glu Ile Ile Thr Gly Met Pro Ala Ser Thr Glu  
 130 135 140  
 Gly Ala Tyr Val Ser Ser Glu Ser Pro Ile Arg Ile Ser Val Ser Thr  
 145 150 155 160  
 Glu Gly Ala Asn Thr Ser Ser Ser Thr Ser Thr Ser Thr Thr Gly Thr  
 165 170 175  
 Ser His Leu Val Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn  
 180 185 190  
 Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr  
 195 200 205  
 Leu Cys Lys  
 210  
 <210> 11  
 <211> 645  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 55  
 <400> 11



ES 2 883 159 T3

	50					55						60				
	Ser	Leu	Arg	Phe	Lys	Trp	Phe	Lys	Asn	Gly	Asn	Glu	Leu	Asn	Arg	Lys
5	65					70					75					80
	Asn	Lys	Pro	Gln	Asn	Ile	Lys	Ile	Gln	Lys	Lys	Pro	Gly	Lys	Ser	Glu
					85					90					95	
10	Leu	Arg	Ile	Asn	Lys	Ala	Ser	Leu	Ala	Asp	Ser	Gly	Glu	Tyr	Met	Cys
				100					105					110		
	Lys	Val	Ile	Ser	Lys	Leu	Gly	Asn	Asp	Ser	Ala	Ser	Ala	Asn	Ile	Thr
			115					120					125			
15	Ile	Val	Glu	Ser	Asn	Glu	Ile	Ile	Thr	Gly	Met	Pro	Ala	Ser	Thr	Glu
			130				135					140				
	Gly	Ala	Tyr	Val	Ser	Ser	Glu	Ser	Pro	Ile	Arg	Ile	Ser	Val	Ser	Thr
20	145					150					155					160
	Glu	Gly	Ala	Asn	Thr	Ser	Ser	Ser	Thr	Ser	Thr	Ser	Thr	Thr	Gly	Thr
					165					170					175	
25	Ser	His	Leu	Val	Lys	Cys	Ala	Glu	Lys	Glu	Lys	Thr	Phe	Cys	Val	Asn
				180					185					190		
	Gly	Gly	Glu	Cys	Phe	Met	Val	Lys	Asp	Leu	Ser	Asn	Pro	Ser	Arg	Tyr
			195					200					205			
30	Leu	Cys	Lys	Cys	Pro	Asn	Glu	Phe	Thr	Gly	Asp	Arg	Cys	Gln	Asn	Tyr
		210					215					220				
	Val	Met	Ala	Ser	Phe	Tyr	Lys	His	Leu	Gly	Ile	Glu	Phe	Met	Glu	Ala
35	225					230					235					240
	Glu	Glu	Leu	Tyr	Gln	Lys	Arg	Val	Leu	Thr	Ile	Thr	Gly	Ile	Cys	Ile
					245					250					255	
40	Ala	Leu	Leu	Val	Val	Gly	Ile	Met	Cys	Val	Val	Ala	Tyr	Cys	Lys	Thr
				260					265					270		
	Lys	Lys	Gln	Arg	Lys	Lys	Leu	His	Asp	Arg	Leu	Arg	Gln	Ser	Leu	Arg
			275					280					285			
45	Ser	Glu	Arg	Asn	Asn	Met	Met	Asn	Ile	Ala	Asn	Gly	Pro	His	His	Pro
		290				295						300				
	Asn	Pro	Pro	Pro	Glu	Asn	Val	Gln	Leu	Val	Asn	Gln	Tyr	Val	Ser	Lys
50	305					310					315					320
	Asn	Val	Ile	Ser	Ser	Glu	His	Ile	Val	Glu	Arg	Glu	Ala	Glu	Thr	Ser
					325					330					335	
55	Phe	Ser	Thr	Ser	His	Tyr	Thr	Ser	Thr	Ala	His	His	Ser	Thr	Thr	Val
				340					345					350		
	Thr	Gln	Thr	Pro	Ser	His	Ser	Trp	Ser	Asn	Gly	His	Thr	Glu	Ser	Ile
			355					360					365			
60	Leu	Ser	Glu	Ser	His	Ser	Val	Ile	Val	Met	Ser	Ser	Val	Glu	Asn	Ser
		370					375					380				
	Arg	His	Ser	Ser	Pro	Thr	Gly	Gly	Pro	Arg	Gly	Arg	Leu	Asn	Gly	Thr
65																



ES 2 883 159 T3

Met Ser Glu Arg Lys Glu Gly Arg Gly Lys Gly Lys Gly Lys Lys Lys  
1 5 10 15

5

Glu Arg Gly Ser Gly Lys Lys Pro Glu Ser Ala Ala Gly Ser Gln Ser  
20 25 30

Pro Ala Leu Pro Pro Arg Leu Lys Glu Met Lys Ser Gln Glu Ser Ala



ES 2 883 159 T3

	370					375						380					
	Pro	Arg	Gly	Arg	Leu	Asn	Gly	Thr	Gly	Gly	Pro	Arg	Glu	Cys	Asn	Ser	
5	385					390					395					400	
	Phe	Leu	Arg	His	Ala	Arg	Glu	Thr	Pro	Asp	Ser	Tyr	Arg	Asp	Ser	Pro	
					405					410					415		
10	His	Ser	Glu	Arg	Tyr	Val	Ser	Ala	Met	Thr	Thr	Pro	Ala	Arg	Met	Ser	
					420				425					430			
15	Pro	Val	Asp	Phe	His	Thr	Pro	Ser	Ser	Pro	Lys	Ser	Pro	Pro	Ser	Glu	
			435					440					445				
	Met	Ser	Pro	Pro	Val	Ser	Ser	Met	Thr	Val	Ser	Met	Pro	Ser	Met	Ala	
			450				455					460					
20	Val	Ser	Pro	Phe	Met	Glu	Glu	Glu	Arg	Pro	Leu	Leu	Leu	Val	Thr	Pro	
	465					470					475					480	
	Pro	Arg	Leu	Arg	Glu	Lys	Lys	Phe	Asp	His	His	Pro	Gln	Gln	Phe	Ser	
					485					490					495		
25	Ser	Phe	His	His	Asn	Pro	Ala	His	Asp	Ser	Asn	Ser	Leu	Pro	Ala	Ser	
					500				505					510			
30	Pro	Leu	Arg	Ile	Val	Glu	Asp	Glu	Glu	Tyr	Glu	Thr	Thr	Gln	Glu	Tyr	
			515					520					525				
	Glu	Pro	Ala	Gln	Glu	Pro	Val	Lys	Lys	Leu	Ala	Asn	Ser	Arg	Arg	Ala	
			530				535					540					
35	Lys	Arg	Thr	Lys	Pro	Asn	Gly	His	Ile	Ala	Asn	Arg	Leu	Glu	Val	Asp	
	545					550					555					560	
40	Ser	Asn	Thr	Ser	Ser	Gln	Ser	Ser	Asn	Ser	Glu	Ser	Glu	Thr	Glu	Asp	
					565					570					575		
	Glu	Arg	Val	Gly	Glu	Asp	Thr	Pro	Phe	Leu	Gly	Ile	Gln	Asn	Pro	Leu	
				580					585					590			
45	Ala	Ala	Ser	Leu	Glu	Ala	Thr	Pro	Ala	Phe	Arg	Leu	Ala	Asp	Ser	Arg	
			595					600					605				
50	Thr	Asn	Pro	Ala	Gly	Arg	Phe	Ser	Thr	Gln	Glu	Glu	Ile	Gln	Ala	Arg	
		610					615					620					
	Leu	Ser	Ser	Val	Ile	Ala	Asn	Gln	Asp	Pro	Ile	Ala	Val				
	625					630					635						

<210> 13  
 <211> 241  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 13

ES 2 883 159 T3

Met Ser Glu Arg Lys Glu Gly Arg Gly Lys Gly Lys Gly Lys Lys Lys  
 1 5 10 15  
 5 Glu Arg Gly Ser Gly Lys Lys Pro Glu Ser Ala Ala Gly Ser Gln Ser  
 20 25 30  
 Pro Ala Leu Pro Pro Arg Leu Lys Glu Met Lys Ser Gln Glu Ser Ala  
 10 35 40 45  
 Ala Gly Ser Lys Leu Val Leu Arg Cys Glu Thr Ser Ser Glu Tyr Ser  
 50 55 60  
 15 Ser Leu Arg Phe Lys Trp Phe Lys Asn Gly Asn Glu Leu Asn Arg Lys  
 65 70 75 80  
 20 Asn Lys Pro Gln Asn Ile Lys Ile Gln Lys Lys Pro Gly Lys Ser Glu  
 85 90 95  
 Leu Arg Ile Asn Lys Ala Ser Leu Ala Asp Ser Gly Glu Tyr Met Cys  
 100 105 110  
 25 Lys Val Ile Ser Lys Leu Gly Asn Asp Ser Ala Ser Ala Asn Ile Thr  
 115 120 125  
 30 Ile Val Glu Ser Asn Glu Ile Ile Thr Gly Met Pro Ala Ser Thr Glu  
 130 135 140  
 Gly Ala Tyr Val Ser Ser Glu Ser Pro Ile Arg Ile Ser Val Ser Thr  
 145 150 155 160  
 35 Glu Gly Ala Asn Thr Ser Ser Ser Thr Ser Thr Ser Thr Thr Gly Thr  
 165 170 175  
 40 Ser His Leu Val Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn  
 180 185 190  
 Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr  
 195 200 205  
 45 Leu Cys Lys Cys Pro Asn Glu Phe Thr Gly Asp Arg Cys Gln Asn Tyr  
 210 215 220  
 Val Met Ala Ser Phe Tyr Ser Thr Ser Thr Pro Phe Leu Ser Leu Pro  
 225 230 235 240  
 50 Glu

<210> 14  
 <211> 296  
 <212> PRT  
 55 <213> Homo sapiens  
 <400> 14

ES 2 883 159 T3

1 Met Glu Ile Tyr Ser Pro Asp Met Ser Glu Val Ala Ala Glu Arg Ser  
 5 Ser Ser Pro Ser Thr Gln Leu Ser Ala Asp Pro Ser Leu Asp Gly Leu  
 10 Pro Ala Ala Glu Asp Met Pro Glu Pro Gln Thr Glu Asp Gly Arg Thr  
 15 Glu Arg Leu Arg Gly Cys Leu Asn Ser Glu Lys Ile Cys Ile Val Pro  
 20 Ile Leu Ala Cys Leu Val Ser Leu Cys Leu Cys Ile Ala Gly Leu Lys  
 25 Trp Val Phe Val Asp Lys Ile Phe Glu Tyr Asp Ser Pro Thr His Leu  
 30 Asp Pro Gly Gly Leu Gly Gln Asp Pro Ile Ile Ser Leu Asp Ala Thr  
 35 Ala Ala Ser Ala Val Trp Val Ser Ser Glu Ala Tyr Thr Ser Pro Val  
 40 Ser Arg Ala Gln Ser Glu Ser Glu Val Gln Val Thr Val Gln Gly Asp  
 45 Lys Ala Val Val Ser Phe Glu Pro Ser Ala Ala Pro Thr Pro Lys Asn  
 50 Arg Ile Phe Ala Phe Ser Phe Leu Pro Ser Thr Ala Pro Ser Phe Pro  
 55 Ser Pro Thr Arg Asn Pro Glu Val Arg Thr Pro Lys Ser Ala Thr Gln  
 60 Pro Gln Thr Thr Glu Thr Asn Leu Gln Thr Ala Pro Lys Leu Ser Thr  
 65 Ser Thr Ser Thr Thr Gly Thr Ser His Leu Val Lys Cys Ala Glu Lys  
 70 Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp  
 75 Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr Leu Cys Lys Cys Pro Asn Glu Phe Thr  
 80 Gly Asp Arg Cys Gln Asn Tyr Val Met Ala Ser Phe Tyr Ser Thr Ser  
 85 Thr Pro Phe Leu Ser Leu Pro Glu  
 90 290 295

<210> 15  
 <211> 462  
 <212> PRT



ES 2 883 159 T3

					85					90					95	
	Leu	Arg	Ile	Asn	Lys	Ala	Ser	Leu	Ala	Asp	Ser	Gly	Glu	Tyr	Met	Cys
				100					105						110	
5	Lys	Val	Ile	Ser	Lys	Leu	Gly	Asn	Asp	Ser	Ala	Ser	Ala	Asn	Ile	Thr
			115					120					125			
10	Ile	Val	Glu	Ser	Asn	Glu	Ile	Ile	Thr	Gly	Met	Pro	Ala	Ser	Thr	Glu
		130					135					140				
	Gly	Ala	Tyr	Val	Ser	Ser	Glu	Ser	Pro	Ile	Arg	Ile	Ser	Val	Ser	Thr
	145					150					155					160
15	Glu	Gly	Ala	Asn	Thr	Ser	Ser	Ser	Thr	Ser	Thr	Ser	Thr	Thr	Gly	Thr
				165						170					175	
20	Ser	His	Leu	Val	Lys	Cys	Ala	Glu	Lys	Glu	Lys	Thr	Phe	Cys	Val	Asn
				180					185					190		
	Gly	Gly	Glu	Cys	Phe	Met	Val	Lys	Asp	Leu	Ser	Asn	Pro	Ser	Arg	Tyr
			195					200					205			
25	Leu	Cys	Lys	Cys	Gln	Pro	Gly	Phe	Thr	Gly	Ala	Arg	Cys	Thr	Glu	Asn
		210					215					220				
	Val	Pro	Met	Lys	Val	Gln	Asn	Gln	Glu	Lys	Ala	Glu	Glu	Leu	Tyr	Gln
	225					230					235					240
30	Lys	Arg	Val	Leu	Thr	Ile	Thr	Gly	Ile	Cys	Ile	Ala	Leu	Leu	Val	Val
					245					250					255	
	Gly	Ile	Met	Cys	Val	Val	Ala	Tyr	Cys	Lys	Thr	Lys	Lys	Gln	Arg	Lys
35				260					265					270		
	Lys	Leu	His	Asp	Arg	Leu	Arg	Gln	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Arg	Asn	Asn
			275					280					285			
40	Met	Met	Asn	Ile	Ala	Asn	Gly	Pro	His	His	Pro	Asn	Pro	Pro	Pro	Glu
		290					295					300				
	Asn	Val	Gln	Leu	Val	Asn	Gln	Tyr	Val	Ser	Lys	Asn	Val	Ile	Ser	Ser
	305					310					315					320
45	Glu	His	Ile	Val	Glu	Arg	Glu	Ala	Glu	Thr	Ser	Phe	Ser	Thr	Ser	His
				325						330					335	
50	Tyr	Thr	Ser	Thr	Ala	His	His	Ser	Thr	Thr	Val	Thr	Gln	Thr	Pro	Ser
				340					345					350		
	His	Ser	Trp	Ser	Asn	Gly	His	Thr	Glu	Ser	Ile	Leu	Ser	Glu	Ser	His
			355					360					365			
55	Ser	Val	Ile	Val	Met	Ser	Ser	Val	Glu	Asn	Ser	Arg	His	Ser	Ser	Pro
		370					375					380				
	Thr	Gly	Gly	Pro	Arg	Gly	Arg	Leu	Asn	Gly	Thr	Gly	Gly	Pro	Arg	Glu
	385					390					395					400
60	Cys	Asn	Ser	Phe	Leu	Arg	His	Ala	Arg	Glu	Thr	Pro	Asp	Ser	Tyr	Arg
				405						410					415	
65	Asp	Ser	Pro	His	Ser	Glu	Arg	His	Asn	Leu	Ile	Ala	Glu	Leu	Arg	Arg

ES 2 883 159 T3

			420					425					430				
	Asn	Lys	Ala	His	Arg	Ser	Lys	Cys	Met	Gln	Ile	Gln	Leu	Ser	Ala	Thr	
5			435					440					445				
	His	Leu	Arg	Ser	Ser	Ser	Ile	Pro	His	Leu	Gly	Phe	Ile	Leu			
		450					455					460					
10	<210>	16															
	<211>	422															
	<212>	PRT															
	<213>	Homo sapiens															
15	<400>	16															

ES 2 883 159 T3

	Met	Arg	Trp	Arg	Arg	Ala	Pro	Arg	Arg	Ser	Gly	Arg	Pro	Gly	Pro	Arg
	1				5					10					15	
5	Ala	Gln	Arg	Pro	Gly	Ser	Ala	Ala	Arg	Ser	Ser	Pro	Pro	Leu	Pro	Leu
				20					25					30		
	Leu	Pro	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Ala	Pro	Gly	Ala
			35					40					45			
10	Ala	Ala	Gly	Asn	Glu	Ala	Ala	Pro	Ala	Gly	Ala	Ser	Val	Cys	Tyr	Ser
		50					55					60				
15	Ser	Pro	Pro	Ser	Val	Gly	Ser	Val	Gln	Glu	Leu	Ala	Gln	Arg	Ala	Ala
	65					70					75					80
	Val	Val	Ile	Glu	Gly	Lys	Val	His	Pro	Gln	Arg	Arg	Gln	Gln	Gly	Ala
					85					90					95	
20	Leu	Asp	Arg	Lys	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Gly	Glu	Ala	Gly	Ala	Trp	Gly
				100					105					110		
25	Gly	Asp	Arg	Glu	Pro	Pro	Ala	Ala	Gly	Pro	Arg	Ala	Leu	Gly	Pro	Pro
			115					120					125			
	Ala	Glu	Glu	Pro	Leu	Leu	Ala	Ala	Asn	Gly	Thr	Val	Pro	Ser	Trp	Pro
		130					135					140				
30	Thr	Ala	Pro	Val	Pro	Ser	Ala	Gly	Glu	Pro	Gly	Glu	Glu	Ala	Pro	Tyr
	145					150					155					160
35	Leu	Val	Lys	Val	His	Gln	Val	Trp	Ala	Val	Lys	Ala	Gly	Gly	Leu	Lys
					165					170					175	
	Lys	Asp	Ser	Leu	Leu	Thr	Val	Arg	Leu	Gly	Thr	Trp	Gly	His	Pro	Ala
				180					185					190		
40	Phe	Pro	Ser	Cys	Gly	Arg	Leu	Lys	Glu	Asp	Ser	Arg	Tyr	Ile	Phe	Phe
			195					200					205			
45	Met	Glu	Pro	Asp	Ala	Asn	Ser	Thr	Ser	Arg	Ala	Pro	Ala	Ala	Phe	Arg
		210					215					220				
	Ala	Ser	Phe	Pro	Pro	Leu	Glu	Thr	Gly	Arg	Asn	Leu	Lys	Lys	Glu	Val
	225					230					235					240
50	Ser	Arg	Val	Leu	Cys	Lys	Arg	Cys	Ala	Leu	Pro	Pro	Arg	Leu	Lys	Glu
					245					250					255	
	Met	Lys	Ser	Gln	Glu	Ser	Ala	Ala	Gly	Ser	Lys	Leu	Val	Leu	Arg	Cys

ES 2 883 159 T3

				260					265					270			
				Glu Thr Ser Ser Glu Tyr Ser Ser Leu Arg Phe Lys Trp Phe Lys Asn													
				275					280					285			
5																	
				Gly Asn Glu Leu Asn Arg Lys Asn Lys Pro Gln Asn Ile Lys Ile Gln													
				290					295					300			
10				Lys Lys Pro Gly Lys Ser Glu Leu Arg Ile Asn Lys Ala Ser Leu Ala													
				305					310					315			320
				Asp Ser Gly Glu Tyr Met Cys Lys Val Ile Ser Lys Leu Gly Asn Asp													
				325										330			335
15																	
				Ser Ala Ser Ala Asn Ile Thr Ile Val Glu Ser Asn Ala Thr Ser Thr													
				340										345			350
20				Ser Thr Thr Gly Thr Ser His Leu Val Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys													
				355										360			365
				Thr Phe Cys Val Asn Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser													
				370										375			380
25				Asn Pro Ser Arg Tyr Leu Cys Lys Cys Pro Asn Glu Phe Thr Gly Asp													
				385										390			395
				Arg Cys Gln Asn Tyr Val Met Ala Ser Phe Tyr Ser Thr Ser Thr Pro													
				405										410			415
30																	
				Phe Leu Ser Leu Pro Glu													
				420													
35				<210> 17													
				<211> 640													
				<212> PRT													
				<213> Homo sapiens													
40				<400> 17													

ES 2 883 159 T3

	Met	Ser	Glu	Arg	Lys	Glu	Gly	Arg	Gly	Lys	Gly	Lys	Gly	Lys	Lys	Lys
	1				5					10					15	
5	Glu	Arg	Gly	Ser	Gly	Lys	Lys	Pro	Glu	Ser	Ala	Ala	Gly	Ser	Gln	Ser
				20					25					30		
	Pro	Ala	Leu	Pro	Pro	Arg	Leu	Lys	Glu	Met	Lys	Ser	Gln	Glu	Ser	Ala
			35					40					45			
10	Ala	Gly	Ser	Lys	Leu	Val	Leu	Arg	Cys	Glu	Thr	Ser	Ser	Glu	Tyr	Ser
		50					55						60			
	Ser	Leu	Arg	Phe	Lys	Trp	Phe	Lys	Asn	Gly	Asn	Glu	Leu	Asn	Arg	Lys
15	65					70					75					80
	Asn	Lys	Pro	Gln	Asn	Ile	Lys	Ile	Gln	Lys	Lys	Pro	Gly	Lys	Ser	Glu
				85						90					95	
20	Leu	Arg	Ile	Asn	Lys	Ala	Ser	Leu	Ala	Asp	Ser	Gly	Glu	Tyr	Met	Cys
				100					105					110		
	Lys	Val	Ile	Ser	Lys	Leu	Gly	Asn	Asp	Ser	Ala	Ser	Ala	Asn	Ile	Thr
25			115					120					125			
	Ile	Val	Glu	Ser	Asn	Glu	Ile	Ile	Thr	Gly	Met	Pro	Ala	Ser	Thr	Glu

ES 2 883 159 T3

				130				135						140					
	Gly	Ala	Tyr	Val	Ser	Ser	Glu	Ser	Pro	Ile	Arg	Ile	Ser	Val	Ser	Thr			
5	145					150					155					160			
	Glu	Gly	Ala	Asn	Thr	Ser	Ser	Ser	Thr	Ser	Thr	Ser	Thr	Thr	Gly	Thr			
				165						170					175				
	Ser	His	Leu	Val	Lys	Cys	Ala	Glu	Lys	Glu	Lys	Thr	Phe	Cys	Val	Asn			
10				180					185					190					
	Gly	Gly	Glu	Cys	Phe	Met	Val	Lys	Asp	Leu	Ser	Asn	Pro	Ser	Arg	Tyr			
			195					200					205						
	Leu	Cys	Lys	Cys	Gln	Pro	Gly	Phe	Thr	Gly	Ala	Arg	Cys	Thr	Glu	Asn			
15		210					215					220							
	Val	Pro	Met	Lys	Val	Gln	Asn	Gln	Glu	Lys	Ala	Glu	Glu	Leu	Tyr	Gln			
20	225					230					235					240			
	Lys	Arg	Val	Leu	Thr	Ile	Thr	Gly	Ile	Cys	Ile	Ala	Leu	Leu	Val	Val			
				245						250					255				
	Gly	Ile	Met	Cys	Val	Val	Ala	Tyr	Cys	Lys	Thr	Lys	Lys	Gln	Arg	Lys			
25				260					265					270					
	Lys	Leu	His	Asp	Arg	Leu	Arg	Gln	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Arg	Asn	Asn			
			275					280					285						
30	Met	Met	Asn	Ile	Ala	Asn	Gly	Pro	His	His	Pro	Asn	Pro	Pro	Pro	Glu			
	290						295					300							
	Asn	Val	Gln	Leu	Val	Asn	Gln	Tyr	Val	Ser	Lys	Asn	Val	Ile	Ser	Ser			
35	305					310					315					320			
	Glu	His	Ile	Val	Glu	Arg	Glu	Ala	Glu	Thr	Ser	Phe	Ser	Thr	Ser	His			
				325						330					335				
	Tyr	Thr	Ser	Thr	Ala	His	His	Ser	Thr	Thr	Val	Thr	Gln	Thr	Pro	Ser			
40				340					345					350					
	His	Ser	Trp	Ser	Asn	Gly	His	Thr	Glu	Ser	Ile	Leu	Ser	Glu	Ser	His			
			355					360					365						
45	Ser	Val	Ile	Val	Met	Ser	Ser	Val	Glu	Asn	Ser	Arg	His	Ser	Ser	Pro			
		370					375					380							
	Thr	Gly	Gly	Pro	Arg	Gly	Arg	Leu	Asn	Gly	Thr	Gly	Gly	Pro	Arg	Glu			
50	385					390					395					400			
	Cys	Asn	Ser	Phe	Leu	Arg	His	Ala	Arg	Glu	Thr	Pro	Asp	Ser	Tyr	Arg			
				405						410					415				
	Asp	Ser	Pro	His	Ser	Glu	Arg	Tyr	Val	Ser	Ala	Met	Thr	Thr	Pro	Ala			
55				420					425					430					
	Arg	Met	Ser	Pro	Val	Asp	Phe	His	Thr	Pro	Ser	Ser	Pro	Lys	Ser	Pro			
			435					440					445						
60	Pro	Ser	Glu	Met	Ser	Pro	Pro	Val	Ser	Ser	Met	Thr	Val	Ser	Met	Pro			
		450					455					460							
	Ser	Met	Ala	Val	Ser	Pro	Phe	Met	Glu	Glu	Glu	Arg	Pro	Leu	Leu	Leu			
65																			

ES 2 883 159 T3

	465				470					475					480	
	Val	Thr	Pro	Pro	Arg	Leu	Arg	Glu	Lys	Lys	Phe	Asp	His	His	Pro	Gln
5					485					490					495	
	Gln	Phe	Ser	Ser	Phe	His	His	Asn	Pro	Ala	His	Asp	Ser	Asn	Ser	Leu
				500					505					510		
10	Pro	Ala	Ser	Pro	Leu	Arg	Ile	Val	Glu	Asp	Glu	Glu	Tyr	Glu	Thr	Thr
			515					520					525			
	Gln	Glu	Tyr	Glu	Pro	Ala	Gln	Glu	Pro	Val	Lys	Lys	Leu	Ala	Asn	Ser
15		530					535				540					
	Arg	Arg	Ala	Lys	Arg	Thr	Lys	Pro	Asn	Gly	His	Ile	Ala	Asn	Arg	Leu
	545					550					555				560	
20	Glu	Val	Asp	Ser	Asn	Thr	Ser	Ser	Gln	Ser	Ser	Asn	Ser	Glu	Ser	Glu
					565					570					575	
	Thr	Glu	Asp	Glu	Arg	Val	Gly	Glu	Asp	Thr	Pro	Phe	Leu	Gly	Ile	Gln
				580					585					590		
25	Asn	Pro	Leu	Ala	Ala	Ser	Leu	Glu	Ala	Thr	Pro	Ala	Phe	Arg	Leu	Ala
			595					600					605			
	Asp	Ser	Arg	Thr	Asn	Pro	Ala	Gly	Arg	Phe	Ser	Thr	Gln	Glu	Glu	Ile
30		610					615					620				
	Gln	Ala	Arg	Leu	Ser	Ser	Val	Ile	Ala	Asn	Gln	Asp	Pro	Ile	Ala	Val
	625					630					635				640	
35	<210> 18															
	<211> 784															
	<212> PRT															
	<213> Homo sapiens															
40	<400> 18															

ES 2 883 159 T3

	Met	Arg	Gln	Val	Cys	Cys	Ser	Ala	Leu	Pro	Pro	Pro	Pro	Leu	Glu	Lys
	1				5					10					15	
5	Gly	Arg	Cys	Ser	Ser	Tyr	Ser	Asp	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Glu	Arg
			20					25						30		
	Ser	Glu	Ser	Gly	Ser	Ser	Ser	Arg								
			35					40					45			
10	Ser	Ser	Ser	Asn	Asn	Ser	Ser	Ile	Ser	Arg	Pro	Ala	Ala	Pro	Pro	Glu
			50				55					60				
15	Pro	Arg	Pro	Gln	Gln	Gln	Pro	Gln	Pro	Arg	Ser	Pro	Ala	Ala	Arg	Arg
	65					70					75					80
	Ala	Ala	Ala	Arg	Ser	Arg	Ala	Ala	Ala	Ala	Gly	Gly	Met	Arg	Arg	Asp
				85						90					95	
20	Pro	Ala	Pro	Gly	Phe	Ser	Met	Leu	Leu	Phe	Gly	Val	Ser	Leu	Ala	Cys
				100					105					110		
25	Tyr	Ser	Pro	Ser	Leu	Lys	Ser	Val	Gln	Asp	Gln	Ala	Tyr	Lys	Ala	Pro
			115					120					125			
	Val	Val	Val	Glu	Gly	Lys	Val	Gln	Gly	Leu	Val	Pro	Ala	Gly	Gly	Ser

ES 2 883 159 T3

		130				135						140					
		Ser	Ser	Asn	Ser	Thr	Arg	Glu	Pro	Pro	Ala	Ser	Gly	Arg	Val	Ala	Leu
		145					150					155					160
5		Val	Lys	Val	Leu	Asp	Lys	Trp	Pro	Leu	Arg	Ser	Gly	Gly	Leu	Gln	Arg
					165						170					175	
		Glu	Gln	Val	Ile	Ser	Val	Gly	Ser	Cys	Val	Pro	Leu	Glu	Arg	Asn	Gln
10					180					185					190		
		Arg	Tyr	Ile	Phe	Phe	Leu	Glu	Pro	Thr	Glu	Gln	Pro	Leu	Val	Phe	Lys
				195					200					205			
15		Thr	Ala	Phe	Ala	Pro	Leu	Asp	Thr	Asn	Gly	Lys	Asn	Leu	Lys	Lys	Glu
			210					215					220				
		Val	Gly	Lys	Ile	Leu	Cys	Thr	Asp	Cys	Ala	Thr	Arg	Pro	Lys	Leu	Lys
20		225					230					235					240
		Lys	Met	Lys	Ser	Gln	Thr	Gly	Gln	Val	Gly	Glu	Lys	Gln	Ser	Leu	Lys
					245						250					255	
25		Cys	Glu	Ala	Ala	Ala	Gly	Asn	Pro	Gln	Pro	Ser	Tyr	Arg	Trp	Phe	Lys
					260					265					270		
		Asp	Gly	Lys	Glu	Leu	Asn	Arg	Ser	Arg	Asp	Ile	Arg	Ile	Lys	Tyr	Gly
				275					280					285			
30		Asn	Gly	Arg	Lys	Asn	Ser	Arg	Leu	Gln	Phe	Asn	Lys	Val	Lys	Val	Glu
			290					295					300				
		Asp	Ala	Gly	Glu	Tyr	Val	Cys	Glu	Ala	Glu	Asn	Ile	Leu	Gly	Lys	Asp
35		305					310					315					320
		Thr	Val	Arg	Gly	Arg	Leu	Tyr	Val	Asn	Ser	Glu	Ala	Glu	Glu	Leu	Tyr
					325						330					335	
40		Gln	Lys	Arg	Val	Leu	Thr	Ile	Thr	Gly	Ile	Cys	Val	Ala	Leu	Leu	Val
					340					345					350		
		Val	Gly	Ile	Val	Cys	Val	Val	Ala	Tyr	Cys	Lys	Thr	Lys	Lys	Gln	Arg
				355					360					365			
45		Lys	Gln	Met	His	Asn	His	Leu	Arg	Gln	Asn	Met	Cys	Pro	Ala	His	Gln
			370					375					380				
		Asn	Arg	Ser	Leu	Ala	Asn	Gly	Pro	Ser	His	Pro	Arg	Leu	Asp	Pro	Glu
50		385					390					395					400
		Glu	Ile	Gln	Met	Ala	Asp	Tyr	Ile	Ser	Lys	Asn	Val	Pro	Ala	Thr	Asp
					405						410					415	
55		His	Val	Ile	Arg	Arg	Glu	Thr	Glu	Thr	Thr	Phe	Ser	Gly	Ser	His	Ser
					420					425					430		
		Cys	Ser	Pro	Ser	His	His	Cys	Ser	Thr	Ala	Thr	Pro	Thr	Ser	Ser	His
				435					440					445			
60		Arg	His	Glu	Ser	His	Thr	Trp	Ser	Leu	Glu	Arg	Ser	Glu	Ser	Leu	Thr
			450					455					460				
65		Ser	Asp	Ser	Gln	Ser	Gly	Ile	Met	Leu	Ser	Ser	Val	Gly	Thr	Ser	Lys

ES 2 883 159 T3

	465				470					475				480		
5	Cys	Asn	Ser	Pro	Ala	Cys	Val	Glu	Ala	Arg	Ala	Arg	Arg	Ala	Ala	Ala
					485					490				495		
	Tyr	Asn	Leu	Glu	Glu	Arg	Arg	Arg	Ala	Thr	Ala	Pro	Pro	Tyr	His	Asp
				500					505					510		
10	Ser	Val	Asp	Ser	Leu	Arg	Asp	Ser	Pro	His	Ser	Glu	Arg	Tyr	Val	Ser
			515					520					525			
	Ala	Leu	Thr	Thr	Pro	Ala	Arg	Leu	Ser	Pro	Val	Asp	Phe	His	Tyr	Ser
15		530					535					540				
	Leu	Ala	Thr	Gln	Val	Pro	Thr	Phe	Glu	Ile	Thr	Ser	Pro	Asn	Ser	Ala
	545					550					555					560
20	His	Ala	Val	Ser	Leu	Pro	Pro	Ala	Ala	Pro	Ile	Ser	Tyr	Arg	Leu	Ala
					565					570					575	
	Glu	Gln	Gln	Pro	Leu	Leu	Arg	His	Pro	Ala	Pro	Pro	Gly	Pro	Gly	Pro
				580					585					590		
25	Gly	Pro	Gly	Pro	Gly	Pro	Gly	Pro	Gly	Ala	Asp	Met	Gln	Arg	Ser	Tyr
			595					600					605			
30	Asp	Ser	Tyr	Tyr	Tyr	Pro	Ala	Ala	Gly	Pro	Gly	Pro	Arg	Arg	Gly	Thr
		610					615					620				
	Cys	Ala	Leu	Gly	Gly	Ser	Leu	Gly	Ser	Leu	Pro	Ala	Ser	Pro	Phe	Arg
	625					630					635					640
35	Ile	Pro	Glu	Asp	Asp	Glu	Tyr	Glu	Thr	Thr	Gln	Glu	Cys	Ala	Pro	Pro
					645					650					655	
40	Pro	Pro	Pro	Arg	Pro	Arg	Ala	Arg	Gly	Ala	Ser	Arg	Arg	Thr	Ser	Ala
				660					665					670		
	Gly	Pro	Arg	Arg	Trp	Arg	Arg	Ser	Arg	Leu	Asn	Gly	Leu	Ala	Ala	Gln
			675					680					685			
45	Arg	Ala	Arg	Ala	Ala	Arg	Asp	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Ser	Gly	Ser	Gly
	690						695					700				
50	Gly	Gly	Ser	Ala	Ser	Ala	Ser	Asp	Asp	Asp	Ala	Asp	Asp	Ala	Asp	Gly
	705					710					715				720	
	Ala	Leu	Ala	Ala	Glu	Ser	Thr	Pro	Phe	Leu	Gly	Leu	Arg	Gly	Ala	His
					725					730					735	
55	Asp	Ala	Leu	Arg	Ser	Asp	Ser	Pro	Pro	Leu	Cys	Pro	Ala	Ala	Asp	Ser
				740					745					750		
60	Arg	Thr	Tyr	Tyr	Ser	Leu	Asp	Ser	His	Ser	Thr	Arg	Ala	Ser	Ser	Arg
			755					760					765			
	His	Ser	Arg	Gly	Pro	Pro	Pro	Arg	Ala	Lys	Gln	Asp	Ser	Ala	Pro	Leu
	770						775					780				

<210> 19  
 <211> 850

<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 19

5

ES 2 883 159 T3

	Met	Arg	Gln	Val	Cys	Cys	Ser	Ala	Leu	Pro	Pro	Pro	Pro	Leu	Glu	Lys
	1				5					10					15	
5	Gly	Arg	Cys	Ser	Ser	Tyr	Ser	Asp	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Glu	Arg
				20					25					30		
	Ser	Glu	Ser	Gly	Ser	Ser	Ser	Arg								
			35					40					45			
10	Ser	Ser	Ser	Asn	Asn	Ser	Ser	Ile	Ser	Arg	Pro	Ala	Ala	Pro	Pro	Glu
		50					55					60				
15	Pro	Arg	Pro	Gln	Gln	Gln	Pro	Gln	Pro	Arg	Ser	Pro	Ala	Ala	Arg	Arg
	65					70					75					80
	Ala	Ala	Ala	Arg	Ser	Arg	Ala	Ala	Ala	Ala	Gly	Gly	Met	Arg	Arg	Asp
					85					90					95	
20	Pro	Ala	Pro	Gly	Phe	Ser	Met	Leu	Leu	Phe	Gly	Val	Ser	Leu	Ala	Cys
				100					105						110	
	Tyr	Ser	Pro	Ser	Leu	Lys	Ser	Val	Gln	Asp	Gln	Ala	Tyr	Lys	Ala	Pro
25			115					120					125			
	Val	Val	Val	Glu	Gly	Lys	Val	Gln	Gly	Leu	Val	Pro	Ala	Gly	Gly	Ser
		130					135					140				
30	Ser	Ser	Asn	Ser	Thr	Arg	Glu	Pro	Pro	Ala	Ser	Gly	Arg	Val	Ala	Leu
	145					150					155					160
	Val	Lys	Val	Leu	Asp	Lys	Trp	Pro	Leu	Arg	Ser	Gly	Gly	Leu	Gln	Arg
					165					170					175	
35	Glu	Gln	Val	Ile	Ser	Val	Gly	Ser	Cys	Val	Pro	Leu	Glu	Arg	Asn	Gln
				180					185					190		
40	Arg	Tyr	Ile	Phe	Phe	Leu	Glu	Pro	Thr	Glu	Gln	Pro	Leu	Val	Phe	Lys
			195					200					205			
	Thr	Ala	Phe	Ala	Pro	Leu	Asp	Thr	Asn	Gly	Lys	Asn	Leu	Lys	Lys	Glu
		210					215					220				
45	Val	Gly	Lys	Ile	Leu	Cys	Thr	Asp	Cys	Ala	Thr	Arg	Pro	Lys	Leu	Lys
	225					230					235					240
	Lys	Met	Lys	Ser	Gln	Thr	Gly	Gln	Val	Gly	Glu	Lys	Gln	Ser	Leu	Lys
50					245					250					255	
	Cys	Glu	Ala	Ala	Ala	Gly	Asn	Pro	Gln	Pro	Ser	Tyr	Arg	Trp	Phe	Lys
				260					265					270		
55	Asp	Gly	Lys	Glu	Leu	Asn	Arg	Ser	Arg	Asp	Ile	Arg	Ile	Lys	Tyr	Gly
			275					280					285			
	Asn	Gly	Arg	Lys	Asn	Ser	Arg	Leu	Gln	Phe	Asn	Lys	Val	Lys	Val	Glu
		290					295					300				
60	Asp	Ala	Gly	Glu	Tyr	Val	Cys	Glu	Ala	Glu	Asn	Ile	Leu	Gly	Lys	Asp
	305					310					315					320
65	Thr	Val	Arg	Gly	Arg	Leu	Tyr	Val	Asn	Ser	Val	Ser	Thr	Thr	Leu	Ser

ES 2 883 159 T3

					325					330					335			
	Ser	Trp	Ser	Gly	His	Ala	Arg	Lys	Cys	Asn	Glu	Thr	Ala	Lys	Ser	Tyr		
5				340					345					350				
	Cys	Val	Asn	Gly	Gly	Val	Cys	Tyr	Tyr	Ile	Glu	Gly	Ile	Asn	Gln	Leu		
			355					360					365					
10	Ser	Cys	Lys	Cys	Pro	Asn	Gly	Phe	Phe	Gly	Gln	Arg	Cys	Leu	Glu	Lys		
		370					375					380						
	Leu	Pro	Leu	Arg	Leu	Tyr	Met	Pro	Asp	Pro	Lys	Gln	Lys	Ala	Glu	Glu		
	385					390					395				400			
15	Leu	Tyr	Gln	Lys	Arg	Val	Leu	Thr	Ile	Thr	Gly	Ile	Cys	Val	Ala	Leu		
					405					410					415			
	Leu	Val	Val	Gly	Ile	Val	Cys	Val	Val	Ala	Tyr	Cys	Lys	Thr	Lys	Lys		
20				420					425					430				
	Gln	Arg	Lys	Gln	Met	His	Asn	His	Leu	Arg	Gln	Asn	Met	Cys	Pro	Ala		
			435					440					445					
25	His	Gln	Asn	Arg	Ser	Leu	Ala	Asn	Gly	Pro	Ser	His	Pro	Arg	Leu	Asp		
	450						455					460						
	Pro	Glu	Glu	Ile	Gln	Met	Ala	Asp	Tyr	Ile	Ser	Lys	Asn	Val	Pro	Ala		
	465					470					475				480			
30	Thr	Asp	His	Val	Ile	Arg	Arg	Glu	Thr	Glu	Thr	Thr	Phe	Ser	Gly	Ser		
					485					490					495			
	His	Ser	Cys	Ser	Pro	Ser	His	His	Cys	Ser	Thr	Ala	Thr	Pro	Thr	Ser		
35				500					505					510				
	Ser	His	Arg	His	Glu	Ser	His	Thr	Trp	Ser	Leu	Glu	Arg	Ser	Glu	Ser		
			515					520					525					
40	Leu	Thr	Ser	Asp	Ser	Gln	Ser	Gly	Ile	Met	Leu	Ser	Ser	Val	Gly	Thr		
		530					535					540						
	Ser	Lys	Cys	Asn	Ser	Pro	Ala	Cys	Val	Glu	Ala	Arg	Ala	Arg	Arg	Ala		
	545					550					555				560			
45	Ala	Ala	Tyr	Asn	Leu	Glu	Glu	Arg	Arg	Arg	Ala	Thr	Ala	Pro	Pro	Tyr		
					565					570					575			
	His	Asp	Ser	Val	Asp	Ser	Leu	Arg	Asp	Ser	Pro	His	Ser	Glu	Arg	Tyr		
50				580					585					590				
	Val	Ser	Ala	Leu	Thr	Thr	Pro	Ala	Arg	Leu	Ser	Pro	Val	Asp	Phe	His		
			595					600					605					
55	Tyr	Ser	Leu	Ala	Thr	Gln	Val	Pro	Thr	Phe	Glu	Ile	Thr	Ser	Pro	Asn		
		610					615					620						
	Ser	Ala	His	Ala	Val	Ser	Leu	Pro	Pro	Ala	Ala	Pro	Ile	Ser	Tyr	Arg		
	625					630					635				640			
60	Leu	Ala	Glu	Gln	Gln	Pro	Leu	Leu	Arg	His	Pro	Ala	Pro	Pro	Gly	Pro		
					645					650					655			
	Gly	Pro	Gly	Ala	Asp	Met	Gln	Arg										
65																		

ES 2 883 159 T3

	660				665				670							
5	Ser	Tyr	Asp	Ser	Tyr	Tyr	Tyr	Pro	Ala	Ala	Gly	Pro	Gly	Pro	Arg	Arg
			675					680					685			
	Gly	Thr	Cys	Ala	Leu	Gly	Gly	Ser	Leu	Gly	Ser	Leu	Pro	Ala	Ser	Pro
		690					695					700				
10	Phe	Arg	Ile	Pro	Glu	Asp	Asp	Glu	Tyr	Glu	Thr	Thr	Gln	Glu	Cys	Ala
	705					710					715					720
	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Arg	Pro	Arg	Ala	Arg	Gly	Ala	Ser	Arg	Arg	Thr
15					725					730					735	
	Ser	Ala	Gly	Pro	Arg	Arg	Trp	Arg	Arg	Ser	Arg	Leu	Asn	Gly	Leu	Ala
				740						745				750		
20	Ala	Gln	Arg	Ala	Arg	Ala	Ala	Arg	Asp	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Ser	Gly
			755					760					765			
	Ser	Gly	Gly	Gly	Ser	Ala	Ser	Ala	Ser	Asp	Asp	Asp	Ala	Asp	Asp	Ala
25		770					775					780				
	Asp	Gly	Ala	Leu	Ala	Ala	Glu	Ser	Thr	Pro	Phe	Leu	Gly	Leu	Arg	Gly
	785					790					795					800
30	Ala	His	Asp	Ala	Leu	Arg	Ser	Asp	Ser	Pro	Pro	Leu	Cys	Pro	Ala	Ala
				805						810					815	
	Asp	Ser	Arg	Thr	Tyr	Tyr	Ser	Leu	Asp	Ser	His	Ser	Thr	Arg	Ala	Ser
				820						825				830		
35	Ser	Arg	His	Ser	Arg	Gly	Pro	Pro	Pro	Arg	Ala	Lys	Gln	Asp	Ser	Ala
			835					840					845			
40	Pro	Leu														
		850														
	<210>	20														
	<211>	844														
	<212>	PRT														
	<213>	Homo sapiens														
45	<400>	20														

ES 2 883 159 T3

	Met	Arg	Gln	Val	Cys	Cys	Ser	Ala	Leu	Pro	Pro	Pro	Pro	Leu	Glu	Lys
	1				5					10					15	
5	Gly	Arg	Cys	Ser	Ser	Tyr	Ser	Asp	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Glu	Arg
			20					25						30		
	Ser	Glu	Ser	Gly	Ser	Ser	Ser	Arg								
			35					40					45			
10	Ser	Ser	Ser	Asn	Asn	Ser	Ser	Ile	Ser	Arg	Pro	Ala	Ala	Pro	Pro	Glu
			50				55					60				
	Pro	Arg	Pro	Gln	Gln	Gln	Pro	Gln	Pro	Arg	Ser	Pro	Ala	Ala	Arg	Arg
15	65					70					75					80
	Ala	Ala	Ala	Arg	Ser	Arg	Ala	Ala	Ala	Ala	Gly	Gly	Met	Arg	Arg	Asp
				85						90					95	
20	Pro	Ala	Pro	Gly	Phe	Ser	Met	Leu	Leu	Phe	Gly	Val	Ser	Leu	Ala	Cys







ES 2 883 159 T3

	Met	Arg	Gln	Val	Cys	Cys	Ser	Ala	Leu	Pro	Pro	Pro	Pro	Leu	Glu	Lys
	1				5					10					15	
5	Gly	Arg	Cys	Ser	Ser	Tyr	Ser	Asp	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Glu	Arg
				20					25						30	
	Ser	Glu	Ser	Gly	Ser	Ser	Ser	Arg								
			35					40					45			
10	Ser	Ser	Ser	Asn	Asn	Ser	Ser	Ile	Ser	Arg	Pro	Ala	Ala	Pro	Pro	Glu
		50					55					60				
15	Pro	Arg	Pro	Gln	Gln	Gln	Pro	Gln	Pro	Arg	Ser	Pro	Ala	Ala	Arg	Arg
	65					70					75					80
	Ala	Ala	Ala	Arg	Ser	Arg	Ala	Ala	Ala	Ala	Gly	Gly	Met	Arg	Arg	Asp
					85					90					95	
20	Pro	Ala	Pro	Gly	Phe	Ser	Met	Leu	Leu	Phe	Gly	Val	Ser	Leu	Ala	Cys
				100					105					110		
25	Tyr	Ser	Pro	Ser	Leu	Lys	Ser	Val	Gln	Asp	Gln	Ala	Tyr	Lys	Ala	Pro
			115					120					125			
	Val	Val	Val	Glu	Gly	Lys	Val	Gln	Gly	Leu	Val	Pro	Ala	Gly	Gly	Ser
		130					135					140				
30	Ser	Ser	Asn	Ser	Thr	Arg	Glu	Pro	Pro	Ala	Ser	Gly	Arg	Val	Ala	Leu
	145					150					155					160
35	Val	Lys	Val	Leu	Asp	Lys	Trp	Pro	Leu	Arg	Ser	Gly	Gly	Leu	Gln	Arg
					165					170					175	
	Glu	Gln	Val	Ile	Ser	Val	Gly	Ser	Cys	Val	Pro	Leu	Glu	Arg	Asn	Gln
				180					185					190		
40	Arg	Tyr	Ile	Phe	Phe	Leu	Glu	Pro	Thr	Glu	Gln	Pro	Leu	Val	Phe	Lys
			195					200					205			
	Thr	Ala	Phe	Ala	Pro	Leu	Asp	Thr	Asn	Gly	Lys	Asn	Leu	Lys	Lys	Glu
		210					215					220				
45	Val	Gly	Lys	Ile	Leu	Cys	Thr	Asp	Cys	Ala	Thr	Arg	Pro	Lys	Leu	Lys

ES 2 883 159 T3

	225					230										235				240
	Lys	Met	Lys	Ser	Gln	Thr	Gly	Gln	Val	Gly	Glu	Lys	Gln	Ser	Leu	Lys				
5					245					250					255					
	Cys	Glu	Ala	Ala	Ala	Gly	Asn	Pro	Gln	Pro	Ser	Tyr	Arg	Trp	Phe	Lys				
				260					265					270						
10	Asp	Gly	Lys	Glu	Leu	Asn	Arg	Ser	Arg	Asp	Ile	Arg	Ile	Lys	Tyr	Gly				
			275					280					285							
	Asn	Gly	Arg	Lys	Asn	Ser	Arg	Leu	Gln	Phe	Asn	Lys	Val	Lys	Val	Glu				
		290					295					300								
15	Asp	Ala	Gly	Glu	Tyr	Val	Cys	Glu	Ala	Glu	Asn	Ile	Leu	Gly	Lys	Asp				
	305					310					315					320				
	Thr	Val	Arg	Gly	Arg	Leu	Tyr	Val	Asn	Ser	Val	Ser	Thr	Thr	Leu	Ser				
20					325					330					335					
	Ser	Trp	Ser	Gly	His	Ala	Arg	Lys	Cys	Asn	Glu	Thr	Ala	Lys	Ser	Tyr				
				340					345					350						
25	Cys	Val	Asn	Gly	Gly	Val	Cys	Tyr	Tyr	Ile	Glu	Gly	Ile	Asn	Gln	Leu				
			355					360					365							
	Ser	Cys	Lys	Cys	Pro	Asn	Gly	Phe	Phe	Gly	Gln	Arg	Cys	Leu	Glu	Lys				
		370					375					380								
30	Leu	Pro	Leu	Arg	Leu	Tyr	Met	Pro	Asp	Pro	Lys	Gln	Lys	His	Leu	Gly				
	385					390					395					400				
	Phe	Glu	Leu	Lys	Glu	Ala	Glu	Glu	Leu	Tyr	Gln	Lys	Arg	Val	Leu	Thr				
35					405					410					415					
	Ile	Thr	Gly	Ile	Cys	Val	Ala	Leu	Leu	Val	Val	Gly	Ile	Val	Cys	Val				
				420					425					430						
40	Val	Ala	Tyr	Cys	Lys	Thr	Lys	Lys	Gln	Arg	Lys	Gln	Met	His	Asn	His				
			435				440						445							
	Leu	Arg	Gln	Asn	Met	Cys	Pro	Ala	His	Gln	Asn	Arg	Ser	Leu	Ala	Asn				
		450				455						460								
45	Gly	Pro	Ser	His	Pro	Arg	Leu	Asp	Pro	Glu	Glu	Ile	Gln	Met	Ala	Asp				
	465					470					475					480				
	Tyr	Ile	Ser	Lys	Asn	Val	Pro	Ala	Thr	Asp	His	Val	Ile	Arg	Arg	Glu				
50					485					490					495					
	Thr	Glu	Thr	Thr	Phe	Ser	Gly	Ser	His	Ser	Cys	Ser	Pro	Ser	His	His				
				500					505					510						
55	Cys	Ser	Thr	Ala	Thr	Pro	Thr	Ser	Ser	His	Arg	His	Glu	Ser	His	Thr				
			515				520						525							
	Trp	Ser	Leu	Glu	Arg	Ser	Glu	Ser	Leu	Thr	Ser	Asp	Ser	Gln	Ser	Gly				
		530					535					540								
60	Ile	Met	Leu	Ser	Ser	Val	Gly	Thr	Ser	Lys	Cys	Asn	Ser	Pro	Ala	Cys				
	545					550					555					560				
	Val	Glu	Ala	Arg	Ala	Arg	Arg	Ala	Ala	Ala	Tyr	Asn	Leu	Glu	Glu	Arg				
65																				

ES 2 883 159 T3

					565					570					575		
	Arg	Arg	Ala	Thr	Ala	Pro	Pro	Tyr	His	Asp	Ser	Val	Asp	Ser	Leu	Arg	
				580					585					590			
5																	
	Asp	Ser	Pro	His	Ser	Glu	Arg	Tyr	Val	Ser	Ala	Leu	Thr	Thr	Pro	Ala	
			595					600					605				
10	Arg	Leu	Ser	Pro	Val	Asp	Phe	His	Tyr	Ser	Leu	Ala	Thr	Gln	Val	Pro	
		610					615					620					
	Thr	Phe	Glu	Ile	Thr	Ser	Pro	Asn	Ser	Ala	His	Ala	Val	Ser	Leu	Pro	
	625					630					635					640	
15																	
	Pro	Ala	Ala	Pro	Ile	Ser	Tyr	Arg	Leu	Ala	Glu	Gln	Gln	Pro	Leu	Leu	
					645					650					655		
20	Arg	His	Pro	Ala	Pro	Pro	Gly	Pro									
				660					665					670			
	Gly	Pro	Gly	Ala	Asp	Met	Gln	Arg	Ser	Tyr	Asp	Ser	Tyr	Tyr	Tyr	Pro	
			675					680					685				
25																	
	Ala	Ala	Gly	Pro	Gly	Pro	Arg	Arg	Gly	Thr	Cys	Ala	Leu	Gly	Gly	Ser	
		690					695					700					
30	Leu	Gly	Ser	Leu	Pro	Ala	Ser	Pro	Phe	Arg	Ile	Pro	Glu	Asp	Asp	Glu	
	705					710					715					720	
	Tyr	Glu	Thr	Thr	Gln	Glu	Cys	Ala	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Arg	Pro	Arg	
				725					730						735		
35																	
	Ala	Arg	Gly	Ala	Ser	Arg	Arg	Thr	Ser	Ala	Gly	Pro	Arg	Arg	Trp	Arg	
				740					745					750			
	Arg	Ser	Arg	Leu	Asn	Gly	Leu	Ala	Ala	Gln	Arg	Ala	Arg	Ala	Ala	Arg	
			755					760					765				
40																	
	Asp	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Ser	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Ser	Ala	Ser	Ala	
			770				775					780					
45	Ser	Asp	Asp	Asp	Ala	Asp	Asp	Ala	Asp	Gly	Ala	Leu	Ala	Ala	Glu	Ser	
	785					790					795				800		
	Thr	Pro	Phe	Leu	Gly	Leu	Arg	Gly	Ala	His	Asp	Ala	Leu	Arg	Ser	Asp	
				805						810					815		
50																	
	Ser	Pro	Pro	Leu	Cys	Pro	Ala	Ala	Asp	Ser	Arg	Thr	Tyr	Tyr	Ser	Leu	
				820					825					830			
55	Asp	Ser	His	Ser	Thr	Arg	Ala	Ser	Ser	Arg	His	Ser	Arg	Gly	Pro	Pro	
			835					840					845				
	Pro	Arg	Ala	Lys	Gln	Asp	Ser	Ala	Pro	Leu							
			850				855										

60 <210> 22  
 <211> 852  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 65 <400> 22

ES 2 883 159 T3

	Met	Arg	Gln	Val	Cys	Cys	Ser	Ala	Leu	Pro	Pro	Pro	Pro	Leu	Glu	Lys
	1				5					10					15	
5	Gly	Arg	Cys	Ser	Ser	Tyr	Ser	Asp	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Glu	Arg
			20					25						30		
	Ser	Glu	Ser	Gly	Ser	Ser	Ser	Arg								
			35					40					45			
10	Ser	Ser	Ser	Asn	Asn	Ser	Ser	Ile	Ser	Arg	Pro	Ala	Ala	Pro	Pro	Glu
	50						55					60				
15	Pro	Arg	Pro	Gln	Gln	Gln	Pro	Gln	Pro	Arg	Ser	Pro	Ala	Ala	Arg	Arg
	65					70					75					80
	Ala	Ala	Ala	Arg	Ser	Arg	Ala	Ala	Ala	Ala	Gly	Gly	Met	Arg	Arg	Asp
					85					90					95	
20	Pro	Ala	Pro	Gly	Phe	Ser	Met	Leu	Leu	Phe	Gly	Val	Ser	Leu	Ala	Cys
				100					105					110		
	Tyr	Ser	Pro	Ser	Leu	Lys	Ser	Val	Gln	Asp	Gln	Ala	Tyr	Lys	Ala	Pro
			115					120					125			
25	Val	Val	Val	Glu	Gly	Lys	Val	Gln	Gly	Leu	Val	Pro	Ala	Gly	Gly	Ser
		130					135					140				
	Ser	Ser	Asn	Ser	Thr	Arg	Glu	Pro	Pro	Ala	Ser	Gly	Arg	Val	Ala	Leu
30	145					150					155					160
	Val	Lys	Val	Leu	Asp	Lys	Trp	Pro	Leu	Arg	Ser	Gly	Gly	Leu	Gln	Arg
					165					170					175	
35	Glu	Gln	Val	Ile	Ser	Val	Gly	Ser	Cys	Val	Pro	Leu	Glu	Arg	Asn	Gln
				180					185					190		
	Arg	Tyr	Ile	Phe	Phe	Leu	Glu	Pro	Thr	Glu	Gln	Pro	Leu	Val	Phe	Lys
40			195					200					205			
	Thr	Ala	Phe	Ala	Pro	Leu	Asp	Thr	Asn	Gly	Lys	Asn	Leu	Lys	Lys	Glu
		210					215					220				
45	Val	Gly	Lys	Ile	Leu	Cys	Thr	Asp	Cys	Ala	Thr	Arg	Pro	Lys	Leu	Lys
	225					230					235					240
	Lys	Met	Lys	Ser	Gln	Thr	Gly	Gln	Val	Gly	Glu	Lys	Gln	Ser	Leu	Lys
					245					250					255	
50	Cys	Glu	Ala	Ala	Ala	Gly	Asn	Pro	Gln	Pro	Ser	Tyr	Arg	Trp	Phe	Lys
				260					265					270		
	Asp	Gly	Lys	Glu	Leu	Asn	Arg	Ser	Arg	Asp	Ile	Arg	Ile	Lys	Tyr	Gly
55			275					280					285			
	Asn	Gly	Arg	Lys	Asn	Ser	Arg	Leu	Gln	Phe	Asn	Lys	Val	Lys	Val	Glu
		290					295					300				
60	Asp	Ala	Gly	Glu	Tyr	Val	Cys	Glu	Ala	Glu	Asn	Ile	Leu	Gly	Lys	Asp
	305					310					315					320
	Thr	Val	Arg	Gly	Arg	Leu	Tyr	Val	Asn	Ser	Val	Ser	Thr	Thr	Leu	Ser
					325					330					335	
65	Ser	Trp	Ser	Gly	His	Ala	Arg	Lys	Cys	Asn	Glu	Thr	Ala	Lys	Ser	Tyr





ES 2 883 159 T3

	Met	Ser	Glu	Gly	Ala	Ala	Ala	Ala	Ser	Pro	Pro	Gly	Ala	Ala	Ser	Ala
	1				5					10					15	
5	Ala	Ala	Ala	Ser	Ala	Glu	Glu	Gly	Thr	Ala						
				20					25					30		
	Ala	Ala	Gly	Gly	Gly	Pro	Asp	Gly	Gly	Gly	Glu	Gly	Ala	Ala	Glu	Pro
			35					40					45			
10	Pro	Arg	Glu	Leu	Arg	Cys	Ser	Asp	Cys	Ile	Val	Trp	Asn	Arg	Gln	Gln
		50					55					60				
	Thr	Trp	Leu	Cys	Val	Val	Pro	Leu	Phe	Ile	Gly	Phe	Ile	Gly	Leu	Gly
15	65					70					75					80
	Leu	Ser	Leu	Met	Leu	Leu	Lys	Trp	Ile	Val	Val	Gly	Ser	Val	Lys	Glu
				85						90					95	
20	Tyr	Val	Pro	Thr	Asp	Leu	Val	Asp	Ser	Lys	Gly	Met	Gly	Gln	Asp	Pro
				100					105					110		
	Phe	Phe	Leu	Ser	Lys	Pro	Ser	Ser	Phe	Pro	Lys	Ala	Met	Glu	Thr	Thr
25																



ES 2 883 159 T3

	450		455		460													
5	Gln 465	Ser	Val	Lys	His	His 470	Arg	Ser	Leu	Ser	Ser 475	Cys	Cys	Ser	Pro	Gly 480		
	Gln	Arg	Ser	Gly	Met 485	Leu	His	Arg	Asn	Ala 490	Phe	Arg	Arg	Thr	Pro 495	Pro		
10	Ser	Pro	Arg	Ser 500	Arg	Leu	Gly	Gly	Ile 505	Val	Gly	Pro	Ala	Tyr 510	Gln	Gln		
	Leu	Glu	Glu 515	Ser	Arg	Ile	Pro	Asp 520	Gln	Asp	Thr	Ile	Pro 525	Cys	Gln	Gly		
15	Tyr 530	Ser	Ser	Ser	Gly	Leu	Lys 535	Thr	Gln	Arg	Asn	Thr 540	Ser	Ile	Asn	Met		
	Gln 545	Leu	Pro	Ser	Arg	Glu 550	Thr	Asn	Pro	Tyr	Phe 555	Asn	Ser	Leu	Glu	Gln 560		
	Lys	Asp	Leu	Val	Gly 565	Tyr	Ser	Ser	Thr	Arg 570	Ala	Ser	Ser	Val	Pro 575	Ile		
25	Ile	Pro	Ser	Val 580	Gly	Leu	Glu	Glu	Thr 585	Cys	Leu	Gln	Met	Pro 590	Gly	Ile		
	Ser	Glu	Val 595	Lys	Ser	Ile	Lys	Trp 600	Cys	Lys	Asn	Ser	Tyr 605	Ser	Ala	Asp		
	Val 610	Val	Asn	Val	Ser	Ile	Pro 615	Val	Ser	Asp	Cys	Leu 620	Ile	Ala	Glu	Gln		
35	Gln 625	Glu	Val	Lys	Ile	Leu 630	Leu	Glu	Thr	Val	Gln 635	Glu	Gln	Ile	Arg	Ile 640		
	Leu	Thr	Asp	Ala	Arg 645	Arg	Ser	Glu	Asp	Tyr 650	Glu	Leu	Ala	Ser	Val 655	Glu		
40	Thr	Glu	Asp	Ser 660	Ala	Ser	Glu	Asn	Thr 665	Ala	Phe	Leu	Pro	Leu 670	Ser	Pro		
	Thr	Ala	Lys 675	Ser	Glu	Arg	Glu	Ala 680	Gln	Phe	Val	Leu	Arg 685	Asn	Glu	Ile		
50	Gln 690	Arg	Asp	Ser	Ala	Leu	Thr 695	Lys										

<210> 24  
 <211> 695  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

55 <400> 24

ES 2 883 159 T3

Met Ser Glu Gly Ala Ala Ala Ala Ser Pro Pro Gly Ala Ala Ser Ala  
1 5 10 15  
5 Ala Ala Ala Ser Ala Glu Glu Gly Thr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala  
20 25 30  
Ala Ala Gly Gly Gly Pro Asp Gly Gly Gly Glu Gly Ala Ala Glu Pro  
35 40 45  
10 Pro Arg Glu Leu Arg Cys Ser Asp Cys Ile Val Trp Asn Arg Gln Gln

ES 2 883 159 T3

	50					55										60
	Thr	Trp	Leu	Cys	Val	Val	Pro	Leu	Phe	Ile	Gly	Phe	Ile	Gly	Leu	Gly
5	65					70					75					80
	Leu	Ser	Leu	Met	Leu	Leu	Lys	Trp	Ile	Val	Val	Gly	Ser	Val	Lys	Glu
				85						90					95	
10	Tyr	Val	Pro	Thr	Asp	Leu	Val	Asp	Ser	Lys	Gly	Met	Gly	Gln	Asp	Pro
				100					105					110		
15	Phe	Phe	Leu	Ser	Lys	Pro	Ser	Ser	Phe	Pro	Lys	Ala	Met	Glu	Thr	Thr
			115						120				125			
20	Thr	Thr	Thr	Thr	Ser	Thr	Thr	Ser	Pro	Ala	Thr	Pro	Ser	Ala	Gly	Gly
									135					140		
25	Ala	Ala	Ser	Ser	Arg	Thr	Pro	Asn	Arg	Ile	Ser	Thr	Arg	Leu	Thr	Thr
	145					150					155					160
30	Ile	Thr	Arg	Ala	Pro	Thr	Arg	Phe	Pro	Gly	His	Arg	Val	Pro	Ile	Arg
					165					170					175	
35	Ala	Ser	Pro	Arg	Ser	Thr	Thr	Ala	Arg	Asn	Thr	Ala	Ala	Pro	Ala	Thr
				180					185					190		
40	Val	Pro	Ser	Thr	Thr	Ala	Pro	Phe	Phe	Ser	Ser	Ser	Thr	Leu	Gly	Ser
			195					200					205			
45	Arg	Pro	Pro	Val	Pro	Gly	Thr	Pro	Ser	Thr	Gln	Ala	Met	Pro	Ser	Trp
		210					215					220				
50	Pro	Thr	Ala	Ala	Tyr	Ala	Thr	Ser	Ser	Tyr	Leu	His	Asp	Ser	Thr	Pro
	225					230					235					240
55	Ser	Trp	Thr	Leu	Ser	Pro	Phe	Gln	Asp	Ala	Ala	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser
				245						250					255	
60	Ser	Ser	Ser	Ser	Ala	Thr	Thr	Thr	Thr	Pro	Glu	Thr	Ser	Thr	Ser	Pro
				260					265					270		
65	Lys	Phe	His	Thr	Thr	Thr	Tyr	Ser	Thr	Glu	Arg	Ser	Glu	His	Phe	Lys
			275					280					285			
70	Pro	Cys	Arg	Asp	Lys	Asp	Leu	Ala	Tyr	Cys	Leu	Asn	Asp	Gly	Glu	Cys
		290					295					300				
75	Phe	Val	Ile	Glu	Thr	Leu	Thr	Gly	Ser	His	Lys	His	Cys	Arg	Cys	Lys
	305					310					315					320
80	Glu	Gly	Tyr	Gln	Gly	Val	Arg	Cys	Asp	Gln	Phe	Leu	Pro	Lys	Thr	Asp
				325						330					335	
85	Ser	Ile	Leu	Ser	Asp	Pro	Asn	His	Leu	Gly	Ile	Glu	Phe	Met	Glu	Ser
				340					345					350		
90	Glu	Glu	Val	Tyr	Gln	Arg	Gln	Val	Leu	Ser	Ile	Ser	Cys	Ile	Ile	Phe
			355					360					365			
95	Gly	Ile	Val	Ile	Val	Gly	Met	Phe	Cys	Ala	Ala	Phe	Tyr	Phe	Lys	Ser
		370					375					380				
100	Lys	Lys	Gln	Ala	Lys	Gln	Ile	Gln	Glu	Gln	Leu	Lys	Val	Pro	Gln	Asn

ES 2 883 159 T3

	385				390					395				400		
	Gly	Lys	Ser	Tyr	Ser	Leu	Lys	Ala	Ser	Ser	Thr	Met	Ala	Lys	Ser	Glu
5					405					410					415	
	Asn	Leu	Val	Lys	Ser	His	Val	Gln	Leu	Gln	Asn	Tyr	Ser	Lys	Val	Glu
				420					425					430		
10	Arg	His	Pro	Val	Thr	Ala	Leu	Glu	Lys	Met	Met	Glu	Ser	Ser	Phe	Val
			435					440					445			
	Gly	Pro	Gln	Ser	Phe	Pro	Glu	Val	Pro	Ser	Pro	Asp	Arg	Gly	Ser	Gln
15		450					455					460				
	Ser	Val	Lys	His	His	Arg	Ser	Leu	Ser	Ser	Cys	Cys	Ser	Pro	Gly	Gln
	465					470					475					480
20	Arg	Ser	Gly	Met	Leu	His	Arg	Asn	Ala	Phe	Arg	Arg	Thr	Pro	Pro	Ser
					485					490					495	
	Pro	Arg	Ser	Arg	Leu	Gly	Gly	Ile	Val	Gly	Pro	Ala	Tyr	Gln	Gln	Leu
				500					505					510		
25	Glu	Glu	Ser	Arg	Ile	Pro	Asp	Gln	Asp	Thr	Ile	Pro	Cys	Gln	Gly	Tyr
			515					520					525			
30	Ser	Ser	Ser	Gly	Leu	Lys	Thr	Gln	Arg	Asn	Thr	Ser	Ile	Asn	Met	Gln
		530					535					540				
	Leu	Pro	Ser	Arg	Glu	Thr	Asn	Pro	Tyr	Phe	Asn	Ser	Leu	Glu	Gln	Lys
	545					550					555					560
35	Asp	Leu	Val	Gly	Tyr	Ser	Ser	Thr	Arg	Ala	Ser	Ser	Val	Pro	Ile	Ile
				565						570					575	
40	Pro	Ser	Val	Gly	Leu	Glu	Glu	Thr	Cys	Leu	Gln	Met	Pro	Gly	Ile	Ser
				580					585					590		
	Glu	Val	Lys	Ser	Ile	Lys	Trp	Cys	Lys	Asn	Ser	Tyr	Ser	Ala	Asp	Val
			595					600					605			
45	Val	Asn	Val	Ser	Ile	Pro	Val	Ser	Asp	Cys	Leu	Ile	Ala	Glu	Gln	Gln
		610					615					620				
50	Glu	Val	Lys	Ile	Leu	Leu	Glu	Thr	Val	Gln	Glu	Gln	Ile	Arg	Ile	Leu
	625					630					635					640
	Thr	Asp	Ala	Arg	Arg	Ser	Glu	Asp	Tyr	Glu	Leu	Ala	Ser	Val	Glu	Thr
				645						650					655	
55	Glu	Asp	Ser	Ala	Ser	Glu	Asn	Thr	Ala	Phe	Leu	Pro	Leu	Ser	Pro	Thr
				660					665					670		
60	Ala	Lys	Ser	Glu	Arg	Glu	Ala	Gln	Phe	Val	Leu	Arg	Asn	Glu	Ile	Gln
			675					680					685			
65	Arg	Asp	Ser	Ala	Leu	Thr	Lys									
		690					695									

<210> 25  
 <211> 499

<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 25

5

ES 2 883 159 T3

	Met	Glu	Cys	Gly	Ile	Pro	Pro	Thr	Leu	Val	Cys	Val	Gly	Arg	Gly	Gly
	1				5					10					15	
5	Gly	Leu	His	Thr	Ile	Asn	Ile	Ile	Ile	Trp	Tyr	Tyr	Phe	Pro	Ser	Ala
				20					25					30		
	Trp	Arg	Thr	Cys	Phe	Asn	Ile	Ser	Ser	Ser	Val	Gly	Leu	Leu	Leu	Thr
			35					40					45			
10	Asn	Ser	Tyr	Lys	Phe	Tyr	Thr	Thr	Thr	Tyr	Ser	Thr	Glu	Arg	Ser	Glu
		50					55					60				
15	His	Phe	Lys	Pro	Cys	Arg	Asp	Lys	Asp	Leu	Ala	Tyr	Cys	Leu	Asn	Asp
	65					70					75					80
	Gly	Glu	Cys	Phe	Val	Ile	Glu	Thr	Leu	Thr	Gly	Ser	His	Lys	His	Cys
					85					90					95	
20	Arg	Cys	Lys	Glu	Gly	Tyr	Gln	Gly	Val	Arg	Cys	Asp	Gln	Phe	Leu	Pro
				100					105					110		
	Lys	Thr	Asp	Ser	Ile	Leu	Ser	Asp	Pro	Thr	Asp	His	Leu	Gly	Ile	Glu
25			115					120					125			
	Phe	Met	Glu	Ser	Glu	Glu	Val	Tyr	Gln	Arg	Gln	Val	Leu	Ser	Ile	Ser
		130					135					140				
30	Cys	Ile	Ile	Phe	Gly	Ile	Val	Ile	Val	Gly	Met	Phe	Cys	Ala	Ala	Phe
	145					150					155					160
	Tyr	Phe	Lys	Ser	Lys	Lys	Gln	Ala	Lys	Gln	Ile	Gln	Glu	Gln	Leu	Lys
					165					170					175	
35	Val	Pro	Gln	Asn	Gly	Lys	Ser	Tyr	Ser	Leu	Lys	Ala	Ser	Ser	Thr	Met
				180					185						190	
40	Ala	Lys	Ser	Glu	Asn	Leu	Val	Lys	Ser	His	Val	Gln	Leu	Gln	Asn	Tyr
			195					200					205			
	Ser	Lys	Val	Glu	Arg	His	Pro	Val	Thr	Ala	Leu	Glu	Lys	Met	Met	Glu
		210					215					220				
45	Ser	Ser	Phe	Val	Gly	Pro	Gln	Ser	Phe	Pro	Glu	Val	Pro	Ser	Pro	Asp
	225					230					235					240
	Arg	Gly	Ser	Gln	Ser	Val	Lys	His	His	Arg	Ser	Leu	Ser	Ser	Cys	Cys
50					245					250					255	
	Ser	Pro	Gly	Gln	Arg	Ser	Gly	Met	Leu	His	Arg	Asn	Ala	Phe	Arg	Arg
				260					265					270		
55	Thr	Pro	Pro	Ser	Pro	Arg	Ser	Arg	Leu	Gly	Gly	Ile	Val	Gly	Pro	Ala
			275					280					285			
	Tyr	Gln	Gln	Leu	Glu	Glu	Ser	Arg	Ile	Pro	Asp	Gln	Asp	Thr	Ile	Pro
		290					295					300				
60	Cys	Gln	Gly	Ile	Glu	Val	Arg	Lys	Thr	Ile	Ser	His	Leu	Pro	Ile	Gln
	305					310					315					320
65	Leu	Trp	Cys	Val	Glu	Arg	Pro	Leu	Asp	Leu	Lys	Tyr	Ser	Ser	Ser	Gly

ES 2 883 159 T3

					325					330					335	
	Leu	Lys	Thr	Gln	Arg	Asn	Thr	Ser	Ile	Asn	Met	Gln	Leu	Pro	Ser	Arg
				340					345					350		
5																
	Glu	Thr	Asn	Pro	Tyr	Phe	Asn	Ser	Leu	Glu	Gln	Lys	Asp	Leu	Val	Gly
			355					360					365			
10																
	Tyr	Ser	Ser	Thr	Arg	Ala	Ser	Ser	Val	Pro	Ile	Ile	Pro	Ser	Val	Gly
		370					375					380				
15																
	Leu	Glu	Glu	Thr	Cys	Leu	Gln	Met	Pro	Gly	Ile	Ser	Glu	Val	Lys	Ser
	385					390					395					400
20																
	Ile	Lys	Trp	Cys	Lys	Asn	Ser	Tyr	Ser	Ala	Asp	Val	Val	Asn	Val	Ser
					405					410					415	
25																
	Ile	Pro	Val	Ser	Asp	Cys	Leu	Ile	Ala	Glu	Gln	Gln	Glu	Val	Lys	Ile
				420					425					430		
30																
	Leu	Leu	Glu	Thr	Val	Gln	Glu	Gln	Ile	Arg	Ile	Leu	Thr	Asp	Ala	Arg
			435					440					445			
35																
	Arg	Ser	Glu	Asp	Tyr	Glu	Leu	Ala	Ser	Val	Glu	Thr	Glu	Asp	Ser	Ala
		450					455						460			
40																
	Ser	Glu	Asn	Thr	Ala	Phe	Leu	Pro	Leu	Ser	Pro	Thr	Ala	Lys	Ser	Glu
	465					470					475					480
45																
	Arg	Glu	Ala	Gln	Phe	Val	Leu	Arg	Asn	Glu	Ile	Gln	Arg	Asp	Ser	Ala
					485					490					495	
50																
	Leu	Thr	Lys													

<210> 26  
 <211> 115  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 26

ES 2 883 159 T3

5 Met Pro Thr Asp His Glu Glu Pro Cys Gly Pro Ser His Lys Ser Phe  
 1 5 10  
 Cys Leu Asn Gly Gly Leu Cys Tyr Val Ile Pro Thr Ile Pro Ser Pro  
 20 25 30  
 Phe Cys Arg Cys Val Glu Asn Tyr Thr Gly Ala Arg Cys Glu Glu Val  
 35 40 45  
 10 Phe Leu Pro Gly Ser Ser Ile Gln Thr Lys Ser Asn Leu Phe Glu Ala  
 50 55 60  
 Phe Val Ala Leu Ala Val Leu Val Thr Leu Ile Ile Gly Ala Phe Tyr  
 65 70 75 80  
 Phe Leu Cys Arg Lys Gly His Phe Gln Arg Ala Ser Ser Val Gln Tyr  
 85 90 95  
 20 Asp Ile Asn Leu Val Glu Thr Ser Ser Thr Ser Ala His His Ser His  
 100 105 110  
 Glu Gln His  
 25 115

<210> 27  
 <211> 65  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Neuregulina humana recombinante 1beta  
 35 <400> 27

40 Ser His Leu Val Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn  
 1 5 10  
 Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr  
 20 25 30  
 45 Leu Cys Lys Cys Pro Asn Glu Phe Thr Gly Asp Arg Cys Gln Asn Tyr  
 35 40 45  
 Val Met Ala Ser Phe Tyr Lys His Leu Gly Ile Glu Phe Met Glu Ala  
 50 55 60  
 50 Glu  
 65

<210> 28  
 <211> 210  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Fragmento de dominio de furina 1  
 60 <400> 28

65

ES 2 883 159 T3

	Met	Arg	Leu	Gly	Leu	Cys	Val	Val	Ala	Leu	Val	Leu	Ser	Trp	Thr	His
	1				5					10					15	
5	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Arg	Gly	Ile	Lys	Gly	Lys	Arg	Gln	Arg	Arg	Ile
				20					25					30		
	Ser	Ala	Glu	Gly	Ser	Gln	Ala	Cys	Ala	Lys	Gly	Cys	Glu	Leu	Cys	Ser
			35					40					45			
10	Glu	Val	Asn	Gly	Cys	Leu	Lys	Cys	Ser	Pro	Lys	Leu	Phe	Ile	Leu	Leu
		50					55					60				
	Glu	Arg	Asn	Asp	Ile	Arg	Gln	Val	Gly	Val	Cys	Leu	Pro	Ser	Cys	Pro
15	65					70					75					80
	Pro	Gly	Tyr	Phe	Asp	Ala	Arg	Asn	Pro	Asp	Met	Asn	Lys	Cys	Ile	Lys
					85					90					95	
20	Cys	Lys	Ile	Glu	His	Cys	Glu	Ala	Cys	Phe	Ser	His	Asn	Phe	Cys	Thr
				100					105					110		
	Lys	Cys	Lys	Glu	Gly	Leu	Tyr	Leu	His	Lys	Gly	Arg	Cys	Tyr	Pro	Ala
25			115					120					125			
	Cys	Pro	Glu	Gly	Ser	Ser	Ala	Ala	Asn	Gly	Thr	Met	Glu	Cys	Ser	Ser
		130					135					140				
30	Pro	Ala	Gln	Cys	Glu	Met	Ser	Glu	Trp	Ser	Pro	Trp	Gly	Pro	Cys	Ser
						145						155				160
	Lys	Lys	Gln	Gln	Leu	Cys	Gly	Phe	Arg	Arg	Gly	Ser	Glu	Glu	Arg	Thr
35					165					170					175	
	Arg	Arg	Val	Leu	His	Ala	Pro	Val	Gly	Asp	His	Ala	Ala	Cys	Ser	Asp
				180					185					190		
40	Thr	Lys	Glu	Thr	Arg	Arg	Cys	Thr	Val	Arg	Arg	Val	Pro	Cys	Pro	Glu
			195					200					205			
	Gly	Gln														
45		210														
	<210>	29														
	<211>	146														
	<212>	PRT														
50	<213>	Secuencia Artificial														
	<220>															
	<223>	Fragmento de dominio de furina 2														
55	<400>	29														

ES 2 883 159 T3

Met Arg Leu Gly Leu Cys Val Val Ala Leu Val Leu Ser Trp Thr His  
 1 5 10 15  
 5 Leu Thr Ile Ser Ser Arg Gly Ile Lys Gly Lys Arg Gln Arg Arg Ile  
 20 25 30  
 Ser Ala Glu Gly Ser Gln Ala Cys Ala Lys Gly Cys Glu Leu Cys Ser  
 35 40 45  
 10 Glu Val Asn Gly Cys Leu Lys Cys Ser Pro Lys Leu Phe Ile Leu Leu  
 50 55 60  
 15 Glu Arg Asn Asp Ile Arg Gln Val Gly Val Cys Leu Pro Ser Cys Pro  
 65 70 75 80  
 Pro Gly Tyr Phe Asp Ala Arg Asn Pro Asp Met Asn Lys Cys Ile Lys  
 85 90 95  
 20 Cys Lys Ile Glu His Cys Glu Ala Cys Phe Ser His Asn Phe Cys Thr  
 100 105 110  
 25 Lys Cys Lys Glu Gly Leu Tyr Leu His Lys Gly Arg Cys Tyr Pro Ala  
 115 120 125  
 Cys Pro Glu Gly Ser Ser Ala Ala Asn Gly Thr Met Glu Cys Ser Ser  
 130 135 140  
 30 Pro Ala  
 145  
 <210> 30  
 <211> 118  
 35 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Fragmento de dominio de furina 3  
 40 <400> 30  
 Gly Gly Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ala Glu Gly Ser Gln Ala Cys Ala  
 45



<220>  
 <221> Xaa  
 <222> 4  
 5 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

<400> 32

10 Met Thr Gln Xaa Pro Thr Ser Met Ser Ile Ser Ile Gly Asp Arg Val  
 1 5 10 15

Thr Met Asn Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Asp Ser Asn Val Asp Trp  
 20 25 30

15 Tyr Gln Gln Lys Thr Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Ala  
 35 40 45

20 Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser  
 50 55 60

Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Asn Met Gln Ala Glu Asp Leu  
 65 70 75 80

25 Ala Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ser Asn Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly  
 85 90 95

Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg  
 100 105

30

<210> 33  
 <211> 118  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

35

<220>  
 <223> Anticuerpo de VH

<400> 33

40 Glu Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Ala Ala Leu Val Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15

45 Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr  
 20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45

50 Gly Tyr Ile Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe  
 50 55 60

55 Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Asn Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Arg Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Thr Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

60 Thr Arg Phe Gly Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110

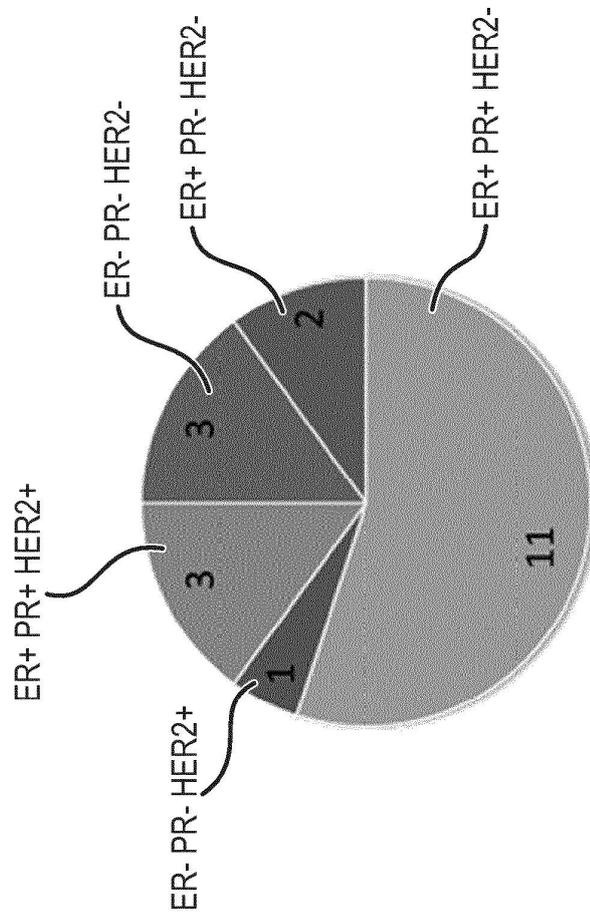
Thr Val Thr Val Ser Ser  
 115

65

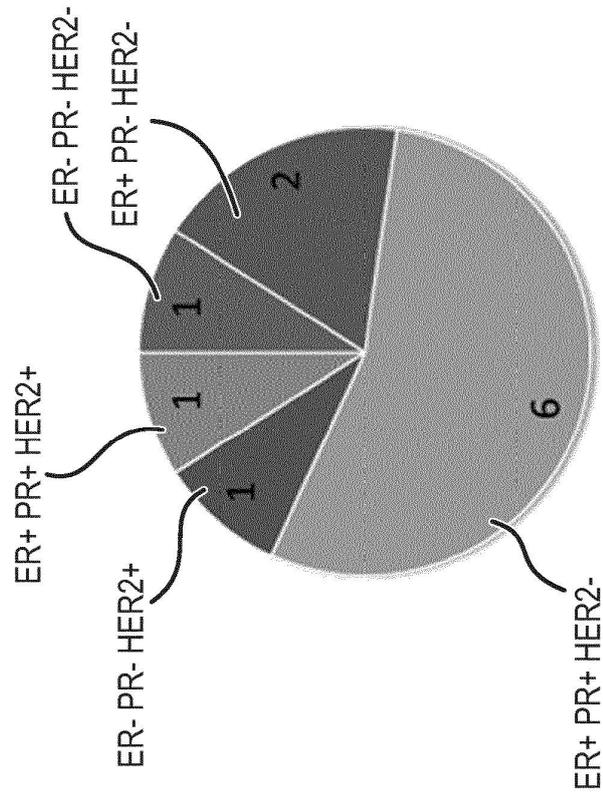
**REIVINDICACIONES**

1. Un método para expandir células madre epiteliales de mama que comprende:
  - 5        proporcionar un medio de cultivo que comprende un ligando de ErbB3/4, un agonista de Wnt y uno o más ligandos de FGFR2b; poner en contacto una población de células madre de mama con el medio de cultivo; y cultivar las células en condiciones apropiadas.
- 10      2. El método de la reivindicación 1, en donde el ligando de ErbB3/4 es un polipéptido de neuregulina.
3. Un medio de cultivo que comprende un ligando de ErbB3/4, un agonista de Wnt y uno o más ligandos de FGFR2b.
- 15      4. El medio de cultivo de la reivindicación 3, en el que:
  - i) el ligando de ErbB3/4 es un polipéptido de neuregulina, opcionalmente en donde el polipéptido de neuregulina está codificado por *NRG1*, opcionalmente además en donde el polipéptido de neuregulina comprende o consiste de la secuencia de aminoácidos enumerada en la SEQ ID NO: 27;
  - 20        ii) el uno o más ligandos de FGFR2b son FGF7 y/o FGF10;
  - iii) el agonista de Wnt es un agonista de Lgr5, opcionalmente en donde el agonista de LGr5 es una Rspodina o un imitador de Rspodina;
  - iv) el medio de cultivo comprende además un inhibidor de BMP; y/o
  - v) el medio de cultivo comprende además uno o más componentes seleccionados del grupo que consiste de: B27, N-acetilcisteína, nicotinamida, un inhibidor de ROCK, un inhibidor de TGF-beta y un inhibidor de p38 o en donde el medio de cultivo comprende además: B27, N-acetilcisteína, nicotinamida, un inhibidor de ROCK, un inhibidor de TGF-beta y un inhibidor de p38.
- 25      5. El medio de cultivo de la reivindicación 4, en el que:
  - 30        (a) el inhibidor de BMP es Noggin, y/o
  - (b) el inhibidor de ROCK es Y-27632, y/o
  - (c) el inhibidor de TGF-beta es A83-01, y/o
  - (d) el inhibidor de p38 es SB 202190.
- 35      6. El medio de cultivo de cualquiera de las reivindicaciones 3-5, en donde el medio de cultivo comprende además uno o más componentes seleccionados del grupo que consiste de: uno o más ligandos de receptor tirosina quinasa adicionales y un agente estabilizador de p53.
- 40      7. El medio de cultivo de la reivindicación 4 o la reivindicación 5, en el que:
  - (a) el uno o más ligandos del receptor tirosina quinasa adicionales son EGF, PDGF y/o anfiregulina, opcionalmente en donde el PDGF es PDGF-CC; y/o
  - (b) el agente estabilizador de p53 es un miembro de la familia Nutlin, opcionalmente en donde la familia Nutlin es Nutlin-3.
- 45      8. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el medio de cultivo es un medio de cultivo descrito en cualquiera de las reivindicaciones 3-7.

**FIG. 1A**



**FIG. 1B**



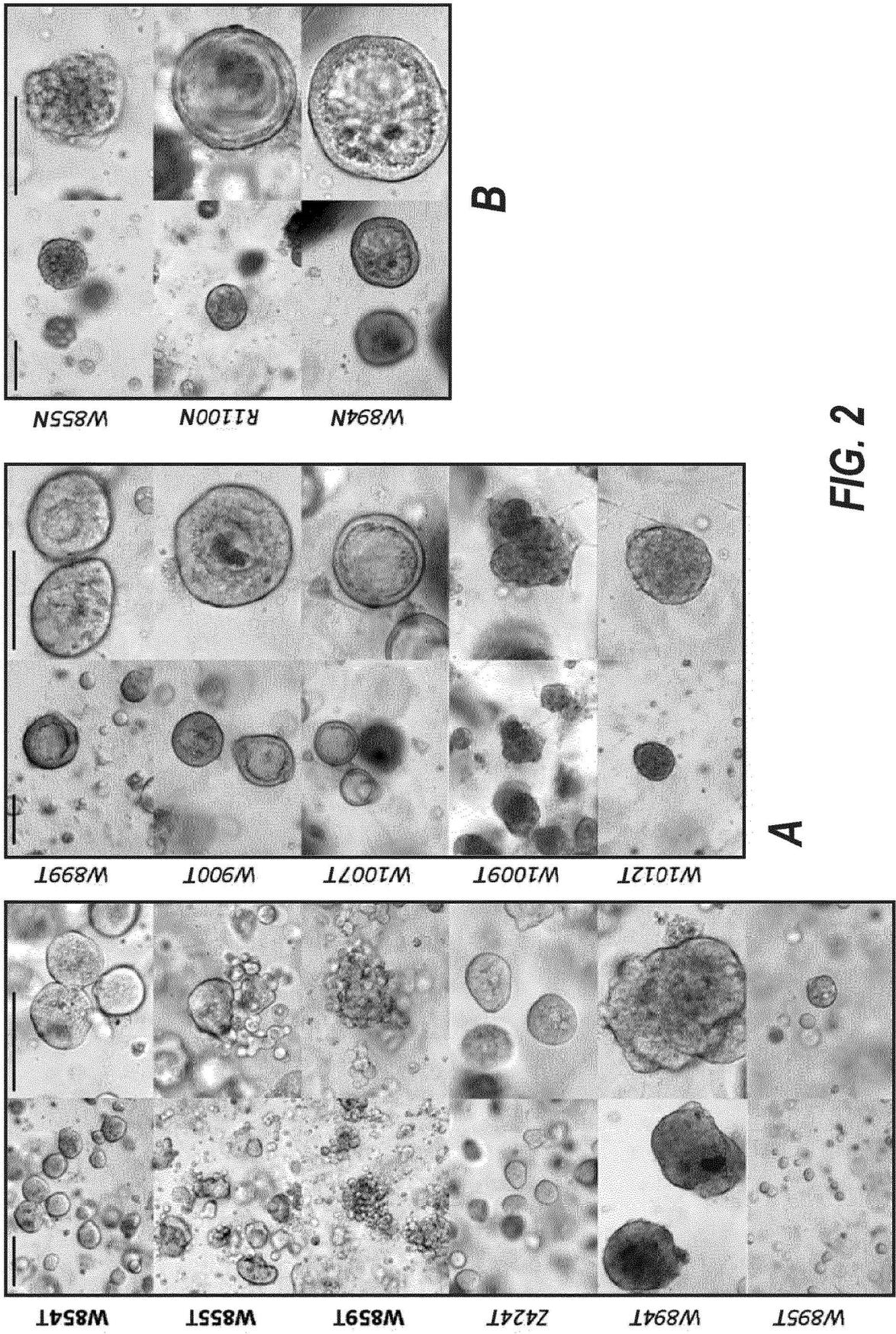
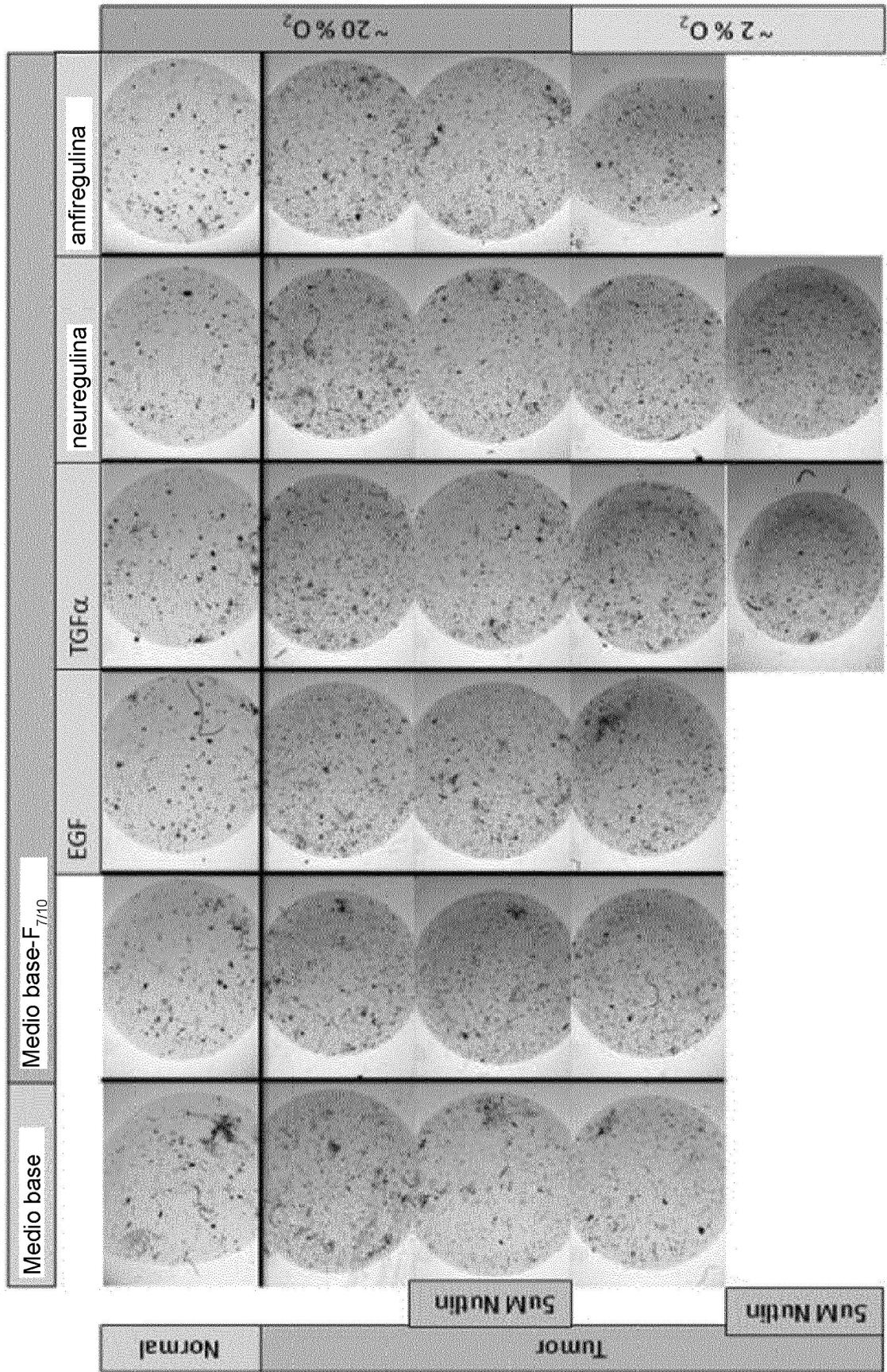


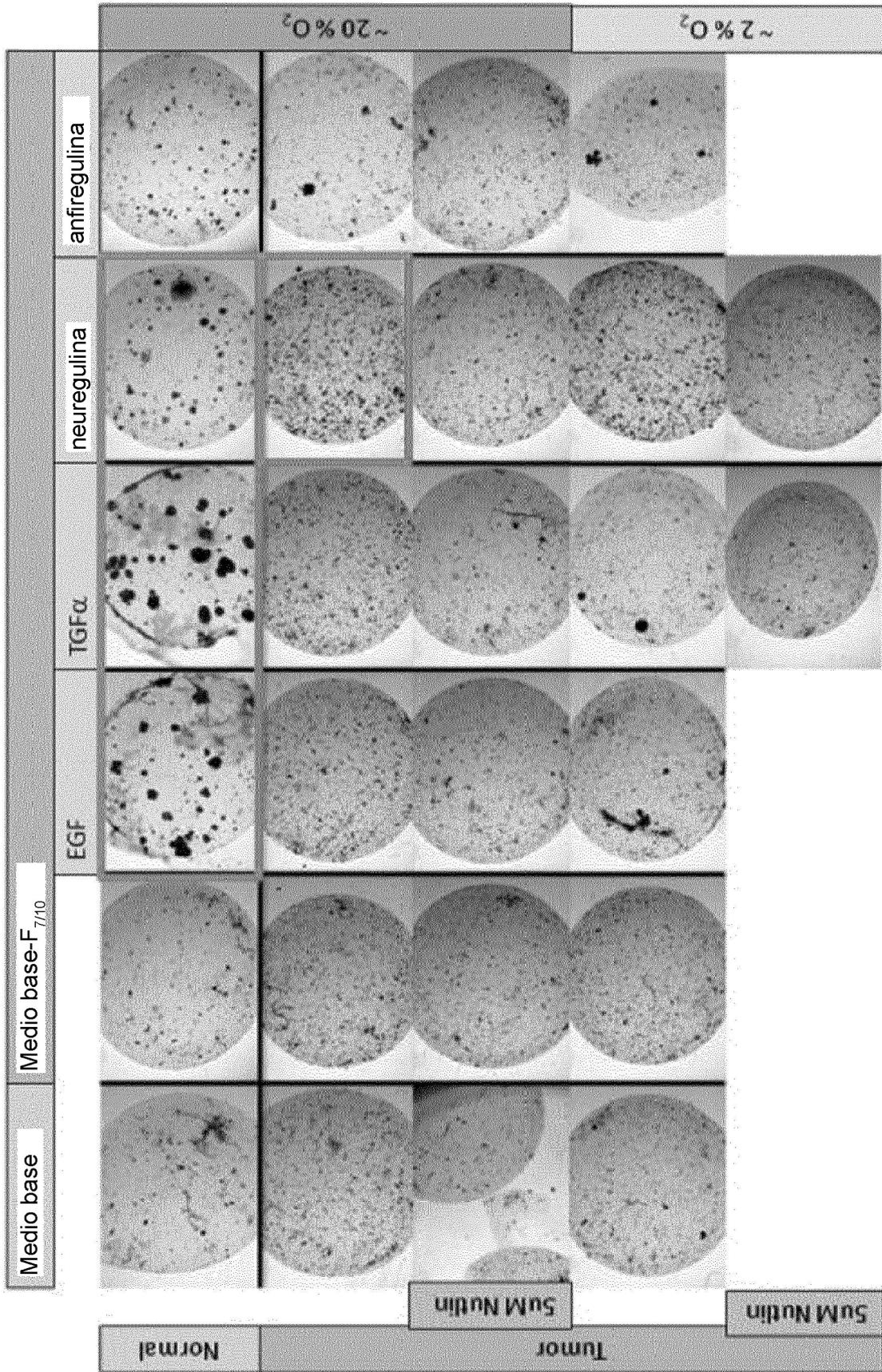
FIG. 2

**FIG. 3A**

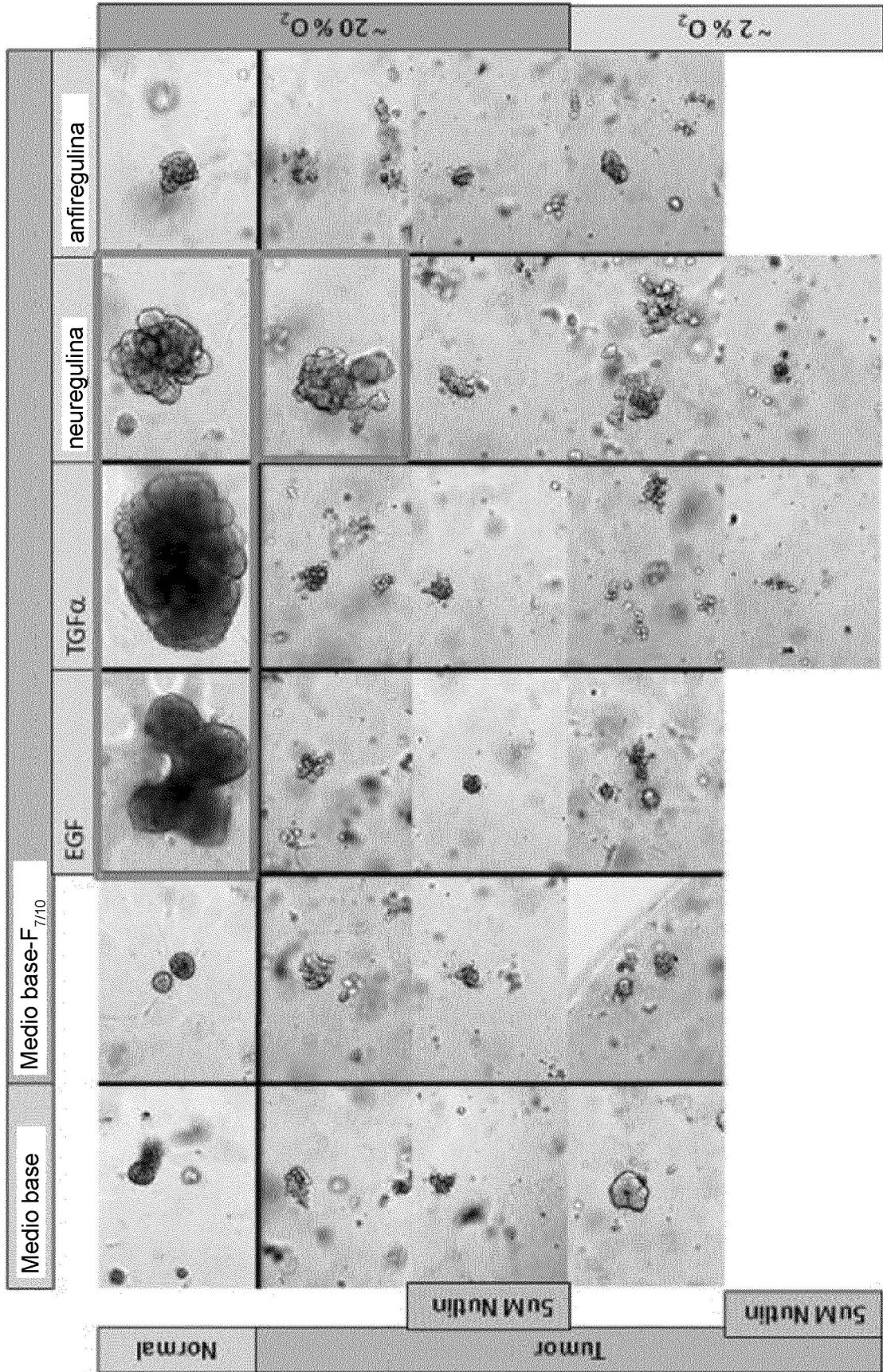




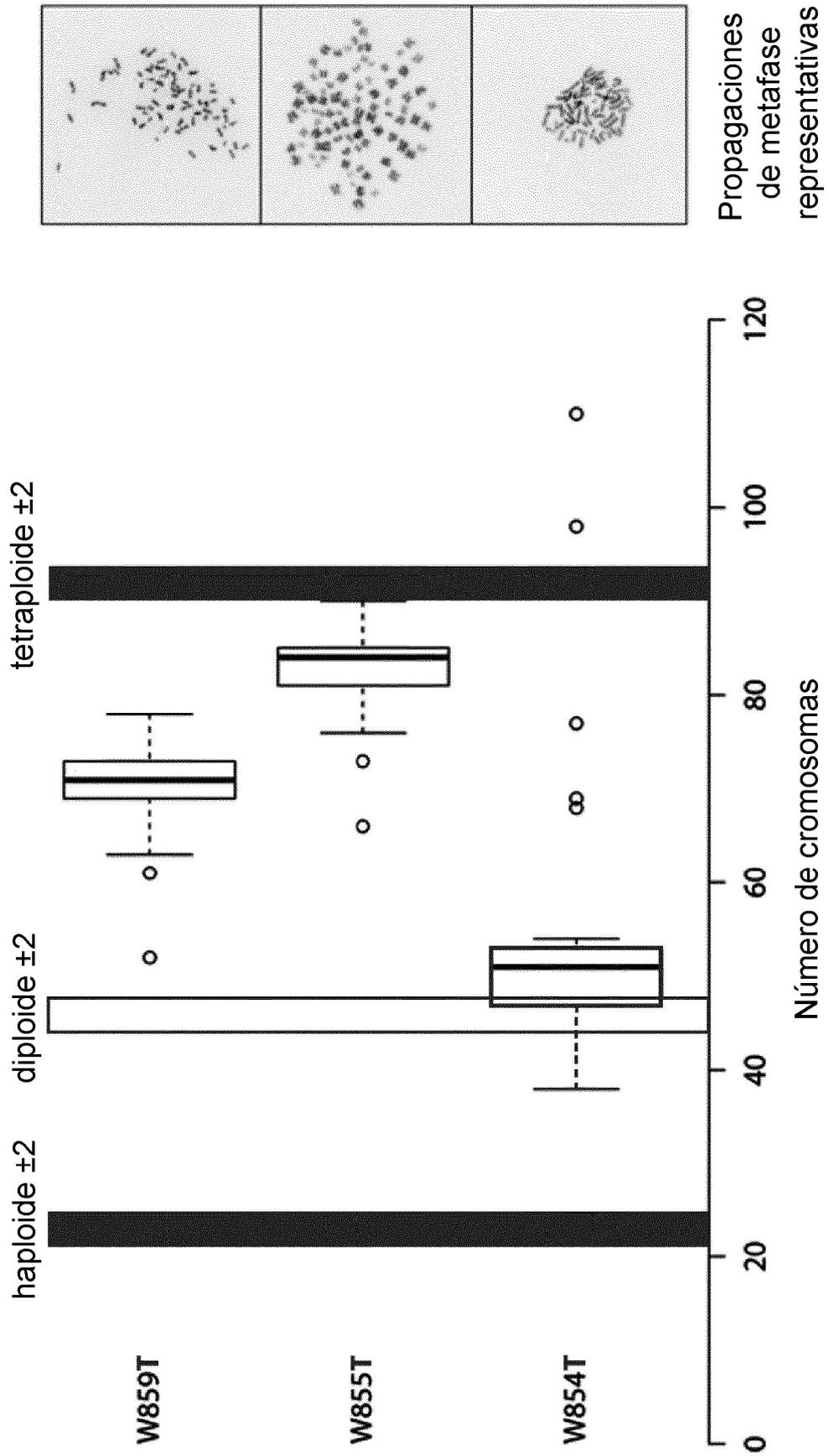
**FIG. 3B**

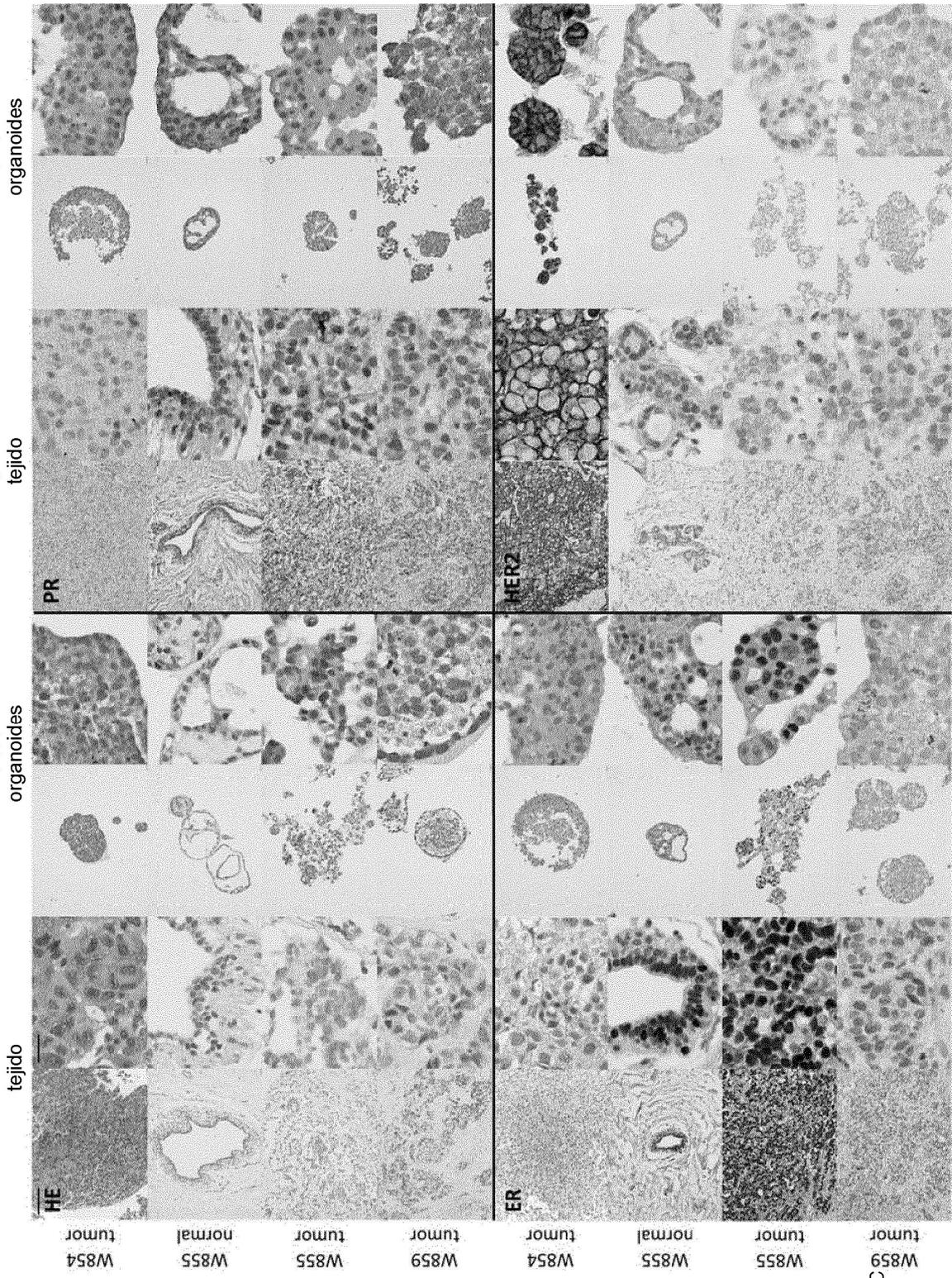


**FIG. 3B(cont.)**



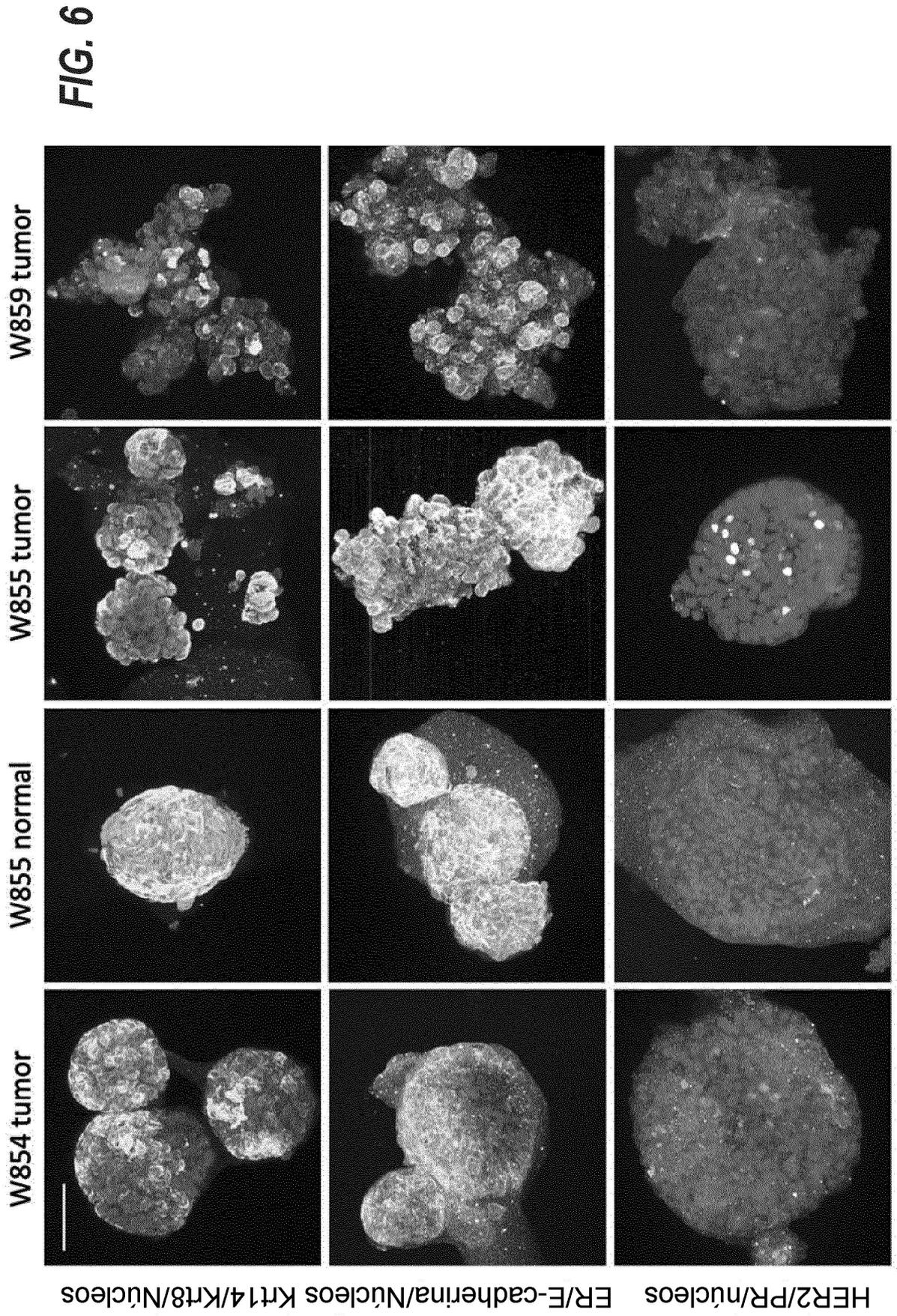
**FIG. 4**



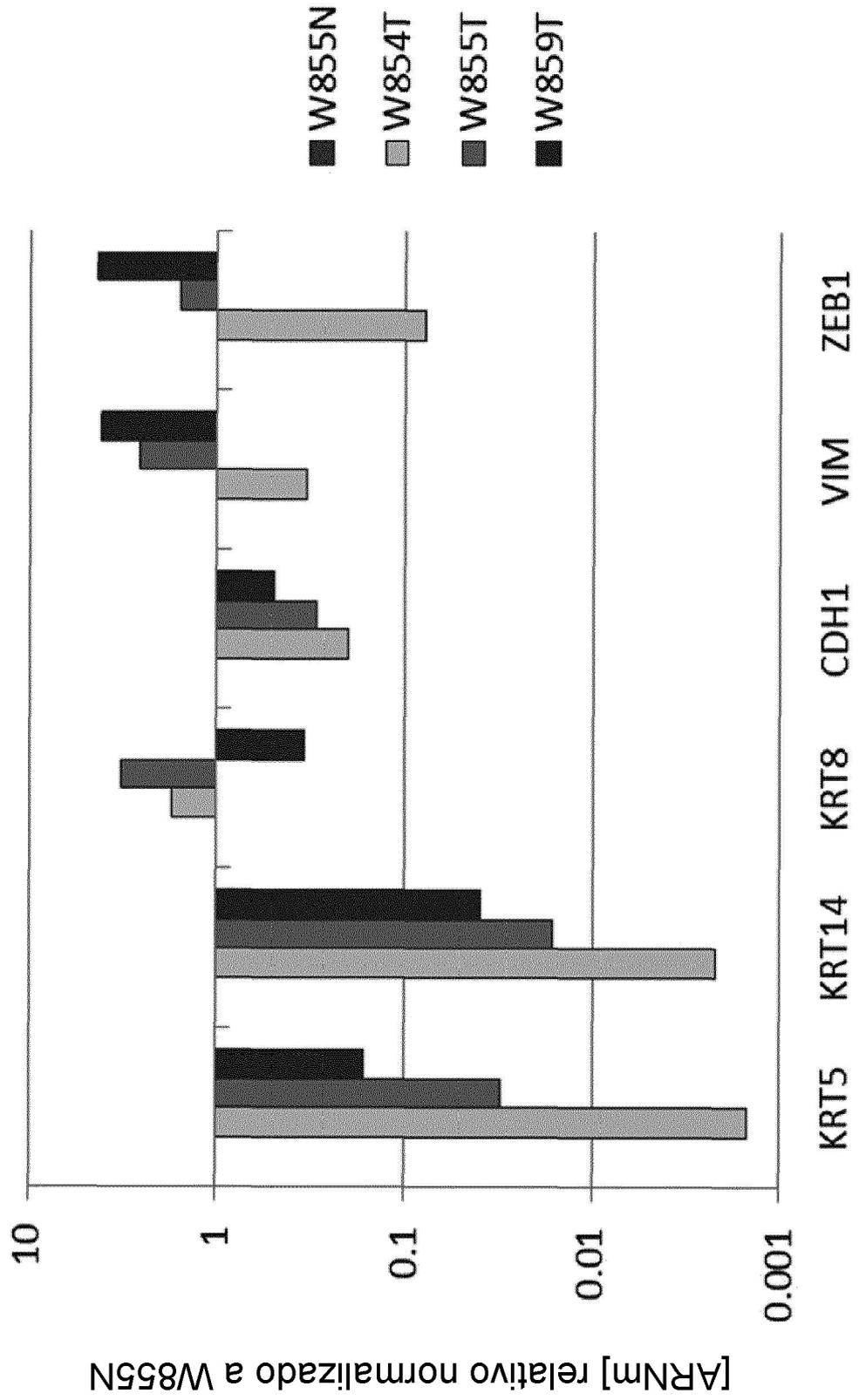


**FIG. 5**

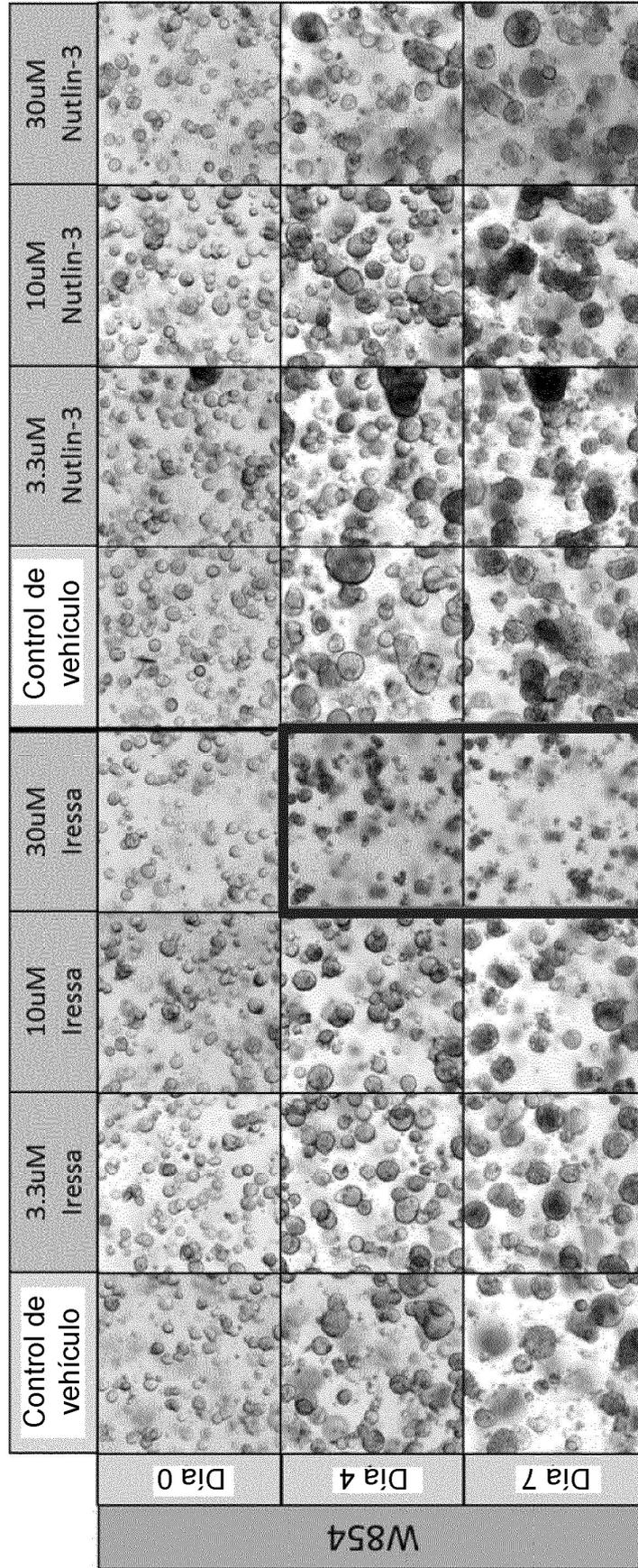
Barras de escala de IHC igual a 100um y 20 um respectivamente



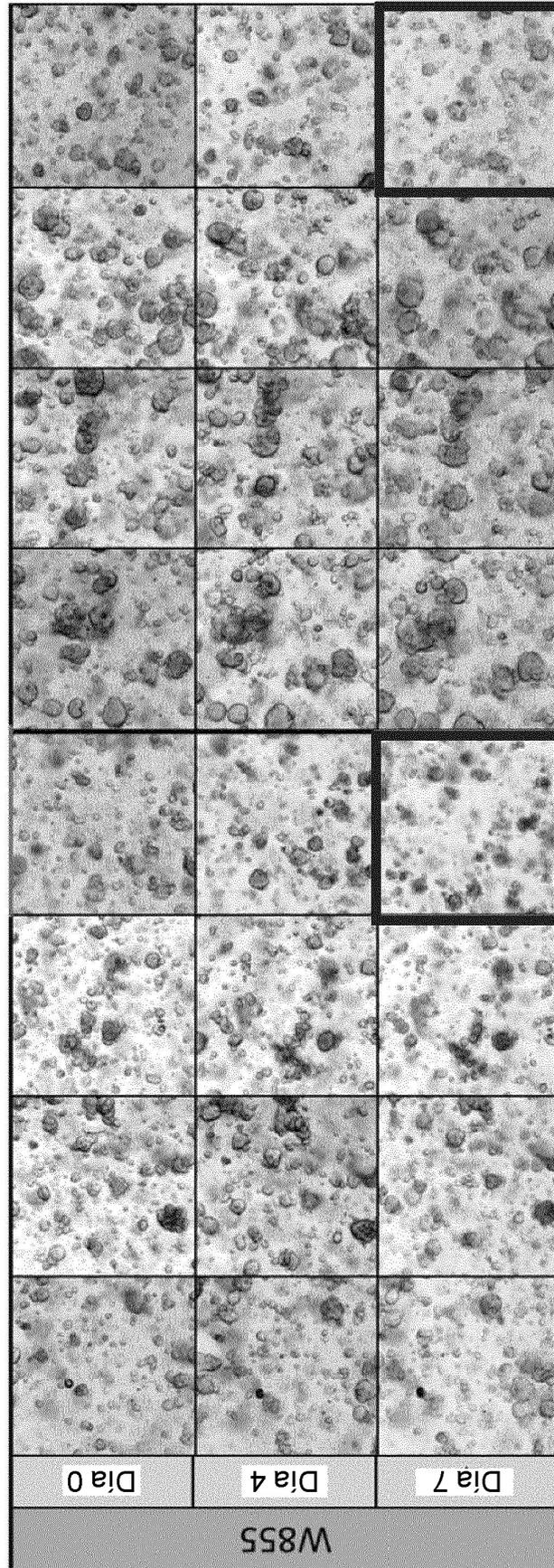
**FIG. 7**

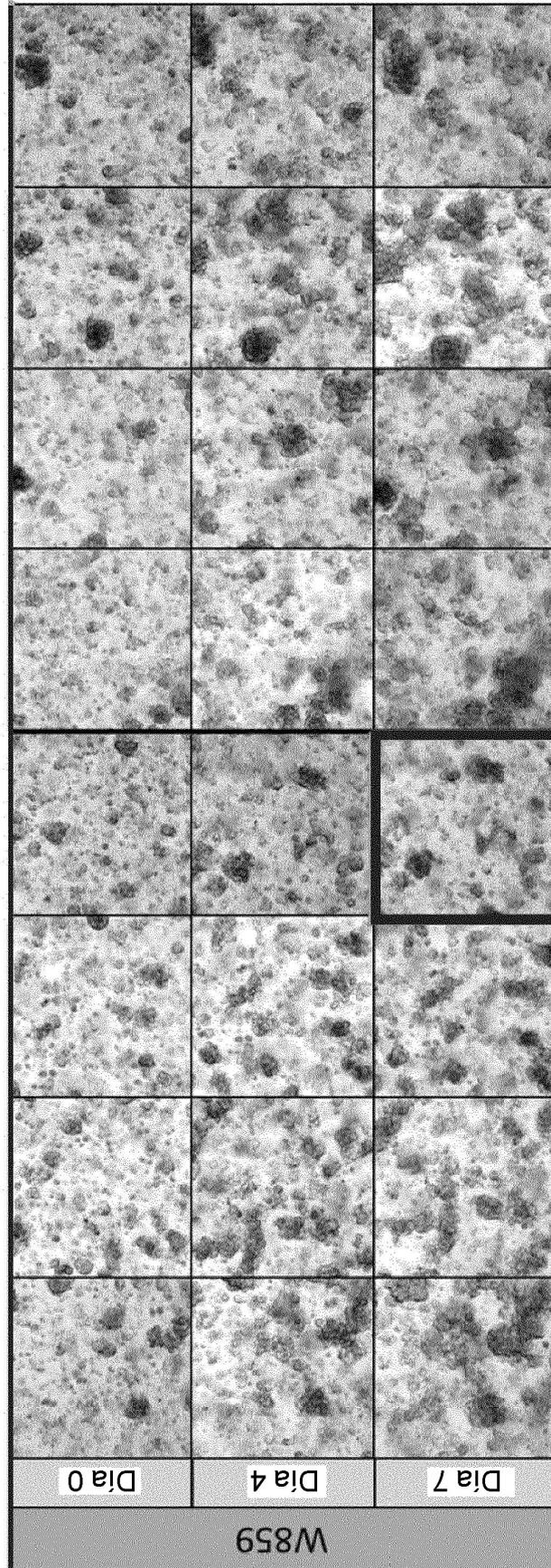


**FIG. 8**

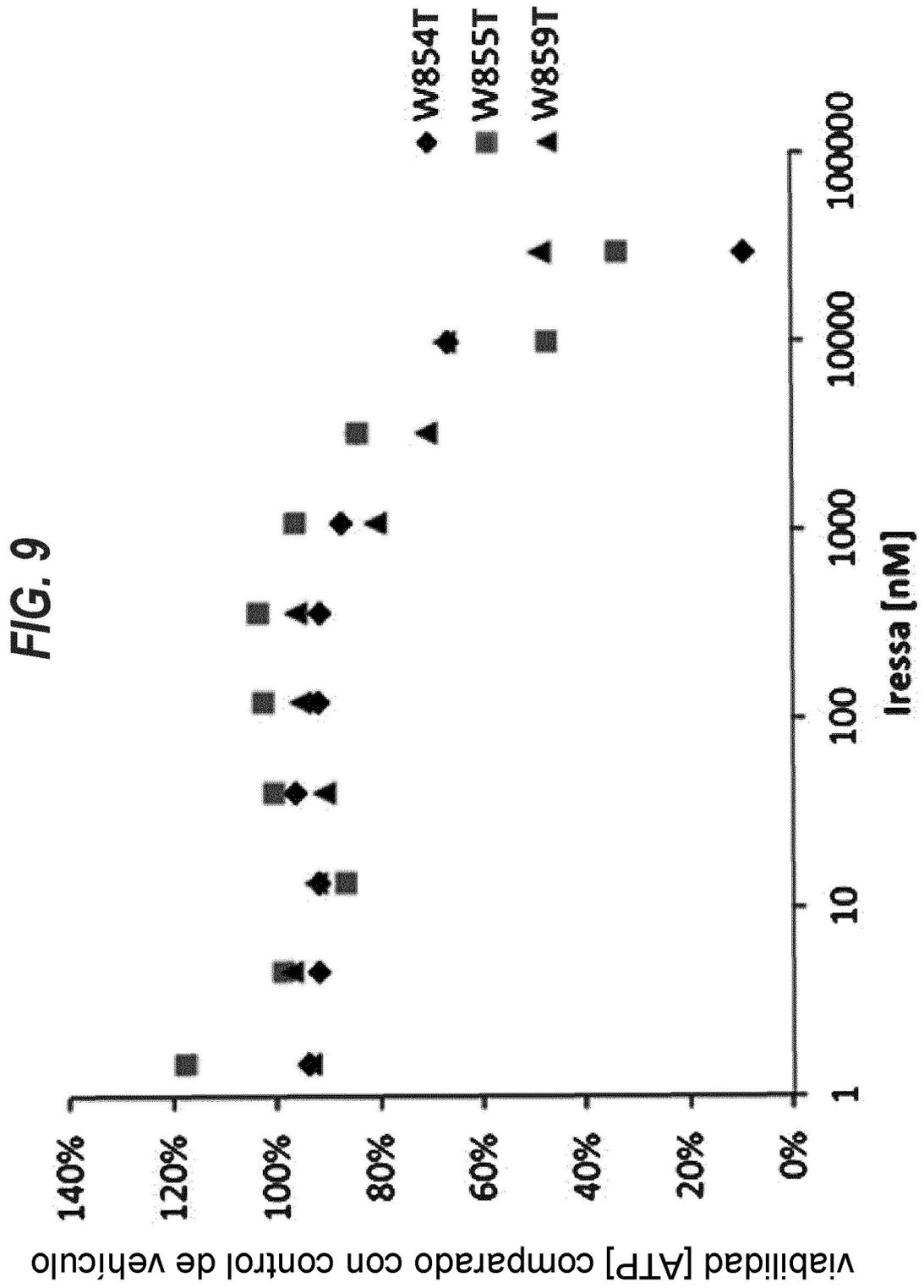


**FIG. 8**(cont.)





**FIG. 8**(cont.)



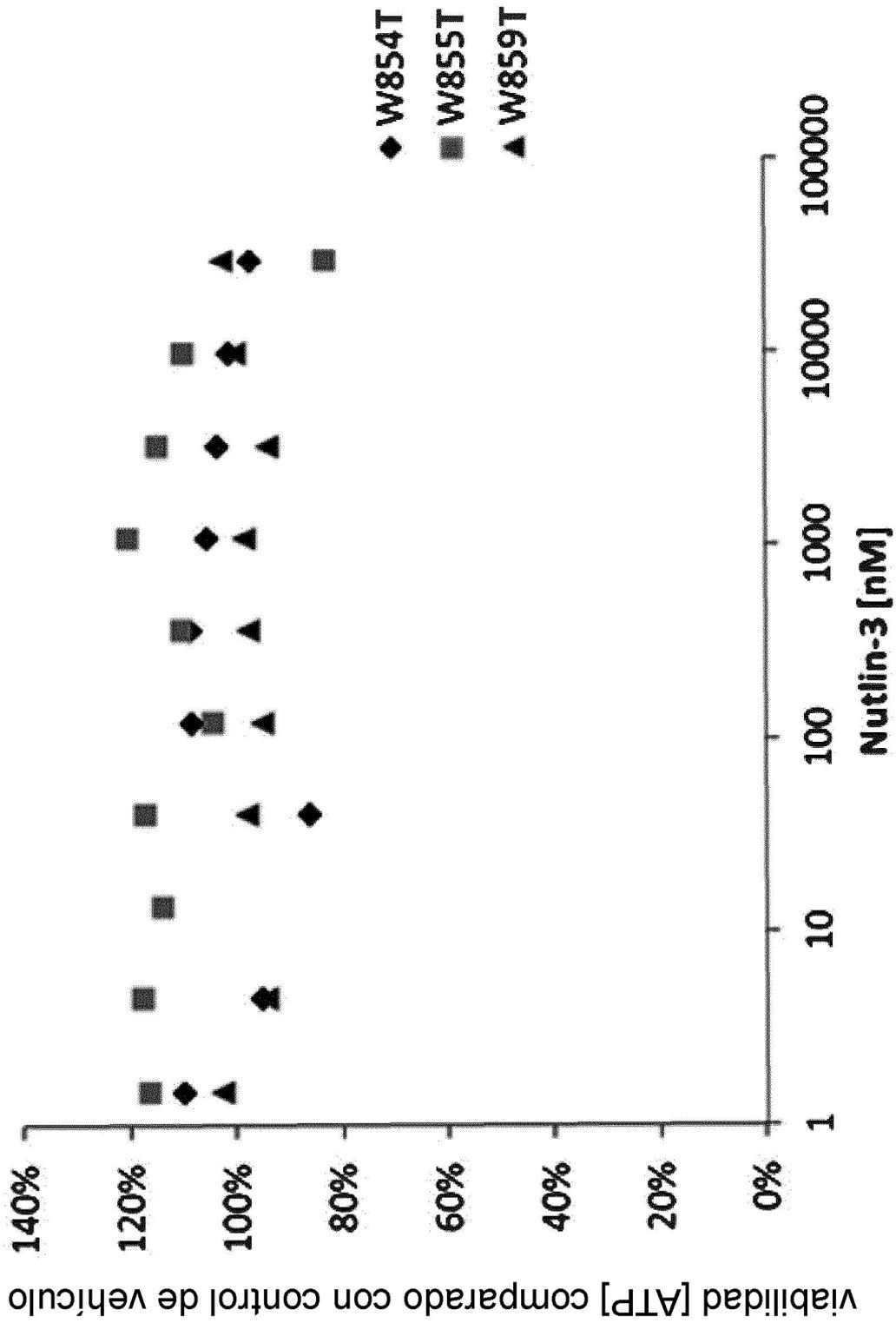
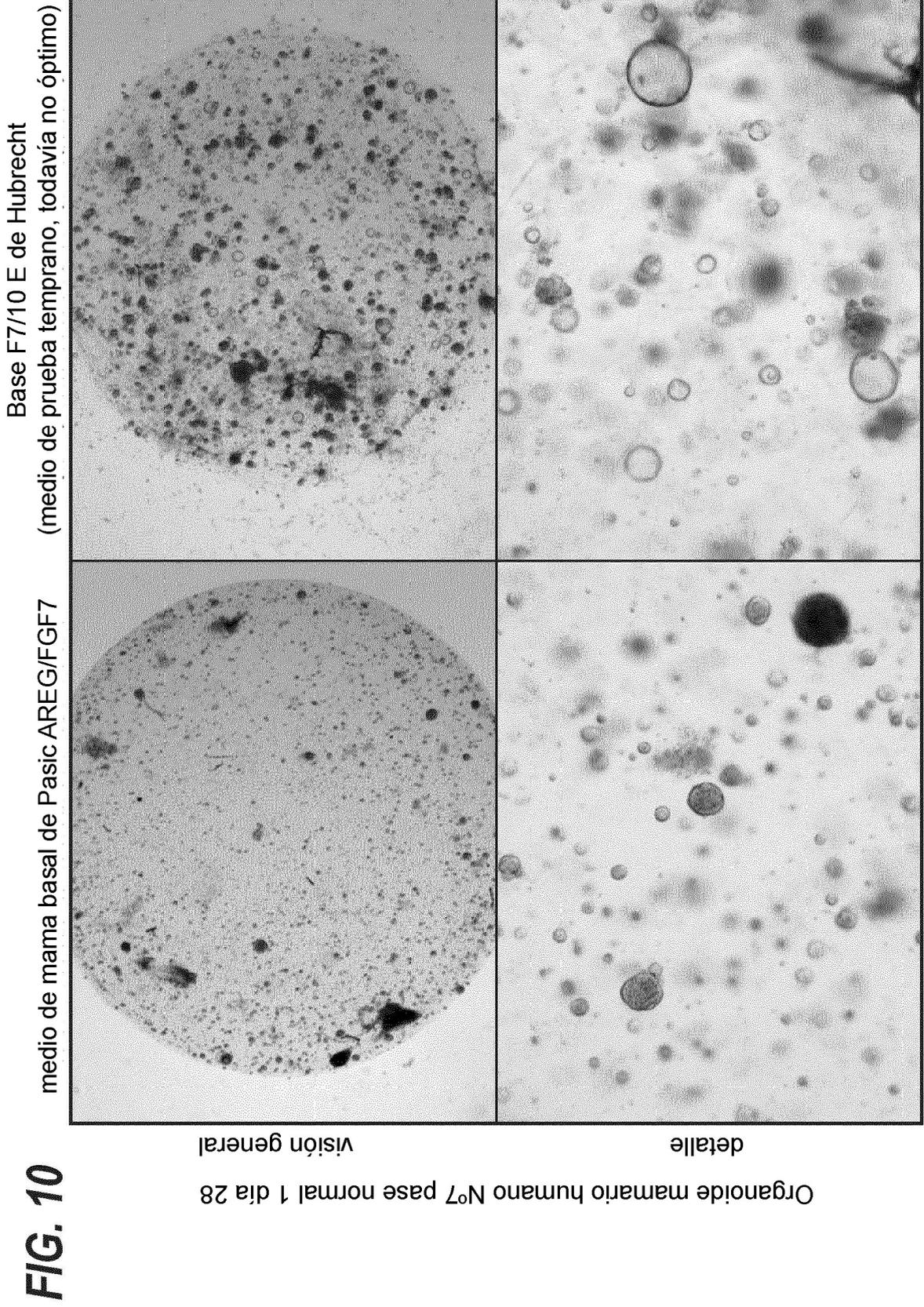
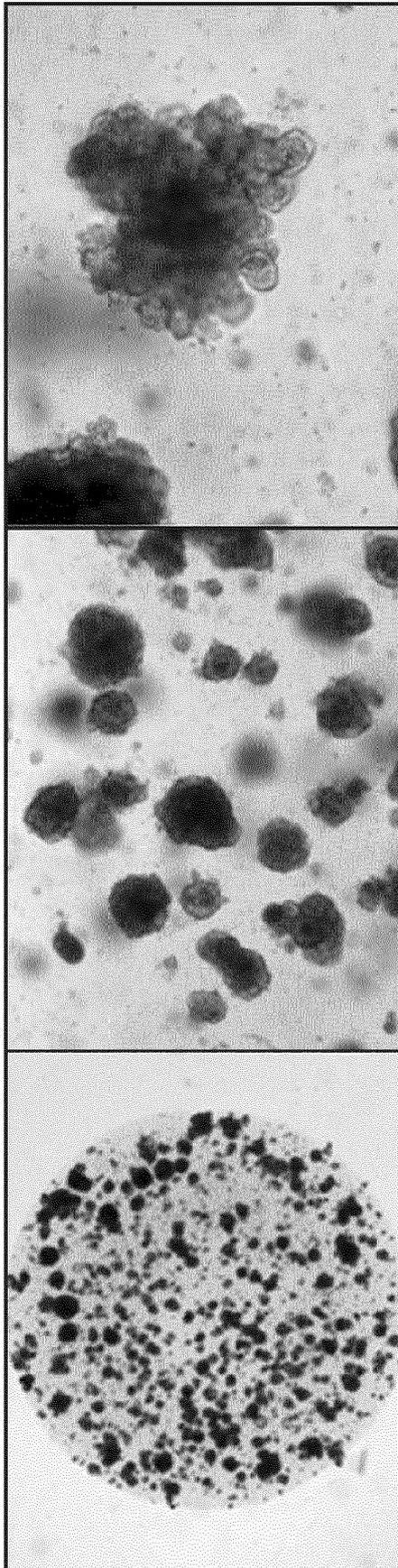


FIG. 9(cont.)

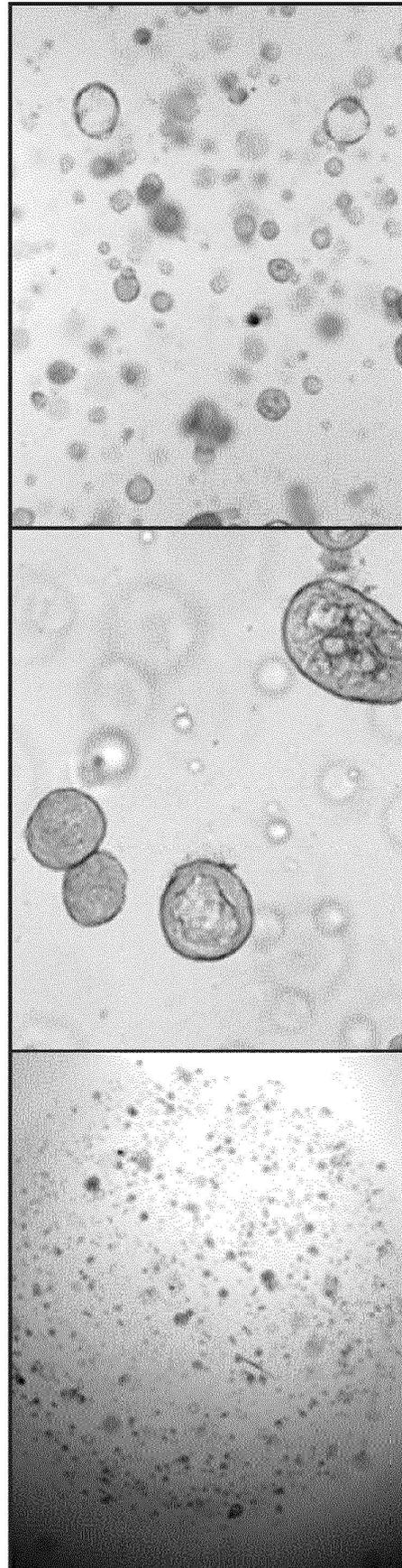
Organoides de mama humana (medio de Pasic et al frente a nuestro medio)



**FIG. 11**



**FIG. 12**



**FIG. 13**

Fecha de muestreo	Tipo (N...normal, T...tumor)	ID	P0 P1 P2 P3 P4 P5 P6 P7 P8 P9 P10 P11	Etapas	Histopatología (diff... diferenciado, inv...invasivo ca...carcinoma, NST...sin tipo especial)	ER PR HER2	evaluación del cultivo
140128	T	W854	expansión	pT2, pN1a, L, V1, R0, G3	escasamente diff. inv. ca (NST ductal)	negativo negativo positivo3+	establecido
140203	N	W855	expansión	pT2, pN3a, L, V1, R1, G2	mod diff. inv. ca (NST ductal)	positivo positivo negativo 0	prometedor
140203	T	W855	expansión				establecido
140204	N	W856	diferenciado	pT2, pN0, L, V0, R0, G2	mod diff. inv. ca (NST ductal)	positivo positivo positivo2+	terminado
140204	T	W856	expansión detenida				terminado
140205	N	W859	creciendo lentamente	pT2, pN0, L, V0, R0, G3	escasamente diff. inv. ca (NST ductal)	negativo negativo negativo1+	establecido
140205	T	W859	expansión				terminado
140210	N	Z424	diferenciado	pT2, pN1a, L1, V0, R0, G2	mod diff. inv. ca (NST ductal)	positivo positivo positivo3+	prometedor
140210	T	Z424	creciendo lentamente				terminado
140213	N	W861	muy pocos	pT2, pN2, L, V1, R0, G2	mod diff. inv. ca (NST ductal)	positivo positivo negativo0	terminado
140213	T	W861	muy pocos				terminado
140306	N	W866	muy pocos	pT2, pN0, L, V0, R0, G3	escasamente diff. inv. ca (NST ductal)	negativo negativo negativo1+	terminado
140306	T	W866	muy pocos				terminado
140429	N	R1099	diferenciado	pT3, pN2a, N0, L1, V0, R1, G3	escasamente diff. inv. ca (NST ductal)	positivo positivo negativo 0	terminado
140429	T	R1099	diferenciado				terminado
140506	N	R1100	expansión	pT1c, pN0, N0, L1, V0, R0, G3	escasamente diff. inv. ca (NST ductal)	negativo negativo negativo	prometedor
140506	T	R1100	inactivo				prometedor



**FIG. 14**

	Nº de pedido	empresa	disuelto en	[stock]	base	*GF	**F <sub>7/10</sub> N	**F <sub>7/10</sub> EN	base
AdDF+++									base
Rspol CM	de fabricación propia	AdDF+++	100%	10%	10%	10%	10%	10%	10%
Noggin CM	de fabricación propia	AdDF+++	100%	10%	10%	10%	10%	10%	10%
Wnt3a CM	de fabricación propia	D10F	100%	50%	50%				
control CM	de fabricación propia	D10F	100%	50%	50%				
suplemento B27	Gibco/Invitrogen			1x	1x	1x	1x	1x	1x
N-acetilcisteína	Sigma	H2O	500mM	1.25mM	1.25mM	1.25mM	1.25mM	1.25mM	1.25mM
Nicotinamida	Sigma	PBS	1M	10mM	10mM	10mM	10mM	10mM	10mM
Y-27632 (inhibidor de ROCK 1,2)	Abmole	H2O	10mM	5uM	5uM	5uM	5uM	5uM	5uM
A83-01 (inhibidor de ALK 4, 5, 7)	Tocris	DMSO	500uM	500nM	500nM	500nM	500nM	500nM	500nM
SB 202190 (inhibidor de p38 MAP quinasa)	Sigma	DMSO	30mM	1uM	1uM	1uM	1uM	1uM	1uM
EGF humano	Peprotech	0.1% BSA/PBS	500ug/ml	1-50ng/ml	5ng/ml	5ng/ml	5ng/ml	5ng/ml	5ng/ml
FGF-7 humano	Peprotech	0.1% BSA/PBS	50ug/ml	*	5-25ng/ml	5ng/ml	5ng/ml	5ng/ml	5ng/ml
FGF-10	Peprotech	0.1% BSA/PBS	100ug/ml	20-100ng/ml	20ng/ml	20ng/ml	20ng/ml	20ng/ml	20ng/ml
ánfiregulina humana	R&D systems	0.1% BSA/PBS	10uM	5nM	5nM	5nM	5nM	5nM	5nM
heregulina humana β-1 (=neuregulina)	Peprotech	0.1% BSA/PBS	10uM	*	5nM	5nM	5nM	5nM	5nM
TGF-alfa humano	R&D systems	0.1% BSA/PBS	50ug/ml	50ng/ml	50ng/ml	50ng/ml	50ng/ml	50ng/ml	50ng/ml
PDGFCC humano	Peprotech	0.1% BSA/PBS	20ug/ml	20ng/ml	20ng/ml	20ng/ml	20ng/ml	20ng/ml	20ng/ml
Nutlin-3	Cayman Chem.	Etanol	5mM	5uM	5uM	5uM	5uM	5uM	5uM
AdDF+++									
500ml DMEM avanzado/F12 [Invitrogen #12634-034]									
+5ml GlutaMax 100 x [Invitrogen # 35050-068]									
+5ml Hepes 1 M [Invitrogen # 15630-056]									
+5ml Penicilina/Estreptomina 10K U/ml 10K µg/ml 100x [Invitrogen #15140-122]									
+500ul Primocina [Invitrogen # ant-pm-1]									
D10F									
DMEM 31966 Life Technologies 500 ml									
+ 60 ml FBS Sigma F7524									
+ 5 ml pen/strep 15140 Life Technologies									

\* factores de crecimiento añadidos solos o en combinación durante la optimización  
 \*\* factores de crecimiento añadidos al medio de cultivo usado actualmente