

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 024 935**

51 Int. Cl.:

A61K 35/22 (2015.01)
A61L 27/14 (2006.01)
A61L 27/38 (2006.01)
A61L 27/54 (2006.01)
B33Y 70/00 (2010.01)
B33Y 80/00 (2015.01)
C12N 5/071 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.10.2018** **PCT/AU2018/051178**
87 Fecha y número de publicación internacional: **09.05.2019** **WO19084612**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.10.2018** **E 18874672 (1)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.03.2025** **EP 3704227**

54 Título: **Composición y método**

30 Prioridad:

31.10.2017 AU 2017904424

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.06.2025

73 Titular/es:

**MURDOCH CHILDRENS RESEARCH INSTITUTE
(100.00%)
The Royal Children's Hospital Flemington Road
Parkville, Victoria 3052, AU**

72 Inventor/es:

**LITTLE, MELISSA y
KUMAR, SANTHOSH V.**

74 Agente/Representante:

DEL VALLE VALIENTE, Sonia

ES 3 024 935 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

Composición y método

5 Campo de la invención

La presente descripción se refiere a organoides renales y a métodos para fabricar los mismos. Los organoides y los métodos pueden usarse en una variedad de aplicaciones, tales como la modelización de enfermedades, la detección de fármacos, la medicina regenerativa y el aumento de la producción de células renales.

10 Antecedentes de la invención

Los riñones desempeñan un papel importante en la eliminación de los productos de desecho y mantienen el volumen de los fluidos corporales. Las unidades funcionales de trabajo se conocen como nefronas. Los riñones humanos contienen hasta 2 millones de nefronas epiteliales responsables de la filtración de la sangre, todas las cuales surgen después del nacimiento. No existen progenitores de nefrona en el riñón humano posnatal. Esta ausencia de población progenitora garantiza la incapacidad de autorrenovación de las nefronas y, por lo tanto, las lesiones, el envejecimiento y la enfermedad posteriores pueden provocar una enfermedad renal en fase terminal (ERFT). Las limitadas opciones de tratamiento que se utilizan para el tratamiento de la ERFT generalmente suponen un estrés adicional para el riñón ya dañado. Las únicas opciones de tratamiento disponibles pero costosas en las últimas etapas de la enfermedad renal son la diálisis y/o el trasplante de riñón, los cuales tienen desventajas significativas y afectan a la calidad de vida del paciente.

La diferenciación dirigida de las células madre pluripotentes humanas (hPSC, por sus siglas en inglés), incluidas las células madre embrionarias humanas (hES, por sus siglas en inglés) y las células madre pluripotentes inducidas por humanos (hiPS, por sus siglas en inglés), en distintos criterios de valoración celulares ha permitido la generación de modelos organoides de una variedad de tejidos humanos, incluido el riñón. Modelos de organoides anteriores, tales como los mencionados en Takasato y col. (2015) Nature, vol. 526: 564-568 y Morizane y col. (2015) Nature Biotechnol, vol. 33: 1193-1202 son caros y pueden producir organoides, que tienen una estructura tridimensional compleja, lo que restringe su uso en aplicaciones de diagnóstico por imágenes y detección. Estos organoides también pueden estar sujetos a limitaciones de difusión después de tres semanas en cultivo, lo que limita su capacidad de generar un mayor número de células y su capacidad de madurar. Esto, a su vez, convierte a los protocolos actuales para la producción de organoides renales en una fuente subóptima de células para la medicina regenerativa o la modelización de enfermedades. Por lo tanto, se requieren nuevos organoides renales y métodos para su fabricación.

35 Resumen de la invención

Los presentes inventores han identificado sorprendentemente organoides renales, que tienen una estructura tridimensional simplificada. Tales organoides son ventajosos en cuanto a que son más fáciles de visualizar y cultivar a largo plazo. La invención está definida por las reivindicaciones adjuntas. En consecuencia, el alcance de la invención está limitado por las reivindicaciones adjuntas.

También descrito en la presente memoria, en un ejemplo, la presente descripción abarca un organoide renal que comprende menos de 50 nefronas. En otro ejemplo, el organoide renal comprende menos de 25 nefronas. En otro ejemplo, el organoide renal comprende menos de 15 nefronas. En otro ejemplo, el organoide renal comprende entre 5 y 12 nefronas. En un ejemplo, los organoides renales se producen agitando en vórtice una población de células del mesodermo intermedio (MI) en un medio de cultivo celular en condiciones suficientes para promover el desarrollo de los organoides renales. En este ejemplo, el medio de cultivo de células MI puede comprender de aproximadamente de 180 a 220 ng/ml de FGF9.

En un ejemplo, los organoides renales se producen agitando en vórtice entre $0,5 \times 10^6$ y $1,5 \times 10^6$ células MI/ml. En otro ejemplo, los organoides renales se producen agitando en vórtice de aproximadamente de $0,8$ a $1,2 \times 10^6$ células MI/ml. En otro ejemplo, el organoide renal comprende células que expresan niveles altos de marcadores de nefrona. En otro ejemplo, el organoide renal comprende células que expresan niveles altos de uno o más de PAX2, LHX1, SIX1, OSR1, WNT11 y GATA3. En otro ejemplo, el organoide renal comprende células que expresan niveles altos de PAX2, LHX1, SIX1, OSR1, WNT11 y GATA3. En otro ejemplo, el organoide renal comprende células que expresan niveles altos de uno o más de PAX2, SIX1, LHX1, OSR1, WNT11, GATA3, PAX8, EYA1 y CITED1 y/o niveles bajos de uno o más de PDGFRA, MEIS2, WT1 y/o C-RET. En otro ejemplo, el organoide renal comprende células que expresan niveles altos de PAX2, LHX1, SIX1, OSR1, WNT11, GATA3, PAX8, EYA1 y CITED1.

En otro ejemplo, el organoide renal se obtiene de células madre seleccionadas del grupo que consiste en H9, hES3, iPSC GAPTrap *td-Tomato*, CRL1502.C32, CLR1502.3, hES3 *SOX17mCherry* o H9 GAPTrap *Luc2*.

En otro ejemplo, el organoide renal comprende células que expresan niveles bajos de marcadores estromales. En otro ejemplo, el organoide renal comprende células que expresan niveles bajos de PDGFRA, MEIS2, WT1 y/o C-RET. En otro ejemplo, el organoide renal comprende podocitos NPHS+, segmentos proximales LTL+, segmentos distales

ECAD+, conducto colector ECAD+/GATA3+ o una combinación de los mismos. En otro ejemplo, el organoide renal comprende de aproximadamente 1×10^4 a 5×10^4 células. En otro ejemplo, el organoide renal comprende de aproximadamente $1,5 \times 10^4$ a $2,5 \times 10^4$ células. En otro ejemplo, el organoide renal tiene un diámetro de aproximadamente 250 a 500 μm . En otro ejemplo, el organoide renal permanece viable en un cultivo en espiral durante al menos dieciocho días. En otro ejemplo, el organoide renal permanece viable en un cultivo en espiral durante al menos tres semanas. En otro ejemplo, el organoide renal permanece viable en un cultivo en espiral durante al menos cuatro semanas. En otro ejemplo, las nefromas de los organoides renales comprenden el conducto colector (GATA3+; ECAD+), el túbulo distal temprano (GATA3-; LTL-; ECAD+), el túbulo proximal temprano (LTL+; ECAD-) y el glomérulo (WT1+).

Los presentes inventores también han identificado sorprendentemente, que las células de los organoides renales descritos en la presente memoria continúan dividiéndose después de 7 días en cultivo vorticial (por ejemplo, D7+7). Sin pretender ceñirse a ninguna teoría en particular, esto puede indicar que los organoides producidos mediante el cultivo en vórtice son más adecuados para aplicaciones terapéuticas, tales como el trasplante.

En otro ejemplo, la presente descripción abarca una composición, que comprende un organoide renal definido en la presente memoria. En otro ejemplo, la presente descripción abarca una composición, que comprende un organoide renal definido en la presente memoria o un digerido (solución de digestión) del mismo. Por ejemplo, la presente descripción abarca una composición, que comprende un organoide renal definido en la presente memoria o una digestión enzimática del mismo.

De nuevo, sin pretender ceñirse a ninguna teoría en particular, se cree que la baja complejidad de los organoides renales descritos en la presente memoria puede hacerlos más adecuados para producir composiciones para trasplantes. Por ejemplo, las composiciones producidas a partir de organoides renales de baja complejidad pueden estar más inclinadas a diferenciarse en los tipos de células correctos que a formar teratomas o cartílago. En otro ejemplo, la presente descripción abarca una composición, que comprende una digestión enzimática de un organoide renal definido en la presente memoria.

En otro ejemplo, la presente descripción abarca un método para tratar la enfermedad renal, que comprende administrar una composición definida en la presente memoria a un sujeto que lo necesite. En un ejemplo, la composición comprende un organoide completo. En otro ejemplo, la composición comprende una digestión de un organoide descrito en la presente memoria. Por ejemplo, la enfermedad renal puede ser insuficiencia renal. En un ejemplo, la composición se administra por vía intravenosa. En otro ejemplo, la composición se administra mediante inyección en la arteria renal, inyección en el parénquima renal, implantación o trasplante subcapsular.

En otro ejemplo, la presente descripción abarca un método *in vitro* para producir un organoide renal, donde el método comprende agitar en vórtice una población de células del mesodermo intermedio (MI) en un medio de cultivo celular que comprende FGF.

En un ejemplo, el método proporciona un medio rentable para aumentar la producción de tipos de células renales *in vitro*. En un ejemplo, las células IM se agitan en un medio de cultivo que contiene FGF, CHIR y heparina. En un ejemplo, las células MI se agitan en un cultivo durante al menos 5 días, en donde las primeras 24 horas comprenden agitar en vórtice las células en un medio de cultivo celular, que comprende FGF, heparina, CHIR y un inhibidor de ROCK y los cuatro días siguientes comprenden cultivar células en un medio de cultivo celular, que comprende FGF, heparina y CHIR. En este ejemplo, el inhibidor ROCK está presente en el medio de cultivo celular durante las primeras 24 horas y está ausente del medio de cultivo celular durante los días siguientes. En un ejemplo, los medios de cultivo celular comprenden de 100 a 300 ng/ml de FGF9. En un ejemplo, los medios de cultivo celular comprenden de 180 a 220 ng/ml de FGF9. En un ejemplo, los medios de cultivo celular comprenden PVA y MC. En un ejemplo, las primeras 24 horas comprenden la agitación en vórtice de las células en un medio de cultivo celular, que comprende FGF, de 0,5 a 1,5 $\mu\text{g/ml}$ de heparina, de 0,5 a 1,5 μM de CHIR y de 9 a 11 μM de inhibidor de ROCK. En otro ejemplo, los cuatro días siguientes comprenden la agitación en vórtice de las células en un medio de cultivo celular, que comprende FGF, de 0,5 a 1,5 $\mu\text{g/ml}$ de heparina y de 0,5 a 1,5 μM de CHIR. En este ejemplo, el inhibidor ROCK está ausente del medio de cultivo celular durante los próximos cuatro días. En otro ejemplo, los siguientes cuatro días comprenden cultivar células en un medio de cultivo celular, que comprende FGF9, heparina, CHIR, MC y PVA. En otro ejemplo, los siguientes cuatro días comprenden cultivar células en un medio de cultivo celular, que comprende FGF9, heparina, CHIR, de 0,05 a 0,2 % de MC y de 0,05 a 0,2 % de PVA. En otro ejemplo, los días restantes de cultivo, después de los al menos cinco días, las células se cultivan en un medio de cultivo celular, que comprende de 0,05 a 1,5 % de PVA y de 0,05 a 1,5 % de MC. En este ejemplo, el medio de cultivo celular puede contener PVA y MC sin inhibidores de FGF9, heparina, CHIR o ROCK. En otro ejemplo, los medios de cultivo celular que comprenden FGF comprenden al menos 100 ng/ml de FGF9. En otro ejemplo, los medios de cultivo celular que comprenden FGF comprenden al menos 150 ng/ml de FGF9. En otro ejemplo, los medios de cultivo celular que comprenden FGF comprenden de 150 a 250 ng/ml de FGF9. En otro ejemplo, los medios de cultivo celular que comprenden FGF comprenden de 180 a 220 ng/ml de FGF9.

En algunos ejemplos, los métodos de producción de organoides renales descritos en la presente memoria dan como resultado un rendimiento celular mejorado en comparación con el rendimiento celular obtenido a partir de organoides

producidos sin generación de vórtice, tales como los descritos en Takasato y col. (2015). En un ejemplo, se puede observar un aumento de 30 veces en el rendimiento celular con respecto al número inicial de células MI añadidas al cultivo vorticial después de 10 días en el cultivo en vórtice. En otro ejemplo, se puede observar un aumento de 35 veces en el rendimiento celular con respecto al número inicial de células MI añadidas al cultivo vorticial después de 10 días en el cultivo en vórtice. En otro ejemplo, se puede observar un aumento de 40 veces en el rendimiento celular con respecto al número inicial de células MI añadidas al cultivo vorticial después de 12 días en el cultivo en vórtice. En otro ejemplo, se puede observar un aumento de 45 veces en el rendimiento celular con respecto al número inicial de células MI añadidas al cultivo vorticial después de 12 días en el cultivo en vórtice. En otro ejemplo, se puede observar un aumento de 30 a 40 veces en el rendimiento celular con respecto al número inicial de células MI añadidas al cultivo vorticial después de 12 días en el cultivo en vórtice. En otro ejemplo, se puede observar un aumento de 30 a 40 veces en el rendimiento celular con respecto al número inicial de células MI añadidas al cultivo vorticial después de 18 días en el cultivo en vórtice.

En un ejemplo, las células IM giran entre 30 y 90 rpm. En otro ejemplo, las células IM se agitan durante 18 a 24 días.

En otro ejemplo, las células MI se producen cultivando una población de células madre durante al menos siete días, donde los primeros 4 a 5 días comprenden cultivar células madre en un medio de cultivo celular, que comprende al menos 6 μM de un agonista de Wnt/ β -catenina y los días restantes de cultivo comprenden cultivar células en un medio de cultivo celular, que comprende FGF y al menos 0,5 μM de un agonista de Wnt/ β -catenina. En un ejemplo, el agonista de Wnt/ β -catenina es CHIR. En estos ejemplos, el medio de cultivo celular que comprende FGF puede comprender entre 100 y 300 ng/ml de FGF9. En estos ejemplos, el medio de cultivo celular que comprende FGF puede comprender entre 0,5 y 1,5 μM de CHIR. En estos ejemplos, el medio de cultivo celular que comprende FGF puede comprender además de 0,5 a 1,5 $\mu\text{g/ml}$ de heparina. En un ejemplo, las células MI se disocian con EDTA o tripsina o TrypLE™ select y se pasan a través de una malla antes de agitar. En un ejemplo, las células madre son células madre pluripotentes, células madre embrionarias o células madre pluripotentes inducidas (iPS). En un ejemplo, las células madre se seleccionan del grupo que consiste en H9, hES3, iPSC GAPTrap *td-Tomato*, CRL1502.C32, CLR1502.3, hES3 *SOX17mCherry* o H9 GAPTrap *Luc2*.

Los presentes inventores identificaron que los métodos de la presente descripción requieren un número de células iniciales relativamente bajo. Esto es ventajoso, ya que permite un aumento rentable del cultivo de organoides y células. En consecuencia, en otro ejemplo, los métodos de la presente descripción comprenden agitar en vórtice una población de $0,5 \times 10^6$ células MI/ml a 3×10^6 células MI/ml. En otro ejemplo, los métodos de la presente descripción comprenden agitar en vórtice una población de aproximadamente $0,8 \times 10^6$ células MI/ml a $1,2 \times 10^6$ células MI/ml. En consecuencia, en un ejemplo, la presente descripción abarca un organoide renal descrito en la presente memoria, en donde el organoide se produce agitando en vórtice una población de células MI. En la presente memoria se describen ejemplos de temporización y medios de cultivo utilizados para agitar la población de células MI para producir un organoide renal. En un ejemplo, el organoide se produce agitando en vórtice una población de células MI que comprende de $0,5 \times 10^6$ células MI/ml a 3×10^6 células MI/ml. En otro ejemplo, el organoide se produce agitando en vórtice una población de células MI que comprende menos de 2×10^6 células MI. En otro ejemplo, el organoide se produce agitando en vórtice una población de células MI que comprende de $0,5 \times 10^6$ células MI/ml a $1,5 \times 10^6$ células MI/ml. En otro ejemplo, el organoide se produce agitando en vórtice una población de células MI que comprende de aproximadamente $0,8 \times 10^6$ células MI/ml a $1,2 \times 10^6$ células MI/ml.

En otro ejemplo, la presente descripción abarca un organoide renal producido mediante un método definido en la presente memoria.

En otro ejemplo, la presente descripción abarca un método de selección de un compuesto candidato para determinar su nefrotoxicidad, donde el método comprende poner en contacto un organoide renal definido en la presente memoria con un compuesto candidato, para determinar si el compuesto candidato es nefrotóxico o no. En un ejemplo, el compuesto candidato es una molécula pequeña.

En otro ejemplo, la presente descripción abarca un organoide renal, una población celular o una composición definida en la presente memoria, cuando se usa para producir un riñón, o células o tejidos renales. En otro ejemplo, la presente descripción abarca un organoide renal, una población celular o una composición definida en la presente memoria para su uso en el tratamiento de la enfermedad renal. En algunos ejemplos, una población celular se refiere a las células derivadas de la digestión enzimática de un organoide renal.

Los presentes inventores también han identificado sorprendentemente, que cultivar células madre en un medio que comprenda una concentración baja de CHIR y activar la señalización de Wnt/ β -catenina durante un período prolongado es beneficioso para producir un mesodermo intermedio mejorado.

En un ejemplo, la presente descripción abarca un método *in vitro* para producir células de mesodermo intermedias (MI), donde el método comprende cultivar una población de células de la línea primitiva posterior (PPS) durante 2 a 5 días en un medio de cultivo celular, que comprende FGF y menos de 4 μM de un agonista de Wnt/ β -catenina.

En otro ejemplo, las células madre pueden cultivarse inicialmente en CHIR durante alrededor de siete días, en donde las células madre se cultivan en un medio de cultivo, que comprende CHIR de alta concentración durante los primeros 4 a 5 días antes de cultivarse en un medio de cultivo, que comprende CHIR y FGF de baja concentración durante los días restantes. En consecuencia, en otro ejemplo, la presente descripción abarca un método *in vitro* para producir células del mesodermo intermedio (MI), donde el método comprende cultivar una población de células madre durante al menos siete días, en donde los primeros 4 a 5 días comprenden cultivar células madre en un medio de cultivo celular, que comprende al menos 6 μM de un agonista de Wnt/ β -catenina y los días restantes de cultivo comprenden cultivar células en un medio de cultivo celular, que comprende FGF y al menos 0,5 μM de un agonista de Wnt/ β -catenina. En un ejemplo, los días restantes de cultivo comprenden cultivar células en un medio de cultivo celular que comprende FGF, que comprende entre 0,5 y 3 μM de un agonista de Wnt/ β -catenina. En otro ejemplo, los días restantes de cultivo comprenden cultivar células en un medio de cultivo celular que comprende FGF, que comprende de 0,8 a 1,2 μM de un agonista de Wnt/ β -catenina. En otro ejemplo, los primeros 4 días comprenden cultivar células madre en un medio de cultivo celular que comprende al menos 6 μM de un agonista de Wnt/ β -catenina. En otro ejemplo, los primeros 4 días comprenden cultivar células madre en un medio de cultivo celular que comprende 7 μM de un agonista de Wnt/ β -catenina. En un ejemplo, el medio de cultivo celular que comprende FGF comprende entre 100 y 300 ng/ml de FGF9. En un ejemplo, el medio de cultivo celular que comprende FGF comprende entre 180 y 220 ng/ml de FGF9. En otro ejemplo, el medio de cultivo celular que comprende FGF9 comprende además heparina. Por ejemplo, el medio de cultivo celular puede comprender al menos 1,0 $\mu\text{g/ml}$ de heparina. En un ejemplo, las células madre son células madre pluripotentes, células madre embrionarias o células madre pluripotentes inducidas (iPS). En otro ejemplo, las células madre se seleccionan del grupo que consiste en H9, hES3, iPSC GAPTrap *td-Tomato*, CRL1502.C32, CLR1502.3, hES3 *SOX17mCherry* o H9 GAPTrap *Luc2*.

En otro ejemplo, la presente descripción abarca un método de bioimpresión de un riñón, que comprende preparar una tinta biológica a partir de una población de organoides o células definida en la presente memoria y bioimprimir un riñón. En algunos ejemplos, una población celular se refiere a las células derivadas de la digestión enzimática de un organoide renal.

En otro ejemplo, la presente descripción abarca un organoide, una composición o una población celular definida en la presente memoria, cuando se usa para producir un riñón o células o tejidos renales. En otro ejemplo, la presente descripción abarca un método para generar tipos de células de nefrona para la terapia celular, donde el método comprende producir un organoide renal usando un método o una población de células MI definida en la presente memoria.

Se considerará que cualquier ejemplo de la presente memoria se aplica *mutatis mutandis* a cualquier otro ejemplo, a menos que se indique específicamente otra cosa.

La presente descripción no debe estar limitada en su alcance por los ejemplos específicos descritos en la presente memoria, que están destinados únicamente a fines de ilustración.

A lo largo de esta memoria descriptiva, a menos que se indique específicamente otra cosa o que el contexto exija lo contrario, la referencia a una sola etapa, composición de materia, grupo de etapas o grupo de composiciones de materia se considerará que abarcan una y una pluralidad (es decir, una o más) de esas etapas, composiciones de materia, grupos de etapas o grupo de composiciones de materia.

La descripción se describe a continuación por medio de los siguientes ejemplos no limitativos y con referencia a los dibujos adjuntos.

Breve descripción de los dibujos adjuntos

Figura 1. Generación de microorganoides renales en cultivo en suspensión. **(A)** Esquema del protocolo de diferenciación de microorganoides renales con imágenes de una diferenciación realizada con células CRL1502.C32. **(B)** Imágenes de campo brillante que muestran microorganoides renales uniformes el día 7+18 (escala 100 μm). **(C, D1 y D2)** Imágenes de inmunofluorescencia y confocales de microorganoides que muestran la formación de segmentos de nefronas independientemente del tamaño y la forma de los microorganoides, incluido el desarrollo de estructuras vasculares (escala 100 μm). **(E)** Gráficos de barras que muestran el nivel de cambio promedio para el perfil de expresión génica del mesodermo intermedio mediante qPCR el día 7+0 para FGF9 +/- CHIR99021 1 μM . Los datos se representaron como media. **(F)** Inmunofluorescencia para PAX2 para el tratamiento con FGF9 +/- CHIR99021 1 μM (escala 50 μm) (D7+11). **(G)** Imágenes de inmunofluorescencia y confocales de los compartimentos de las nefronas dentro de los microorganoides renales; podocitos (NPHS1+ y MAFB+), túbulo proximal (LTL+, CUBN+, LRP2+ y HNF4A+), túbulo distal (ECAD), conducto colector (ECAD+ GATA3+) y células endoteliales (SOX17+ y PECAM1+) (escala 50 μm).

Figura 2. Los microorganoides renales en cultivo en suspensión muestran túbulo proximal funcional y la señalización inicial de Wnt es importante para el desarrollo y la maduración de los organoides renales. **(A)** Imagen confocal de los túbulo microorganoides del riñón el día 7+18 que muestra la absorción de albúmina del FITC (escala 5 μm). **(B)** Imágenes confocales de microorganoides renales generadas con 4 líneas celulares diferentes, incluidas las

hES (H9 GAP-Trap Luc2, hES3 SOX17mCherry) y las iPS (CRL1502.C32 y CRL1502.3) el día 7+18, con anticuerpos que etiquetan diferentes segmentos de nefronas (escala 50 µm). **(C, D y E)** Microorganoides obtenidos de hES3 SOX17mCherry generados después de la exposición a diferentes días de CHIR99021 7 µM inicial durante 3, 4, 5 y 6 días de tratamiento, que muestran imágenes confocales de campo claro (C, escala 100 µm) e inmunofluorescencia, que muestran la vasculatura SOX17+ **(D)** y el estroma MEIS 1/2/3+ **(E)** (escala 100 µm).

Figura 3. Validación transcripcional de la diferenciación renal dentro de microorganoides. **(A)** Gráfico de t-SNE después de la agrupación de Seurat de la RNA-seq (secuenciación de ARN) de una sola célula de microorganoides CRL1502.C32 del día 7+18, que muestra 11 grupos diferentes. **(B)** Mapa de calor que muestra la expresión génica a escala de genes marcadores clave dentro de los grupos. **(C)** Gráficos de t-SNE que indican la expresión de genes marcadores clave para el tipo de célula de nefrona seleccionado. La intensidad del color se escala por gen, donde el azul indica una mayor expresión.

Figura 4. Los microorganoides renales proporcionan una mejor plataforma para el aumento eficiente de las células renales obtenidas de las hPSC. **(A)** Imagen de campo claro del organoide renal estándar en los días 7+11 (izquierda, escala 500 µm), imagen de inmunofluorescencia y confocal (escaneo en mosaico) de todo el organoide estándar que muestra la restricción espacial de las estructuras de las nefronas hasta el borde del organoide (centro, escala 200 µm) e imagen ampliada de una nefrona dentro de ese organoide (derecha, escala 200 µm). **(B)** Imagen de campo claro de un microorganoide renal e imagen de campo claro ampliada de un solo microorganoide renal, imagen confocal de microorganoides renales en D7+11 (escala 200 µm). **(C)** Cambio en el tamaño de los organoides en diferentes etapas de desarrollo. **(D)** Cambio en el número total de células con respecto al número de células iniciales a lo largo del tiempo y la capacidad escalable de los microorganoides en comparación con la del organoide estándar. **(E-F)** La inmunofluorescencia y la reconstrucción 3D de Bitplane-Imaris de microorganoides C32 en D7+18 mostraron segmentos de nefrona claros conectados entre sí de manera polarizada a partir de los glomérulos (NPHS1), el túbulo proximal (LTL+), los túbulos distales (ECAD+), el conducto colector (ECAD+, GATA3+) y las células intersticiales (GATA3+).

Figura 5. El perfil transcripcional unicelular comparativo de organoides y microorganoides renales estándar demuestra un patrón nefrogénico equivalente. **(A)** Gráficos de t-SNE después de un análisis integrado de Seurat de datos de scRNA-seq 10 x de microorganoides renales (Micro-org) y organoides estándar (Stand-org) del día 7+18 (CRL1502.32). **(B)** Gráfico de t-SNE que representa las contribuciones de microorganoides y organoides estándar a los tipos de células de cada grupo, coloreado por tipo de organoide **(C)** Gráfico de barras que representa la proporción de cada uno de los conjuntos de datos de Micro-org o Stand-org asignados a cada grupo transcripcional y tipo de linaje de diferenciación. **(D)** Gráficos de puntos divididos que muestran la expresión génica de los marcadores renales en cada grupo entre los microorganoides renales y los organoides estándar. **(E)** Gráficos de dispersión y violín que muestran los recuentos logarítmicamente normalizados por célula para la nefrona (PAX2, SIX1, LHX1) y los genes relacionados con el estroma (PDGFRA, MEIS2) dentro de Micro-org y Stand-org. **(F)** Inmunofluorescencia que muestra la expresión de PAX2 y MEIS1/2/3 entre el Micro-org y el Stand-org de riñón (escala 50 µm).

Figura 6. Comparación de los marcadores de nefrona y estroma dentro del Micro y Stand-org. **(A y B)** Gráficos característicos de t-SNE para genes de nefronas y estromas en datos de scRNA-seq estándar y de microorganoides.

Figura 7. Todo el ácido trans-retinoico ayuda a mejorar la maduración glomerular de los microorganoides renales. Análisis de inmunofluorescencia de organoides vorticiales C32 generados por un cultivo en suspensión vorticial. **(A)** Organoides generados sin suplementación en atRA. **(B)** Los organoides generados con atRA de D7+5 a D7+10 muestran una mejor maduración de los podocitos glomerulares. **(C)** Análisis por qPCR de organoides generados con y sin atRA en diferentes momentos (D7+11 y D7+18).

Figura 8. Los microorganoides renales proporcionan una plataforma para la detección de la toxicidad de los fármacos. El tratamiento con adriamicina durante (24 horas) induce una toxicidad dependiente de la dosis en los microorganoides renales **(A-C)** al aumentar la expresión de TUNEL, un marcador apoptótico. **(D)** El tratamiento con adriamicina también reduce la expresión de genes específicos del riñón en los microorganoides.

Descripción detallada de la invención

A menos que se defina específicamente otra cosa, se considerará que todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria tienen el mismo significado que el que entiende comúnmente un experto en la técnica (por ejemplo, biología molecular, cultivo celular, diferenciación de células madre, terapia celular, modificación genética, modelización de enfermedades, bioquímica, fisiología y estudios clínicos).

A menos que se indique otra cosa, las técnicas moleculares y estadísticas utilizadas en la presente descripción son procedimientos estándar, bien conocidos por los expertos en la materia. Dichas técnicas se describen y explican en toda la bibliografía en fuentes tales como J. Perbal, *A Practical Guide to Molecular Cloning*, John Wiley and Sons (1984), J. Sambrook y col., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbour Laboratory Press (1989), T.A. Brown (editor), *Essential Molecular Biology: A Practical Approach*, volúmenes 1 y 2, IRL Press (1991), D.M. Glover y B.D. Hames (editores), *DNA Cloning: A Practical Approach*, volúmenes 1-4, IRL Press (1995 y

1996), y F.M. Ausubel y col. (editores), *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience (1988, incluidas todas las actualizaciones hasta la fecha), Ed Harlow y David Lane (editores) *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbour Laboratory, (1988), J.E. Coligan y col. (editores) *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons (incluidas todas las actualizaciones hasta la fecha), Michos Odysse (editor) *Kidney Development: Methods and Protocols* (Springer), Robert Lanza (editor) *Handbook of Stem Cells*, volumen 1, *Embryonic Stem Cells* (Elsevier).

Tal como se usan en esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, los términos en singular y en las formas singulares “a”, “una” y “el/la”, por ejemplo, incluyen opcionalmente referentes plurales, a menos que el contenido indique claramente otra cosa. Así, por ejemplo, la referencia a “un organoide renal” incluye opcionalmente uno o más organoides renales.

Tal como se usa en la presente memoria, el término “aproximadamente”, a menos que se indique otra cosa, se refiere a +/-10 %, más preferiblemente, +/-5 %, más preferiblemente, +/-1 % del valor designado.

Se entenderá que el término “y/o”, por ejemplo, “X y/o Y” significa “X e Y” o “X o Y”, y se interpretará como un apoyo explícito para ambos significados o para cualquiera de los significados.

A lo largo de esta memoria descriptiva, se entenderá que la palabra “comprender” o variaciones tales como “comprende” o “que comprende” implicará la inclusión de un elemento, número entero o etapa, o grupo de elementos, números enteros o etapas indicados, pero no la exclusión de ningún otro elemento, número entero o etapa, o grupo de elementos, números enteros o etapas.

Se pueden administrar composiciones celulares a varios sujetos según la presente descripción. En un ejemplo, el sujeto es un mamífero. El mamífero puede ser un animal de compañía, tal como un perro o un gato, o un animal de ganado, tal como un caballo o una vaca. En otro ejemplo, el sujeto es un ser humano. Términos tales como “sujeto”, “paciente” o “individuo” son términos que, en su contexto, se pueden usar indistintamente en la presente descripción.

Tal como se usa en la presente memoria, el término “tratamiento” se refiere a una intervención clínica diseñada para alterar el curso natural del individuo o la célula que se está tratando durante el curso de la patología clínica. Los efectos deseables del tratamiento incluyen la disminución de la tasa de progresión de la enfermedad, la mejora o paliación de la patología y la remisión o la mejora del pronóstico. Un individuo se “trata” con éxito, por ejemplo, si se mitigan o eliminan uno o más síntomas asociados a una enfermedad. En un ejemplo, el término “tratamiento” se refiere tanto al tratamiento terapéutico como a las medidas profilácticas o preventivas para la enfermedad renal, la anemia, la deficiencia de EPO, la deficiencia de transporte tubular o la deficiencia de filtración glomerular, en donde el objetivo es revertir, prevenir o ralentizar (disminuir) el trastorno objetivo. Los que necesitan tratamiento incluyen aquellos que ya tienen una enfermedad renal, anemia, deficiencia de EPO, deficiencia de transporte tubular o deficiencia de filtración glomerular, aquellos propensos a tener tales trastornos o aquellos en los que tales trastornos deben prevenirse. En un ejemplo, el tratamiento abarca la estabilización y/o la mejora de la función renal.

Una “cantidad eficaz” se refiere a al menos una cantidad eficaz, en las dosis y durante los períodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado terapéutico o profiláctico deseado. Se puede proporcionar una cantidad efectiva en una o más administraciones. En algunos ejemplos de la presente descripción, el término “cantidad eficaz” se usa para referirse a una cantidad necesaria para efectuar el tratamiento de un trastorno o afección renal tal como se ha descrito anteriormente. La cantidad eficaz puede variar según la enfermedad o afección por tratar y también según el peso, la edad, el origen racial, el sexo, la salud y/o el estado físico y otros factores relevantes para el mamífero que se esté tratando. Típicamente, la cantidad eficaz estará dentro de un rango relativamente amplio (por ejemplo, un rango de “dosificación”), que puede determinarse mediante ensayos y experimentos rutinarios por parte de un profesional médico. La cantidad eficaz se puede administrar en una sola dosis o en una dosis repetida una o varias veces durante un período de tratamiento.

Una “cantidad terapéuticamente eficaz” es al menos la concentración mínima requerida para lograr una mejora mensurable de un trastorno renal particular (por ejemplo, nefritis, carcinoma de células renales). Una cantidad terapéuticamente eficaz en la presente memoria también puede variar según factores, tales como la patología, la edad, el sexo y el peso del paciente, y la capacidad de la composición celular para provocar una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente eficaz también es aquella en la que los efectos terapéuticamente beneficiosos superan cualquier efecto tóxico o perjudicial de la composición. En el caso del carcinoma de células renales, una cantidad terapéuticamente eficaz puede reducir el número de células cancerosas; reducir el tamaño del tumor primario; inhibir (es decir, ralentizar hasta cierto punto y, en algunos ejemplos, detener) la infiltración de células cancerosas en los órganos periféricos; inhibir (es decir, ralentizar hasta cierto punto y, en algunos ejemplos, detener) la metástasis tumoral; inhibir o retrasar, en cierta medida, el crecimiento o la progresión del tumor; y/o aliviar en cierta medida uno o más de los síntomas asociados al carcinoma de células renales. Para la terapia del carcinoma de células renales, la eficacia *in vivo* puede medirse, por ejemplo, evaluando la duración de la supervivencia, el tiempo hasta la progresión de la enfermedad (TPE), las tasas de respuesta (TR), la duración de la respuesta y/o la calidad de vida.

Por células del “mesodermo intermedio (MI)” se entienden las células mesodérmicas embrionarias que surgen del mesodermo definitivo, que a su vez se deriva de la línea primitiva posterior y, en última instancia, pueden convertirse en el sistema urogenital, que incluye el uréter y el riñón y otros tejidos como las gónadas. Los ejemplos no limitativos de marcadores característicos o representativos del mesodermo intermedio incluyen PAX2, OSR1 y/o LHX1.

También se apreciará que la producción de células MI no implica que las células MI sean una población pura u homogénea de células MI sin que estén presentes otros tipos de células (tales como el mesodermo definitivo). En consecuencia, la referencia a “células MI” o a una “población de células MI” significa que las células o la población celular comprenden células MI. De manera adecuada, según la invención, las células MI se producen poniendo en contacto las células de la línea primitiva posterior con uno o más agentes que facilitan la diferenciación de las células de la línea primitiva posterior en células MI, como se describirá con más detalle más adelante. Preferiblemente, las células MI se producen poniendo en contacto las células de la línea primitiva posterior con uno o más agentes que facilitan la diferenciación de las células de la línea primitiva posterior en células MI.

Por células de “línea primitiva posterior (PPS)” se entienden células que se pueden obtener de, o células que se corresponden funcional y/o fenotípicamente con células del extremo posterior de una estructura de línea primitiva, que se forma en la blástula durante las primeras etapas del desarrollo embrionario de los mamíferos. La línea primitiva posterior establece una simetría bilateral, determina el sitio de la gastrulación e inicia la formación de la capa germinal. Por lo general, la línea primitiva posterior es la progenitora del mesodermo (es decir, el presunto mesodermo) y la línea primitiva anterior es la progenitora del endodermo (es decir, el presunto endodermo). Entre los ejemplos no limitativos de marcadores característicos o representativos de la línea primitiva posterior se incluyen Brachyury (T). Un ejemplo no limitativo de un marcador característico o representativo de la línea primitiva anterior es el SOX17. MIXL1 puede expresarse mediante la línea primitiva tanto posterior como anterior.

También se apreciará que la producción de células de la línea primitiva posterior no implica que las células de la línea primitiva posterior sean una población pura u homogénea de células de la línea primitiva posterior sin que estén presentes otros tipos de células. En consecuencia, la referencia a “células de la línea primitiva posterior” o a una “población de células de la línea primitiva posterior” significa que las células o la población celular comprenden células de la línea primitiva posterior. Las células de la línea primitiva posterior se producen poniendo en contacto las células hPSC con uno o más agentes, que facilitan la diferenciación de las células hPSC en células de la línea primitiva posterior, como se describirá con más detalle más adelante. Por ejemplo, los uno o más agentes pueden incluir la proteína morfogénica ósea 4 (BMP4), la activina A y/o un agonista de Wnt, tal como CHIR99021.

Organoide renal

La presente descripción abarca la producción de células del mesodermo intermedio (MI). El término “mesodermo intermedio (MI)” se usa en el contexto de la presente descripción para referirse a las células mesodérmicas embrionarias, que surgen del mesodermo definitivo, que a su vez se deriva de la línea primitiva posterior y, en última instancia, puede convertirse en el sistema urogenital, que incluye el uréter y el riñón y otros tejidos como la gónada. Los ejemplos no limitativos de marcadores característicos o representativos del mesodermo intermedio incluyen PAX2, OSR1 y/o LHX1.

En un ejemplo, se proporcionan condiciones de cultivo para permitir que estas células MI se “autoorganicen” y formen organoides renales. El término “organoide renal” se usa en el contexto de la presente descripción para referirse a una aglomeración 3D heterogénea de células que recapitula aspectos de la autoorganización celular, la arquitectura y las interacciones de señalización presentes en el riñón nativo. Los ejemplos de organoides renales se describen en Takasato y col. (2015) *Nature*, vol. 526: 564-568, el documento WO 2014/197934 y el documento WO 2016/094948. Los términos “organoide renal” y “organoide de riñón” se pueden usar indistintamente en el contexto de la presente descripción.

Los presentes inventores han identificado sorprendentemente organoides renales, que tienen una estructura tridimensional simplificada. Tales organoides son ventajosos en cuanto a que son más fáciles de visualizar y cultivar a largo plazo. Por ejemplo, un adulto sano tiene entre 0,8 y 2 millones de nefronas en cada riñón, normalmente alrededor de 1 millón. Por el contrario, un organoide abarcado por la presente descripción comprende números de nefronas mucho más bajos. En consecuencia, en un ejemplo, la presente descripción abarca un organoide renal, que comprende las características arquitectónicas de un riñón nativo con un número reducido de nefronas. En un ejemplo, un organoide renal abarcado por la presente descripción puede comprender una o más nefronas. En un ejemplo, las nefronas se segmentan en túbulos distales y proximales, en las primeras asas de Henle y en glomérulos. En otro ejemplo, los organoides comprenden nefronas segmentadas rodeadas de células endoteliales, células perivasculares e intersticio renal. En otro ejemplo, los organoides de la presente descripción no muestran la presencia de vasculatura.

En otros ejemplos, los organoides según la presente descripción están al menos parcialmente vascularizados. Por ejemplo, los organoides pueden comprender nefronas que contienen podocitos que elaboran procesos podocitarios y se someten a vascularización.

En un ejemplo, los organoides renales se caracterizan en términos de % de nefrona, % de estroma y/o % de vasculatura. En este ejemplo, los organoides renales se pueden caracterizar usando la secuenciación de ARN de una sola célula. A continuación se proporciona un ejemplo de secuenciación de células individuales. En un ejemplo, los organoides renales comprenden al menos un 20 % de nefrona madura. En otro ejemplo, los organoides renales comprenden al menos un 25 % de nefrona madura. En otro ejemplo, los organoides renales comprenden al menos un 30 % de nefrona madura. En otro ejemplo, los organoides renales comprenden al menos un 31 % de nefrona madura. En otro ejemplo, los organoides renales comprenden al menos un 32 % de nefrona madura. En estos ejemplos, los organoides renales también comprenden al menos un 15 % de estroma. En otro ejemplo, los organoides renales también comprenden al menos un 20 % de estroma. En otro ejemplo, los organoides renales también comprenden al menos un 25 % de estroma. En otro ejemplo, los organoides renales no comprenden ninguna vasculatura sustancial. En otro ejemplo, los organoides renales no comprenden la vasculatura.

En un ejemplo, los organoides renales según la presente descripción comprenden menos de 100 nefronas. En otro ejemplo, los organoides renales según la presente descripción comprenden menos de 90, menos de 80, menos de 70, menos de 60 nefronas. En otro ejemplo, los organoides renales según la presente descripción comprenden menos de 50 nefronas. En otro ejemplo, los organoides renales según la presente descripción comprenden menos de 40, menos de 30, menos de 20, menos de 10 nefronas. En otro ejemplo, los organoides renales según la presente descripción comprenden menos de 5 nefronas. En otro ejemplo, los organoides renales según la presente descripción comprenden menos de 4, menos de 3 nefronas.

En otro ejemplo, los organoides renales según la presente descripción comprenden entre 2 y 100 nefronas. En otro ejemplo, los organoides renales según la presente descripción comprenden entre 2 y 50 nefronas. En otro ejemplo, los organoides renales según la presente descripción comprenden entre 2 y 10 nefronas. En otro ejemplo, los organoides renales según la presente descripción comprenden entre 5 y 12 nefronas. En otro ejemplo, los organoides renales según la presente descripción comprenden entre 6 y 10 nefronas. En otro ejemplo, los organoides renales según la presente descripción comprenden entre 2 y 6 nefronas. En otro ejemplo, los organoides renales según la presente descripción comprenden entre 2 y 4 nefronas.

Las “nefronas” son las unidades funcionales del riñón, que desempeñan un papel importante en la eliminación de los productos de desecho de la sangre/plasma y en el mantenimiento del volumen de fluidos corporales. Los expertos en la técnica pueden identificarlas y contarlas en los organoides descritos en la presente memoria usando varios métodos. Por ejemplo, las nefronas pueden visualizarse y contarse mediante microscopía confocal y marcaje de inmunofluorescencia (por ejemplo, glomérulo WT1+; podocitos NPHS+, túbulo proximal LTL+ECAD-, túbulo distal ECAD+ y conducto colector ECAD+GATA3+).

En general, la identidad de especie de los organoides renales abarcada en la presente descripción, ya sean mamíferos, tales como ratones, humanos o de otro tipo, viene dictada por las células utilizadas para generar el organoide renal. En un ejemplo, la presente descripción abarca los organoides renales de mamíferos. En este ejemplo, se usan células madre pluripotentes de mamíferos para generar el organoide renal. Los organoides renales de mamíferos pueden ser representativos del riñón de un animal de compañía, tal como un canino o un felino, o de un animal de ganado, tal como un equino o un bovino. Por lo tanto, en estos ejemplos, se usan células madre de caninos, felinos, etc. para generar el organoide renal. En otro ejemplo, los organoides renales de mamíferos son representativos del riñón de ratón o rata. En otro ejemplo, los organoides renales son representativos del riñón de primates de orden superior, tales como el mono cynomolgus o el mono rhesus. En otro ejemplo, los organoides del riñón de los mamíferos son representativos del riñón de los seres humanos. Cuando se usan células madre pluripotentes de una especie particular para generar un organoide renal, el organoide renal resultante puede identificarse basándose en esa especie. Por ejemplo, cuando se usan células madre humanas para generar un organoide renal, el organoide renal resultante puede identificarse como un organoide renal humano. Por lo tanto, en un ejemplo, los organoides renales abarcados en la presente descripción incluyen organoides renales humanos obtenidos de células madre humanas. Más adelante se analizan otros ejemplos de células madre que son adecuadas para generar organoides renales.

En otro ejemplo, los organoides renales se pueden caracterizar basándose en la expresión de marcadores moleculares. La expresión del marcador se puede caracterizar usando diversas técnicas, tales como la inmunohistoquímica o la clasificación de células activadas por fluorescencia. La inmunohistoquímica generalmente implica el uso de un anticuerpo primario específico para el marcador de interés. La unión del anticuerpo primario a un marcador se puede visualizar mediante varios métodos conocidos. Por ejemplo, se puede usar un anticuerpo secundario marcado que reconozca el anticuerpo primario. En este ejemplo, la etiqueta podría ser una enzima tal como la peroxidasa de rábano picante, un isótopo radiactivo, un indicador fluorescente, una etiqueta electroquimioluminiscente. La unión del anticuerpo secundario marcado al anticuerpo primario se puede detectar mediante una evaluación citológica o mediante un lector de placas automático.

En un ejemplo particular, un organoide renal o una sección o muestra del mismo se pone en contacto con un anticuerpo primario específico. A continuación, el organoide renal o la sección o muestra del mismo se lava para eliminar cualquier anticuerpo primario no unido y, a continuación, se aplica a la muestra un anticuerpo secundario específico para el anticuerpo primario y unido a una enzima peroxidasa. A continuación, el organoide renal o la sección o muestra del mismo se lava para eliminar cualquier anticuerpo secundario no unido y se aplica 3,3'-diaminobencidina (DAB) a la

muestra. La conversión del DAB en un producto coloreado se visualiza mediante una evaluación citológica rutinaria con la presencia de un producto coloreado que indica que el marcador está presente en la muestra. En un ejemplo, el nivel de producto coloreado puede cuantificarse usando Image J u otros paquetes de software que están disponibles en el mercado de proveedores, tales como Perkin Elmer y Leica.

En otro ejemplo, una suspensión celular se produce a partir de un organoide renal representativo, una población del mismo o una sección o muestra del mismo. Las células en suspensión se ponen en contacto con un anticuerpo marcado con fluorescencia, que es específico para un marcador en particular. Las células positivas para un marcador particular se identifican usando técnicas, tales como la clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS).

Una célula que se denomina "positiva" para un marcador determinado puede expresar un nivel bajo (bajo o tenue) o alto (brillante, bri) de ese marcador, dependiendo del grado en que el marcador esté presente en la superficie celular, donde los términos se refieren a la intensidad de la fluorescencia u otro marcador utilizado en el proceso de clasificación de las células. La distinción entre bajo (o tenue u opaco) y bri se entenderá en el contexto del marcador usado en una población celular particular que se esté clasificando. Una célula que se denomina "negativa" para un marcador dado no está necesariamente completamente ausente en esa célula. Este término significa que el marcador se expresa a un nivel relativamente bajo o muy bajo por esa célula o población, y que genera una señal muy baja cuando se marca de forma detectable o es indetectable por encima de los niveles de fondo, por ejemplo, los niveles detectados usando un anticuerpo de control de isotipo.

En un ejemplo, los marcadores de los organoides renales descritos en la presente memoria pueden detectarse usando un gen indicador fluorescente. Por ejemplo, la expresión de marcadores particulares puede monitorizarse para rastrear el desarrollo de organoides renales o células que los comprenden en tiempo real. Por ejemplo, las células madre pueden modificarse genéticamente para expresar uno o más indicadores fluorescentes o quimioluminiscentes en un conjunto dado de condiciones. Los indicadores se pueden usar para rastrear la identidad celular, la viabilidad celular o la función celular en tiempo real.

A continuación, se ilustra un ejemplo de un gen indicador adecuado, donde se genera una línea iPSC de entrada, que alberga el gen indicador fluorescente mTAGBFP2 insertado en el codón de inicio del locus MAFB endógeno (MAFB^{mTagBFP2/+}). MAFB se expresa en gran medida en los podocitos en desarrollo y, por lo tanto, su expresión de MAFB se puede monitorizar para rastrear el desarrollo de los podocitos en los organoides renales en tiempo real. Entre otros ejemplos de líneas celulares indicadoras adecuadas para su uso en los métodos descritos en la presente memoria se incluyen GATA3mCherry, RETtdTOMATO o Six2Cre.

En otro ejemplo, los organoides renales comprenden células que expresan niveles altos de uno o más marcadores de nefrona. En otro ejemplo, los organoides renales comprenden células que expresan niveles altos de uno o más de PAX2, SIX1, LHX1, OSR1, WNT11, GATA3, PAX8, EYA1 y CITED1. Por ejemplo, los organoides renales pueden expresar niveles altos de PAX2. En otro ejemplo, los organoides renales pueden expresar niveles altos de SIX1. En otro ejemplo, los organoides renales pueden expresar niveles altos de LHX1. En otro ejemplo, los organoides renales pueden expresar niveles altos de OSR1. En otro ejemplo, los organoides renales pueden expresar niveles altos de WNT11. En otro ejemplo, los organoides renales pueden expresar niveles altos de GATA3. En otro ejemplo, los organoides renales comprenden células que expresan niveles altos de PAX2, SIX1, LHX1, OSR1, WNT11 y GATA3. En otro ejemplo, los organoides renales comprenden células que expresan niveles altos de PAX2, SIX1, LHX1, OSR1, WNT11, GATA3, PAX8, EYA1 y CITED1. En estos ejemplos, los organoides renales pueden expresar niveles altos de un marcador de referencia, tal como uno o más de PAX2, SIX1, LHX1, OSR1, WNT11, GATA3, PAX8, EYA1 y CITED1, en relación con un organoide renal con al menos 100 nefronas. En otro ejemplo, los organoides renales pueden expresar niveles altos de un marcador de referencia, tal como uno o más de PAX2, SIX1, LHX1, OSR1, WNT11, GATA3, PAX8, EYA1 y CITED1, en relación con un organoide renal con más de 50 nefronas. En otro ejemplo, los organoides renales pueden expresar niveles altos de un marcador de referencia, tal como uno o más de PAX2, SIX1, LHX1, OSR1, WNT11 y GATA3, en relación con los organoides renales que comprenden al menos 1×10^5 células. En otro ejemplo, los organoides renales pueden expresar niveles altos de un marcador de referencia, tal como uno o más de PAX2, SIX1, LHX1, OSR1, WNT11 y GATA3, en relación con los organoides renales producidos sin generación de vórtice, tales como los descritos en Takasato y col. (2015).

En otro ejemplo, los organoides renales comprenden células que expresan niveles bajos de WT1. En otro ejemplo, los organoides renales comprenden células que expresan niveles bajos de C-RET. En otro ejemplo, los organoides renales comprenden células que expresan niveles bajos de FOXD1. En otro ejemplo, los organoides renales comprenden células que expresan niveles bajos de PDGFRA. En otro ejemplo, los organoides renales comprenden células que expresan niveles bajos de MEIS2. En otro ejemplo, los organoides renales comprenden células que expresan niveles bajos de WT1 y C-RET. En otro ejemplo, los organoides renales comprenden células que expresan niveles bajos de WT1, C-RET y FOXD1. En estos ejemplos, los organoides renales pueden expresar niveles bajos de un marcador de referencia, tal como uno o más de WT1, C-RET y FOXD1, en relación con un organoide renal con al menos 100 nefronas. En otro ejemplo, los organoides renales pueden expresar niveles bajos de un marcador de referencia, tal como uno o más de WT1, C-RET y FOXD1, en relación con un organoide renal con más de 50 nefronas.

En otro ejemplo, los organoides renales comprenden células que expresan niveles altos de PAX2, SIX1, LHX1, OSR1, WNT11 y GATA3 y niveles bajos de WT1, C-RET, PDGFRA, MEIS2 y FOXD1. En otro ejemplo, los organoides renales comprenden células que expresan niveles altos de PAX2, SIX1, LHX1, OSR1, WNT11, GATA3, PAX8, EYA1 y CITED1 y niveles bajos de WT1, C-RET, PDGFRA, MEIS2 y FOXD1.

En los ejemplos anteriores, los niveles de expresión altos y bajos son relativos a los organoides renales cultivados sin generación de vórtice, como los descritos en Takasato y col. (2015) *Nature*, vol. 526: 564-568. En este ejemplo, la expresión alta es al menos 1 vez mayor. En otro ejemplo, la expresión alta es al menos 1,5 veces mayor. En otro ejemplo, la expresión alta es al menos 2 veces mayor. En un ejemplo, la expresión baja es al menos 1 vez menor. En otro ejemplo, la expresión baja es al menos 1,5 veces menor. En otro ejemplo, la expresión baja es al menos 2 veces menor.

Los niveles de expresión se pueden medir usando técnicas, tales como la reacción en cadena de la polimerasa que comprende cebadores apropiados para los marcadores de interés. Por ejemplo, el ARN total se puede extraer de los organoides antes de transcribirlo de forma inversa y someterlo a PCR y análisis.

En un ejemplo, los organoides renales comprenden nefronas, que comprenden uno o más glomérulos WT1+, podocitos NPHS+, túbulo proximal LTL+ECAD-, túbulo distal ECAD+ y conducto colector ECAD+GATA3+. En otro ejemplo, los organoides renales comprenden nefronas, que comprenden podocitos NPHS+, segmentos proximales LTL+, segmentos distales ECAD+ y conducto colector ECAD+GATA3+. Los organoides renales que comprenden los componentes ilustrados anteriormente se pueden identificar de diversos modos. En un ejemplo, los organoides renales pueden fijarse y montarse por completo antes de evaluarse visualmente mediante microscopía confocal y marcaje de inmunofluorescencia.

En un ejemplo, los organoides renales se pueden caracterizar basándose en uno o más de los marcadores anteriormente mencionados después de su uso en un método de selección que se analiza a continuación. En otro ejemplo, los organoides renales representativos de una población más amplia pueden caracterizarse basándose en uno o más de los marcadores anteriormente mencionados, antes de seleccionar los organoides renales que expresan los marcadores apropiados para su uso en un método de selección que se analiza a continuación. Por ejemplo, se puede producir una población de organoides renales usando los métodos descritos en la presente memoria. La expresión de uno o más de los marcadores anteriores puede confirmarse en los organoides renales de la población antes de seleccionar los organoides renales para su uso en un método de selección que se analiza a continuación.

En otro ejemplo, los organoides según la presente descripción comprenden entre $0,5 \times 10^4$ y 8×10^4 células. En otro ejemplo, los organoides renales comprenden entre $0,8 \times 10^4$ y 7×10^4 células. En otro ejemplo, los organoides según la presente descripción comprenden entre 1×10^4 y 5×10^4 células. En otro ejemplo, los organoides según la presente descripción comprenden al menos 1×10^4 células. En otro ejemplo, los organoides según la presente descripción comprenden menos de 3×10^4 células. En otro ejemplo, los organoides según la presente descripción comprenden de 2×10^4 a $2,5 \times 10^4$ células.

En otro ejemplo, los organoides según la presente descripción tienen un diámetro inferior a 2500 μm . En otro ejemplo, los organoides según la presente descripción tienen un diámetro inferior a 2000 μm . En otro ejemplo, los organoides según la presente descripción tienen un diámetro inferior a 1000 μm . En otro ejemplo, los organoides según la presente descripción tienen un diámetro inferior a 500 μm . En otro ejemplo, los organoides según la presente descripción tienen un diámetro inferior a 400 μm . En otro ejemplo, los organoides según la presente descripción tienen un diámetro inferior a 300 μm . En otro ejemplo, los organoides según la presente descripción tienen un diámetro de 150 a 600 μm . En otro ejemplo, los organoides según la presente descripción tienen un diámetro de 200 a 500 μm . Por ejemplo, los organoides según la presente descripción pueden tener un diámetro de entre 200 μm y 2000 μm . En otro ejemplo, los organoides según la presente descripción pueden tener un diámetro de entre 200 μm y 1000 μm . En otro ejemplo, los organoides según la presente descripción pueden tener un diámetro de entre 200 μm y 400 μm . En otro ejemplo, los organoides según la presente descripción pueden tener un diámetro de entre 200 μm y 300 μm . En otro ejemplo, los organoides según la presente descripción pueden tener un diámetro de entre 250 μm y 300 μm .

El experto en la técnica apreciará que el tamaño de los organoides se puede medir, por ejemplo, mediante microscopía óptica y el *software* adjunto, tal como ImageJ. Por ejemplo, un experto en la técnica puede identificar organoides de un tamaño superior al ilustrado midiendo la anchura en el punto más ancho de su estructura tridimensional.

En otro ejemplo, los organoides según la presente descripción permanecen viables en cultivo durante al menos tres semanas. En otro ejemplo, los organoides según la presente descripción permanecen viables en cultivo durante al menos cuatro semanas. En otro ejemplo, los organoides según la presente descripción permanecen viables en cultivo durante al menos seis semanas. En otro ejemplo, los organoides según la presente descripción permanecen viables en cultivo durante al menos tres a cuatro semanas. Por ejemplo, los organoides renales descritos en la presente memoria solo pueden desarrollar limitaciones de difusión (es decir, limitaciones que afectan a la transferencia de nutrientes a las células que comprenden la estructura organoide) después de tres a seis semanas en cultivo. En estos ejemplos, el período de tiempo al que se hace referencia se mide desde D7+1. En consecuencia, dicho de otro modo,

los organoides según la presente descripción permanecen viables en cultivo hasta al menos D7+21, D7+28 o D7+42. En un ejemplo, las tasas de proliferación celular se pueden usar como una medida de limitación de la difusión. Esto se debe a que las células no suelen seguir dividiéndose en ausencia de nutrientes suficientes. En consecuencia, la proliferación celular en los organoides descritos en la presente memoria puede rastrearse a lo largo del tiempo para determinar cuándo se producen limitaciones de difusión. En un ejemplo, una reducción en la tasa de proliferación celular durante un período de 3 a 6 días indica limitaciones de difusión. En otro ejemplo, una meseta en la proliferación celular durante un período de 3 a 6 días indica limitaciones de difusión.

La presente descripción abarca un organoide renal que comprende un pequeño número de nefronas en comparación con el riñón humano. Los expertos en la técnica apreciarán que los organoides renales son productos artificiales y, si bien comparten una serie de características fisiológicas y bioquímicas de los riñones de los mamíferos, no se producen de forma natural. Por ejemplo, los organoides renales descritos en la presente memoria pueden no estar conectados a la vasculatura intacta y/o a una o más de las siguientes características:

- tienen menos de 50 nefronas;
- incluyen aproximadamente de $0,5 \times 10^4$ a 8×10^4 células;
- tienen un diámetro inferior a $1000 \mu\text{m}$ (preferiblemente, de aproximadamente 250 a $350 \mu\text{m}$);
- son estructuras tridimensionales independientes que no forman parte de un tejido u órgano; y,
- se producen mediante un método que involucra la diferenciación de células madre *in vitro*.

Composiciones celulares y método de tratamiento

Los organoides o células de la presente descripción pueden usarse para producir composiciones terapéuticas. En un ejemplo, los organoides completos descritos en la presente memoria pueden proporcionarse como una composición terapéutica. En otro ejemplo, la presente descripción abarca una composición celular producida a partir de un organoide renal descrito en la presente memoria. Por ejemplo, una composición celular se prepara digiriendo enzimáticamente un organoide según la presente descripción. Por ejemplo, una composición celular se puede preparar digiriendo un organoide definido en la presente memoria usando una proteasa, tal como la tripsina sola o en combinación con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). En otro ejemplo, se puede preparar una composición celular digiriendo un organoide definido en la presente memoria con una colagenasa, tal como la colagenasa I y/o la colagenasa II (por ejemplo, Liberase™ (Roche) disponible en el mercado). En un ejemplo, la digestión enzimática se purifica parcialmente o se purifica para agotar uno o más tipos de células. Por ejemplo, las células vasculares y/o endoteliales pueden agotarse. En otro ejemplo, la digestión enzimática se purifica parcialmente o se purifica para enriquecer uno o más tipos de células. Por ejemplo, la digestión enzimática puede purificarse parcialmente o purificarse para proporcionar una composición enriquecida de células progenitoras de nefronas y/o progenitoras del epitelio ureteral.

En otro ejemplo, las composiciones abarcadas en la presente descripción comprenden células cultivadas usando un método descrito en la presente memoria. Por ejemplo, las composiciones pueden comprender células MI mejoradas que expresan niveles altos de PAX2, LHX1 y OSR1 (mesénquima superior) y Wnt11 y GATA3 (epitelio ureteral). Como en el ejemplo anterior, las células MI pueden cultivarse usando un método definido en la presente memoria y purificarse parcialmente o purificarse para enriquecer uno o más tipos de células, tales como las progenitoras de nefronas y/o las progenitoras epiteliales ureterales.

En consecuencia, en otro ejemplo, la presente descripción abarca una composición celular que comprende una población de células progenitoras de nefrona y/o células progenitoras del epitelio ureteral purificadas a partir de una población de células u organoides producida mediante un método definido en la presente memoria.

En un ejemplo, las composiciones terapéuticas descritas en la presente memoria comprenden un vehículo y/o excipiente farmacéuticamente aceptable. Los términos “vehículo” y “excipiente” se refieren a composiciones de materia que se usan convencionalmente en la técnica para facilitar el almacenamiento, la administración y/o la actividad biológica de un compuesto activo (véase, por ejemplo, *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 16ª edición, Mac Publishing Company (1980)). Un vehículo también puede reducir cualquier efecto secundario indeseable del compuesto activo. Un vehículo adecuado es, por ejemplo, estable, por ejemplo, incapaz de reaccionar con otros ingredientes de la composición. En un ejemplo, el vehículo no produce un efecto adverso local o sistémico significativo en los receptores a las dosis y concentraciones empleadas para el tratamiento.

Entre los vehículos adecuados para la presente descripción se incluyen los usados convencionalmente, por ejemplo, solución salina, dextrosa acuosa, lactosa, solución de Ringer, una solución tamponada, el hialuronano y los glicoles son ejemplos de vehículos líquidos, particularmente, (cuando son isotónicos) para soluciones. Entre los vehículos y excipientes farmacéuticos adecuados se incluyen almidón, celulosa, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz,

harina, tiza, gel de sílice, estearato de magnesio, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, cloruro de sodio, glicerol, propilenglicol, agua, etanol y similares.

5 En otro ejemplo, un vehículo es una composición de medio, por ejemplo, en la que se cultiva o suspende una célula o un organoide completo. Por ejemplo, dicha composición de medio no induce ningún efecto adverso en un sujeto al que se administra. En un ejemplo, el medio de cultivo celular puede comprender un medio basal descrito en la presente memoria. En un ejemplo, el medio basal puede comprender PVA y MC. Por ejemplo, el medio basal puede comprender del 0,05 al 0,5 % de PVA y del 0,05 al 0,5 % de MC.

10 En un ejemplo, el vehículo o excipiente proporciona una actividad amortiguadora para mantener las células a un pH adecuado para ejercer así una actividad biológica, por ejemplo, el vehículo o excipiente es solución salina tamponada con fosfato (PBS). El PBS representa un vehículo o excipiente atractivo porque interactúa mínimamente con las células y los factores y permite la liberación rápida de las células y los factores, en tal caso, la composición de la descripción puede producirse como un líquido para su aplicación directa al torrente sanguíneo o a un riñón o una región que rodea
15 o es adyacente a un riñón, por ejemplo, mediante inyección. En consecuencia, en un ejemplo, las composiciones celulares u organoides completos descritos en la presente memoria se proporcionan en solución salina tamponada con fosfato (PBS).

20 En otro ejemplo, las composiciones celulares o los organoides completos se pueden incorporar o incrustar dentro de estructuras que son compatibles con el receptor y que se degradan en productos que no son dañinos para el receptor. Estas estructuras proporcionan soporte y protección a las células que se van a trasplantar a los sujetos receptores. Las estructuras biodegradables naturales y/o sintéticas son ejemplos de dichas estructuras. Se puede usar con éxito una variedad de estructuras diferentes en la práctica de la descripción. Entre las estructuras ilustrativas se incluyen, aunque no de forma limitativa, estructuras biológicas degradables. Entre las estructuras biodegradables naturales se
25 incluyen estructuras de colágeno, fibronectina y laminina. El material sintético adecuado para una estructura biológica de trasplante celular debería ser capaz de soportar un crecimiento celular y una función celular extensos. Dichas estructuras también pueden ser reabsorbibles. Entre las estructuras adecuadas se incluyen estructuras de ácido poliláctico, por ejemplo, como las descritas por Vacanti, y col. J. Ped. Surg. 23: 3-9 1988; Cima y col. Biotechnol. Bioeng. 38:145 1991; Vacanti y col. Plast. Reconstr. Surg. 88: 753-9 1991; o polímeros sintéticos, tales como polianhídridos, poliortoésteres y ácido poliláctico. En otro ejemplo, las células se pueden administrar en una estructura de gel (tal como Gelfoam de Upjohn Company). En otro ejemplo, las células pueden administrarse en una estructura renal descelularizada. En un ejemplo, las células pueden administrarse en un riñón humano descelularizado o en un componente de la matriz extracelular (MEC) del mismo.

35 En un ejemplo, la composición comprende una cantidad eficaz o una cantidad terapéuticamente eficaz de células u organoides completos. En otro ejemplo, las células u organoides completos están contenidos dentro de una cámara que no permite que las células u organoides salgan a la circulación de un sujeto, pero que permite que los factores secretados por las células u organoides entren en la circulación. De este modo, los factores solubles pueden administrarse a un sujeto permitiendo que las células u organoides secreten los factores a la circulación del sujeto. tal
40 cámara puede implantarse igualmente en un sitio de un sujeto para aumentar los niveles locales de los factores solubles, por ejemplo, implantarse en el riñón o cerca de este.

En un ejemplo, las composiciones descritas en la presente memoria pueden administrarse sistémicamente, tal como, por ejemplo, mediante administración intravenosa, intraarterial o intraperitoneal. En un ejemplo, las composiciones
45 descritas en la presente memoria se administran por vía intravenosa. En otro ejemplo, las composiciones se administran por vía intraarterial. En otro ejemplo, las composiciones se administran mediante inyección en la arteria renal, inyección en el parénquima renal o trasplante subcapsular en riñones normales o enfermos. En otro ejemplo, se implantan composiciones. Por ejemplo, los organoides completos se pueden implantar muy cerca del riñón de un sujeto.

50 En un ejemplo, una composición celular según la presente descripción puede crioconservarse. La crioconservación de células u organoides completos se puede llevar a cabo usando métodos de enfriamiento a baja velocidad o protocolos de congelación "rápida" conocidos en la técnica. Preferiblemente, el método de crioconservación mantiene fenotipos, marcadores de superficie celular y tasas de crecimiento similares de las células crioconservadas u
55 organoides completos en comparación con las células no congeladas u organoides completos. La composición crioconservada puede comprender una solución de crioconservación. El pH de la solución de crioconservación es normalmente de 6,5 a 8, preferiblemente de 7,4.

60 Los ejemplos de soluciones de crioconservación comprenden soluciones isotónicas no pirógenas tales como, por ejemplo, PlasmaLyte A®. 100 ml de PlasmaLyte A® contienen 526 mg de cloruro de sodio, USP (NaCl); 502 mg de gluconato de sodio ($C_6H_{11}NaO_7$); 368 mg de acetato de sodio trihidratado, USP ($C_2H_3NaO_2 \cdot 3H_2O$); 37 mg de cloruro de potasio, USP (KCl); y 30 mg de cloruro de magnesio, USP ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$). No contiene agentes antimicrobianos.

65 En un ejemplo, la presente descripción abarca un método de terapia celular, donde el método comprende administrar una composición descrita en la presente memoria a un sujeto que lo necesite. Por ejemplo, la presente descripción abarca un método para tratar la enfermedad renal mediante la administración de una composición descrita en la

presente memoria a un sujeto que lo necesite. El término “enfermedad renal” se usa en el contexto de la presente descripción para referirse a trastornos asociados a cualquier estadio o grado de insuficiencia renal aguda o crónica que dé como resultado una pérdida de la capacidad del riñón para realizar la función de filtración de la sangre y eliminar el exceso de líquido, electrolitos y desechos de la sangre. Algunos ejemplos de enfermedad renal son las disfunciones endocrinas, tales como la anemia (deficiencia de eritropoyetina) y el desequilibrio mineral (deficiencia de vitamina D). La enfermedad renal también puede originarse en el riñón o puede ser secundaria a una variedad de afecciones, que incluyen (pero no se limitan a) insuficiencia cardíaca, hipertensión, diabetes, enfermedad autoinmune o enfermedad hepática o toxicidad inducida por fármacos. En un ejemplo, la enfermedad renal puede ser una afección de insuficiencia renal crónica que se desarrolla después de una lesión aguda del riñón. Por ejemplo, la lesión renal por isquemia y/o exposición a sustancias tóxicas puede provocar insuficiencia renal aguda; la recuperación incompleta después de una lesión renal aguda puede provocar el desarrollo de insuficiencia renal crónica. Otros ejemplos de enfermedad renal incluyen el síndrome nefrótico congénito (SNC), que incluye el síndrome nefrótico resistente a los esteroides y la nefropatía finlandesa, la glomerulonefritis segmentaria focal (FEGS), el síndrome de Alport y el síndrome de Pierson.

En un ejemplo, la presente descripción abarca un método para tratar la enfermedad renal mediante la implantación de un organoide completo descrito en la presente memoria en un sujeto que lo necesite. En otro ejemplo, la presente descripción abarca un método para tratar la enfermedad renal mediante la administración de una composición celular descrita en la presente memoria a un sujeto que lo necesite.

En otros ejemplos, las composiciones o células descritas en la presente memoria pueden proporcionarse para la recelularización de una estructura renal descelularizada. En otro ejemplo, la presente descripción abarca un biomaterial o estructura, que comprende la composición o las células descritas en la presente memoria.

Células madre

Los aspectos de la presente descripción abarcan el cultivo de células madre. El término “célula madre” se usa en el contexto de la presente descripción para referirse a un subconjunto de progenitores que tienen la capacidad o el potencial, en circunstancias particulares, de diferenciarse en un fenotipo más especializado o diferenciado, y que conservan la capacidad, en determinadas circunstancias, de proliferar sin diferenciarse sustancialmente. En un ejemplo, el término célula madre se refiere generalmente a una célula madre de origen natural, cuyos descendientes (progenie) se especializan, a menudo en diferentes direcciones, por diferenciación, por ejemplo, adquiriendo caracteres completamente individuales, como ocurre en la diversificación progresiva de células y tejidos embrionarios. La diferenciación celular es un proceso complejo que normalmente ocurre a través de muchas divisiones celulares. Una célula diferenciada puede derivar de una célula multipotente que a su vez se deriva de una célula multipotente, y así sucesivamente. Si bien cada una de estas células multipotentes puede considerarse células madre, la gama de tipos de células a los que puede dar lugar cada una puede variar considerablemente. Algunas células diferenciadas también tienen la capacidad de dar lugar a células de mayor potencial de desarrollo. Dicha capacidad puede ser natural o puede inducirse artificialmente tras el tratamiento con diversos factores. En muchos casos biológicos, las células madre también son “multipotentes”, porque pueden producir progenie de más de un tipo de célula distinto, pero esto no es necesario para su “condición de célula madre”. La autorrenovación es la otra parte clásica de la definición de células madre. En teoría, la autorrenovación puede ocurrir por cualquiera de los dos mecanismos principales. Las células madre pueden dividirse asimétricamente, con una hija que conserva el estado madre y la otra hija que expresa alguna otra función y fenotipo específicos distintos. Alternativamente, algunas de las células madre de una población pueden dividirse simétricamente en dos descendientes, de modo que se mantienen algunas células madre en la población en su conjunto, mientras que otras células de la población solo dan lugar a una progenie diferenciada.

En un ejemplo, las células son células madre humanas. En un ejemplo, las células madre son una población de células madre humanas expandida en cultivo. En un ejemplo, las células madre pueden expandirse en cultivo *in vitro* o *ex-vivo*. En un ejemplo, las células madre expandidas en cultivo se han sometido a pasajes al menos una, dos veces, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, 10 veces.

En un ejemplo, las células madre son células madre pluripotentes. En otro ejemplo, las células madre son células madre embrionarias humanas. En general, las células madre pluripotentes muestran la expresión de OCT4, NANOG y SSEA1 cuando están en un estado pluripotente y la expresión de estos marcadores generalmente se pierde con la diferenciación. En otro ejemplo, las células madre son células madre embrionarias humanas. Los términos “célula madre embrionaria humana” y sus abreviaturas, tales como “hES” y “hESC”, se refieren a células derivadas, obtenibles o que se originan a partir de embriones o blastocistos humanos, que se autorrenuevan y son pluri- o totipotentes, y tienen la capacidad de producir todos los tipos de células presentes en un animal maduro. Las células madre embrionarias humanas (hESC) pueden aislarse, por ejemplo, de blastocistos humanos obtenidos de embriones humanos preimplantacionales *in-vivo*, embriones fertilizados *in vitro* o embriones humanos unicelulares expandidos hasta la fase de blastocisto.

En otro ejemplo, las células madre son células madre pluripotentes inducidas. Por ejemplo, las células madre pueden ser células madre pluripotentes inducidas por humanos. El término “célula madre pluripotente inducida” y su abreviatura “iPSC” se refieren a células derivables, obtenibles o que se originan a partir de células somáticas adultas humanas de cualquier tipo reprogramadas a un estado pluripotente mediante la expresión de genes exógenos, tales

como factores de transcripción, incluida una combinación preferida de OCT4, SOX2, KLF4 y c-MYC. Las iPSC humanas muestran niveles de pluripotencia equivalentes a los de las hESC, pero pueden obtenerse de un paciente para una terapia autóloga con o sin corrección génica simultánea antes de la diferenciación y la administración celular. Los procesos adecuados para la generación de células madre pluripotentes inducidas se describen, por ejemplo, en los documentos US 7.615.374 y US 2014273211, Barberi y col.; *Plos medicine*, vol 2(6): 0554-0559 (2005), y Vodyanik y col. *Cell Stem cell*, vol 7: 718-728 (2010). En un ejemplo, las iPSC se obtienen de fibroblastos. En otro ejemplo, las iPSC se obtienen de la sangre. Por ejemplo, las iPSC pueden obtenerse de glóbulos blancos. En otro ejemplo, las iPSC se obtienen de fibroblastos. En otro ejemplo, las iPSC se obtienen de glóbulos blancos o fibroblastos.

En un ejemplo, las células madre son H9 o hES3. En consecuencia, en un ejemplo, la presente descripción abarca un organoide renal descrito en la presente memoria, en donde el organoide renal se obtiene de células madre H9. En otro ejemplo, la presente descripción abarca un organoide renal descrito en la presente memoria, en donde el organoide renal se obtiene de células madre hES3 (Kao y col., 2016; Ng y col., 2016; van den Berg y col., 2018). Por ejemplo, los organoides renales pueden obtenerse de *hES3-SOX17mCherry* o *H9 GAPTrapLuc2*. En consecuencia, en un ejemplo, la presente descripción abarca un organoide renal que comprende menos de 50 nefronas, en donde el organoide renal se obtiene de células madre H9 o hES3. En otro ejemplo, el organoide renal comprende menos de 15 nefronas y se obtiene de células madre H9 o hES3. En estos ejemplos, las células madre pueden expresar un gen indicador.

En otro ejemplo, las células madre son iPSC GAPTrap td-Tomato, CRL1502.C32 o CLR1502.3 (Briggs y col., 2013; Takasato y col., 2015). En consecuencia, en un ejemplo, la presente descripción abarca los organoides renales definidos en la presente memoria, en donde los organoides renales se obtienen de iPSC GAPTrap td-Tomato. En consecuencia, en un ejemplo, la presente descripción abarca un organoide renal que comprende menos de 50 nefronas, en donde el organoide renal se obtiene de iPSC GAPTrap td-Tomato, CRL1502.C32 o CLR1502.3. En otro ejemplo, el organoide renal comprende menos de 15 nefronas y se obtiene de iPSC GAPTrap td-Tomato, CRL1502.C32 o CLR1502.3. De nuevo, en estos ejemplos, las células madre pueden expresar un gen indicador.

En un ejemplo, puede ser deseable producir un organoide renal que sea representativo de un sujeto y/o enfermedad en particular. A continuación se describen varios ejemplos de esta realización. En esta sección son relevantes las células iPS que pueden usarse para producir el organoide renal. En un ejemplo, las células iPS humanas se obtienen de un sujeto humano con una enfermedad renal genética. En este ejemplo, se puede aislar una muestra de sangre del sujeto con una enfermedad renal genética y se pueden inducir células iPS a partir de células de la muestra de sangre (por ejemplo, glóbulos blancos). El sujeto puede tener una de las diversas enfermedades renales genéticas ilustrativas. Entre los ejemplos se incluyen el síndrome nefrótico congénito (SNC), que incluye el síndrome nefrótico resistente a los esteroides y la nefropatía finlandesa, la glomerulonefritis segmentaria focal (FEGS), el síndrome de Alport y el síndrome de Pierson. En consecuencia, en un ejemplo, la presente descripción abarca los organoides renales que son representativos de una enfermedad renal seleccionada del grupo que consiste en el síndrome nefrótico congénito (SNC), incluido el síndrome nefrótico resistente a los esteroides y la nefropatía finlandesa, la glomerulonefritis segmentaria focal (FEGS), el síndrome de Alport y el síndrome de Pierson. En consecuencia, en un ejemplo, los organoides renales son representativos del SNC. En otro ejemplo, los organoides renales son representativos del síndrome nefrótico resistente a los esteroides.

En un ejemplo, los organoides renales se pueden usar para modelar el riñón y/o la enfermedad renal en desarrollo. En consecuencia, en un ejemplo, la presente descripción abarca un organoide renal descrito en la presente memoria, en donde el organoide renal se usa para modelar el desarrollo renal. En otro ejemplo, la presente descripción abarca un organoide renal descrito en la presente memoria, en donde el organoide renal se usa para modelar la enfermedad renal. En un ejemplo, la enfermedad renal es el SNC u otra de las enfermedades mencionadas anteriormente. En este ejemplo, la enfermedad se puede modelar induciendo células iPS de sujetos con una enfermedad renal mencionada anteriormente y produciendo organoides renales a partir de las mismas. En este ejemplo, se puede emplear la edición génica (por ejemplo, la edición génica CRISPR/Cas9) para introducir mutaciones en los genes de las células iPS obtenidas del sujeto que son relevantes o potencialmente relevantes para el desarrollo de la enfermedad renal. En otros ejemplos, la edición génica se emplea para corregir mutaciones en las células iPS derivadas del sujeto. En un ejemplo, se pueden generar células iPS editadas genéticamente isogénicas (por ejemplo, Forbes y col. (2018) *Am J Hum Genet.* 102: 816-831). El desarrollo y la enfermedad renal se pueden modelar a lo largo del tiempo (por ejemplo, 2, 5, 10 o más días) utilizando organoides renales en varias etapas del desarrollo, tales como una o más de las que se analizan a continuación (por ejemplo, d7+15). En estos ejemplos, los glomérulos organoides pueden cultivarse en grupos, cada uno de ellos representativo de una etapa de desarrollo diferente (por ejemplo, d7+11, d7+15, d7+18, d7+20) y/o cultivarse durante un período de tiempo definido (por ejemplo, 2, 5 y 10 días en cultivo en vórtice). Los organoides renales se pueden evaluar mediante, por ejemplo, una evaluación visual, una inmunohistoquímica y un análisis de la expresión génica y proteica para determinar el estadio del desarrollo o de la enfermedad. En un ejemplo, los organoides renales también se pueden poner en contacto con una nefrotoxina, un compuesto candidato y/o un compuesto terapéutico durante estos estudios y se puede determinar la nefrotoxicidad y/o la eficacia terapéutica. Como se ha indicado anteriormente, los organoides renales utilizados en los ejemplos anteriores pueden generarse a partir de células iPS que se han modificado genéticamente para expresar un gen indicador.

Métodos de cultivo celular

El término “medios” o “medio”, tal como se usa en referencia al cultivo celular, incluye los componentes del entorno que rodea a las células. Se prevé que el medio contribuya y/o proporcione las condiciones suficientes para la diferenciación celular y la formación de organoides. El medio puede ser sólido, líquido, gaseoso o una mezcla de fases y materiales. El medio puede incluir un medio de crecimiento líquido, así como un medio líquido que no sostiene el crecimiento celular. El medio también incluye un medio gelatinoso tal como matrices de agar, agarosa, gelatina y colágeno. Entre los ejemplos de medio gaseoso se incluyen la fase gaseosa a la que están expuestas las células que crecen en una placa de Petri u otro soporte sólido o semisólido. El término “medio” también se refiere al material que está destinado a usarse en un cultivo celular, incluso si aún no se ha puesto en contacto con las células.

El medio de cultivo usado en el método de la presente descripción se puede preparar utilizando como medio de cultivo basal un medio de cultivo utilizado para cultivar células madre o células MI. El medio de cultivo basal incluye, por ejemplo, el medio de cultivo mínimo esencial Eagles (MEM) y no está particularmente restringido, siempre que pueda usarse para cultivar células madre o células MI. Además, el medio de cultivo de la presente descripción puede contener cualquier componente, tal como ácidos grasos o lípidos, vitaminas, factores de crecimiento, citocinas, antioxidantes, agentes amortiguadores, sales inorgánicas y similares. El medio de cultivo celular usado en la presente descripción contiene todos los aminoácidos esenciales y también puede contener aminoácidos no esenciales. En general, los aminoácidos se clasifican en aminoácidos esenciales (Thr, Met, Val, Leu, Ile, Phe, Trp, Lys, His) y aminoácidos no esenciales (Gly, Ala, Ser, Cys, Gln, Asn, Asp, Tyr, Arg, Pro). En otros ejemplos, el medio de cultivo basal incluye, por ejemplo, el medio definido químicamente APEL, mTESR-E6 o E8 (StemCell Technologies). Los medios de cultivo basales también pueden complementarse con medios de hibridoma sin proteínas (PFHM) (por ejemplo, 3,5 %). En un ejemplo, el medio basal se complementa con un sustituto sérico. Por ejemplo, los medios de cultivo basales se pueden complementar con suero sustitutivo inactivable (Thermo Fisher).

Como apreciarán los expertos en la materia, el medio de cultivo descrito en la presente memoria tendrá que reemplazarse con el tiempo. Se considera que la identificación del momento apropiado para la sustitución de los medios está dentro del conjunto de habilidades de dicho destinatario experto. Por ejemplo, hay varios indicadores colorimétricos disponibles en el mercado que se usan comúnmente en los medios de cultivo celular para indicar cuándo los medios requieren reemplazo. Como guía, para el cultivo celular en placas de cultivo con múltiples pocillos, los medios de cultivo se pueden reemplazar cada 24 o 48 horas. Por ejemplo, los medios de cultivo se pueden reemplazar cada dos días.

Organoides renales

La presente descripción abarca un método para producir organoides renales. En un ejemplo, los organoides renales se producen mediante un medio de cultivo en vórtice, que comprende una población de células del mesodermo intermedio (MI). En un ejemplo, las células IM se agitan en un cultivo en suspensión. Para evitar dudas, el “cultivo en suspensión” se usa en el contexto de la presente descripción para referirse al cultivo celular en el que células individuales o pequeños agregados de células se multiplican mientras están suspendidas en un medio líquido agitado. Por ejemplo, las células individuales o pequeños agregados de células se multiplican en un cultivo en suspensión y forman organoides renales.

En un ejemplo, el medio de cultivo celular IM comprende FGF. En algunos ejemplos, el FGF puede seleccionarse de entre la superfamilia FGF9, que incluye FGF9, FGF16 y FGF20. En algunos ejemplos, el FGF es FGF9. Por ejemplo, el medio de cultivo celular IM puede comprender FGF desde D7 hasta al menos D7+10. En un ejemplo, el medio de cultivo celular IM puede comprender FGF desde D7 hasta al menos D7+15. A continuación se proporcionan ejemplos de concentraciones de FGF. Por ejemplo, el medio de cultivo celular comprende al menos 50 ng/ml de FGF. En otro ejemplo, el medio de cultivo celular comprende al menos 100 ng/ml de FGF. En otro ejemplo, el medio de cultivo celular comprende al menos 150 ng/ml de FGF. En otro ejemplo, el medio de cultivo celular comprende al menos 300 ng/ml de FGF. En otro ejemplo, el medio de cultivo celular comprende al menos 350 ng/ml de FGF. En otro ejemplo, el medio de cultivo celular comprende al menos 400 ng/ml de FGF. En otro ejemplo, el medio de cultivo celular comprende al menos 500 ng/ml de FGF. En otro ejemplo, el medio de cultivo celular comprende entre 50 ng/ml y 400 ng/ml de FGF. En otro ejemplo, el medio de cultivo celular comprende entre 50 ng/ml y 300 ng/ml de FGF. En otro ejemplo, el medio de cultivo celular comprende entre 50 ng/ml y 250 ng/ml de FGF. En otro ejemplo, el medio de cultivo celular comprende entre 100 ng/ml y 200 ng/ml de FGF. En otro ejemplo, el medio de cultivo celular comprende entre 180 ng/ml y 220 ng/ml de FGF. En otro ejemplo, el medio de cultivo celular comprende entre 190 ng/ml y 210 ng/ml de FGF.

En un ejemplo, el medio de cultivo celular IM puede comprender FGF9. En un ejemplo, el medio de cultivo celular comprende al menos 50 ng/ml de FGF9. En otro ejemplo, el medio de cultivo celular comprende al menos 100 ng/ml de FGF9. En otro ejemplo, el medio de cultivo celular comprende al menos 150 ng/ml de FGF9. En otro ejemplo, el medio de cultivo celular comprende al menos 200 ng/ml de FGF9. En otro ejemplo, el medio de cultivo celular comprende al menos 300 ng/ml de FGF9. En otro ejemplo, el medio de cultivo celular comprende al menos 350 ng/ml de FGF9. En otro ejemplo, el medio de cultivo celular comprende al menos 400 ng/ml de FGF9. En otro ejemplo, el medio de cultivo celular comprende al menos 500 ng/ml de FGF9. En otro ejemplo, el medio de cultivo celular comprende entre 50 ng/ml y 400 ng/ml de FGF9. En otro ejemplo, el medio de cultivo celular comprende entre 50 ng/ml

y 300 ng/ml de FGF9. En otro ejemplo, el medio de cultivo celular comprende entre 50 ng/ml y 250 ng/ml de FGF9. En otro ejemplo, el medio de cultivo celular comprende entre 100 ng/ml y 200 ng/ml de FGF9. En otro ejemplo, el medio de cultivo celular comprende entre 180 ng/ml y 220 ng/ml de FGF9. En otro ejemplo, el medio de cultivo celular comprende entre 190 ng/ml y 210 ng/ml de FGF9.

En otro ejemplo, un nivel de FGF9 mencionado anteriormente se sustituye por FGF2. Por ejemplo, el medio de cultivo celular MI puede comprender entre 50 ng/ml y 400 ng/ml de FGF2. En otro ejemplo, el medio de cultivo celular comprende entre 50 ng/ml y 300 ng/ml de FGF2. En otro ejemplo, el medio de cultivo celular comprende entre 50 ng/ml y 250 ng/ml de FGF2. En otro ejemplo, el medio de cultivo celular comprende entre 100 ng/ml y 200 ng/ml de FGF2. En otro ejemplo, el medio de cultivo celular comprende entre 180 ng/ml y 220 ng/ml de FGF2. En otro ejemplo, el medio de cultivo celular comprende entre 190 ng/ml y 210 ng/ml de FGF2.

En otro ejemplo, un nivel de FGF9 mencionado anteriormente se sustituye por FGF16. Por ejemplo, el medio de cultivo celular MI puede comprender entre 50 ng/ml y 400 ng/ml de FGF16. En otro ejemplo, el medio de cultivo celular comprende entre 50 ng/ml y 300 ng/ml de FGF16. En otro ejemplo, el medio de cultivo celular comprende entre 50 ng/ml y 250 ng/ml de FGF16. En otro ejemplo, el medio de cultivo celular comprende entre 100 ng/ml y 200 ng/ml de FGF16. En otro ejemplo, el medio de cultivo celular comprende entre 180 ng/ml y 220 ng/ml de FGF16. En otro ejemplo, el medio de cultivo celular comprende entre 190 ng/ml y 210 ng/ml de FGF16.

En otro ejemplo, un nivel de FGF9 mencionado anteriormente se sustituye por FGF20. Por ejemplo, el medio de cultivo celular MI puede comprender entre 50 ng/ml y 400 ng/ml de FGF20. En otro ejemplo, el medio de cultivo celular comprende entre 50 ng/ml y 300 ng/ml de FGF20. En otro ejemplo, el medio de cultivo celular comprende entre 50 ng/ml y 250 ng/ml de FGF20. En otro ejemplo, el medio de cultivo celular comprende entre 100 ng/ml y 200 ng/ml de FGF20. En otro ejemplo, el medio de cultivo celular comprende entre 180 ng/ml y 220 ng/ml de FGF20. En otro ejemplo, el medio de cultivo celular comprende entre 190 ng/ml y 210 ng/ml de FGF20. En un ejemplo, el FGF se retira del medio de cultivo después de 5 días en un cultivo en vórtice. En un ejemplo, el FGF se retira del medio de cultivo después de 6 días en un cultivo en vórtice. En un ejemplo, el FGF se retira del medio de cultivo después de 4 a 6 días de cultivo en vórtice.

En un ejemplo, la nefrogénesis se inicia en los organoides al complementar el medio de cultivo con un agonista de Wnt/ β -catenina. El término “agonista de Wnt/ β -catenina” se usa en el contexto de la presente descripción para referirse a una molécula que inhibe la GSK3 (por ejemplo, la GSK3- β) en el contexto de la vía de señalización de Wnt canónica, pero preferiblemente no en el contexto de otras vías de señalización de Wnt no canónicas. En algunos ejemplos, el agonista del Wnt/ β -catenina es un inhibidor de la GSK 3 β . Entre los ejemplos de agonistas de la Wnt β -catenina se incluyen CHIR99021 (CHIR), LiCl, SB-216763, CAS 853220-52-7 y otros agonistas de Wnt/ β -catenina que están disponibles en el mercado en fuentes como Santa Cruz Biotechnology y R & D Systems.

En consecuencia, en un ejemplo, el medio de cultivo celular MI puede comprender un nivel de FGF mencionado anteriormente y un agonista de Wnt/ β -catenina. Por ejemplo, el medio de cultivo celular MI puede comprender al menos 0,5 μ M de agonista de Wnt/ β -catenina. En otro ejemplo, el medio de cultivo celular puede comprender al menos 0,6 μ M de agonista de Wnt/ β -catenina. En otro ejemplo, el medio de cultivo celular puede comprender al menos 0,7 μ M de agonista de Wnt/ β -catenina. En otro ejemplo, el medio de cultivo celular puede comprender al menos 0,8 μ M de agonista de Wnt/ β -catenina. En otro ejemplo, el medio de cultivo celular puede comprender al menos 0,9 μ M de agonista de Wnt/ β -catenina. En otro ejemplo, el medio de cultivo celular puede comprender aproximadamente 1 μ M de agonista de Wnt/ β -catenina. En otro ejemplo, el medio de cultivo celular puede comprender 1,1 μ M o menos de agonista de Wnt/ β -catenina. En otro ejemplo, el medio de cultivo celular puede comprender 1,2 μ M o menos de agonista de Wnt/ β -catenina. En otro ejemplo, el medio de cultivo celular puede comprender 1,3 μ M o menos de agonista de Wnt/ β -catenina. En otro ejemplo, el medio de cultivo celular puede comprender 1,4 μ M o menos de agonista de Wnt/ β -catenina. En otro ejemplo, el medio de cultivo celular puede comprender 1,5 μ M o menos de agonista de Wnt/ β -catenina. Se apreciará que el medio de cultivo puede comprender cualquier combinación de estos límites superior e inferior de la concentración del agonista de Wnt/ β -catenina. En otro ejemplo, el medio de cultivo celular puede comprender entre 0,5 μ M y 1,5 μ M de agonista de Wnt/ β -catenina. En otro ejemplo, el medio de cultivo celular puede comprender entre 0,8 μ M y 1,2 μ M de agonista de Wnt/ β -catenina. En un ejemplo, el medio de cultivo celular puede comprender al menos 0,5 μ M de CHIR. En otro ejemplo, el medio de cultivo celular puede comprender al menos 0,6 μ M de CHIR. En otro ejemplo, el medio de cultivo celular puede comprender al menos 0,7 μ M de CHIR. En otro ejemplo, el medio de cultivo celular puede comprender al menos 0,8 μ M de CHIR. En otro ejemplo, el medio de cultivo celular puede comprender al menos 0,9 μ M de CHIR. En otro ejemplo, el medio de cultivo celular puede comprender aproximadamente 1 μ M de CHIR. En otro ejemplo, el medio de cultivo celular puede comprender 1,1 μ M o menos de CHIR. En otro ejemplo, el medio de cultivo celular puede comprender 1,2 μ M o menos de CHIR. En otro ejemplo, el medio de cultivo celular puede comprender 1,3 μ M o menos de CHIR. En otro ejemplo, el medio de cultivo celular puede comprender 1,4 μ M o menos de CHIR. En otro ejemplo, el medio de cultivo celular puede comprender 1,5 μ M o menos de CHIR. Se apreciará que el medio de cultivo puede comprender cualquier combinación de estos límites superior e inferior de la concentración de CHIR. En otro ejemplo, el medio de cultivo celular puede comprender entre 0,5 μ M y 1,5 μ M de CHIR. En otro ejemplo, el medio de cultivo celular puede comprender entre 0,8 μ M y 1,2 μ M de CHIR.

En otro ejemplo, el medio de cultivo celular MI puede comprender un inhibidor de la quinasas Rho (ROCKi) tal como el Y-27632 (StemCell Technologies). En un ejemplo, el medio de cultivo celular puede comprender al menos 8 μ M de ROCKi. En otro ejemplo, el medio de cultivo celular puede comprender aproximadamente 10 μ M de ROCKi. En otro ejemplo, el medio de cultivo celular puede comprender 12 μ M o menos de ROCKi. En otro ejemplo, el medio de cultivo celular puede comprender entre 8 μ M y 12 μ M de ROCKi.

En un ejemplo anterior, el medio de cultivo celular MI puede comprender FGF9, un agonista de Wnt/ β -catenina tal como CHIR y una o más o la totalidad de heparina, poli(alcohol vinílico) (PVA) y metilcelulosa (MC). En otro ejemplo, el medio de cultivo celular también puede comprender ROCKi.

En un ejemplo, el medio de cultivo celular MI comprende al menos 0,5 μ g/ml de heparina. En otro ejemplo, el medio de cultivo celular comprende aproximadamente 1 μ g/ml de heparina. En otro ejemplo, el medio de cultivo celular comprende 1,5 μ g/ml o menos de heparina. En otro ejemplo, el medio de cultivo celular comprende 2 μ g/ml o menos de heparina. En otro ejemplo, el medio de cultivo celular comprende entre 0,2 μ g/ml y 2 μ g/ml de heparina. En otro ejemplo, el medio de cultivo celular comprende entre 0,5 μ g/ml y 1,5 μ g/ml de heparina. En otro ejemplo, el medio de cultivo celular comprende entre 0,8 μ g/ml y 1,2 μ g/ml de heparina.

En un ejemplo, el medio de cultivo celular MI comprende al menos un 0,05 % de PVA. En otro ejemplo, el medio de cultivo celular comprende aproximadamente un 0,1 % de PVA. En otro ejemplo, el medio de cultivo celular comprende un 0,15 % o menos de PVA. En otro ejemplo, el medio de cultivo celular comprende entre el 0,1 % y el 0,15 % de PVA.

En un ejemplo, el medio de cultivo celular MI comprende al menos un 0,05 % de MC. En otro ejemplo, el medio de cultivo celular comprende aproximadamente un 0,1 % de MC. En otro ejemplo, el medio de cultivo celular comprende menos del 0,15 % de MC. En otro ejemplo, el medio de cultivo celular comprende entre el 0,1 % y el 0,15 % de MC.

Los términos “vorticial” y “en vórtice” se usan indistintamente en el contexto de la presente descripción para referirse al movimiento del medio de cultivo celular en un patrón circular, giratorio o en espiral. En un ejemplo, el medio de cultivo celular se agita aplicando suficiente agitación en un movimiento circular a un cultivo celular. Por ejemplo, los cultivos celulares se pueden agitar usando un agitador orbital. Otros ejemplos de aparatos adecuados para agitar cultivos celulares incluyen plataformas agitadoras, incubadoras agitadoras o matraces giratorios. Las rpm apropiadas para la rotación permiten que las células MI se agreguen y formen organoides.

En un ejemplo, el cultivo de células MI se agita al menos a 30 rpm. En otro ejemplo, el cultivo celular se agita al menos a 40 rpm. En otro ejemplo, el cultivo celular se agita al menos a 50 rpm. En otro ejemplo, el cultivo celular se agita al menos a 60 rpm. En otro ejemplo, el cultivo celular se agita al menos a 70 rpm. En otro ejemplo, el cultivo celular se agita al menos a 80 rpm. En otro ejemplo, el cultivo celular se agita entre 40 y 80 rpm. En otro ejemplo, el cultivo celular se agita entre 50 y 70 rpm. En otro ejemplo, el cultivo celular se agita entre 55 y 65 rpm. En otro ejemplo, el cultivo celular se agita entre 30 y 150 rpm. En otro ejemplo, el cultivo celular se agita entre 30 y 90 rpm.

En un ejemplo, las células IM se cultivan durante al menos cinco días. En otro ejemplo, las células IM se cultivan durante al menos siete días. En otro ejemplo, las células IM se cultivan durante al menos diez días. En otro ejemplo, las células IM se cultivan durante al menos 12 días. En otro ejemplo, las células IM se cultivan durante al menos 14 días. En otro ejemplo, las células IM se cultivan durante al menos 20 días. En otro ejemplo, las células IM se cultivan durante hasta 42 días. En otro ejemplo, las células IM se cultivan durante entre 5 y 20 días. En otro ejemplo, las células IM se cultivan durante entre cinco y 18 días. En otro ejemplo, las células IM se cultivan durante entre siete y 14 días. Por ejemplo, las células MI se pueden cultivar con generación de vórtice durante al menos diez días. Por ejemplo, las células MI se pueden agitar durante al menos 20 días. En otro ejemplo, las células IM se pueden agitar durante al menos 30 días. En un ejemplo, las células MI se agitan entre 10 y 30 días. En otro ejemplo, las células IM se agitan entre 15 y 30 días.

En un ejemplo, una población de células MI se disocia y se cultiva con generación de vórtice en los medios de cultivo mencionados anteriormente. En un ejemplo, las células IM se pueden disociar usando EDTA. En otro ejemplo, las células MI se pueden disociar usando tripsina o TrypLE. En un ejemplo, las células MI disociadas se hacen pasar a través de una malla antes de seguir cultivándose. En un ejemplo, las células se cultivan con turbulencia durante al menos 12 días después de la disociación. En otro ejemplo, las células se cultivan con turbulencia durante al menos 13 días después de la disociación. En otro ejemplo, las células se cultivan con turbulencia durante al menos 14 días después de la disociación. En otro ejemplo, las células se cultivan con turbulencia durante al menos 15 días después de la disociación. En otro ejemplo, las células se cultivan con turbulencia durante al menos 20 días después de la disociación. En otro ejemplo, las células se cultivan con turbulencia durante al menos 25 días después de la disociación. En otro ejemplo, las células se cultivan con turbulencia durante al menos 35 días después de la disociación. En otro ejemplo, las células se cultivan con turbulencia durante 5 a 18 días después de la disociación.

En otros ejemplos, las células MI definidas en la presente memoria pueden cultivarse en diversos medios de cultivo que comprenden diferentes componentes. Por ejemplo, las células pueden cultivarse en etapas en donde cada etapa está asociada a un medio de cultivo diferente. En un ejemplo, las células IM se cultivan con turbulencia en dos etapas. En este ejemplo, el medio de cultivo de fase 1 comprende un nivel de FGF anteriormente mencionado, tal como FGF9,

CHIR, ROCKi, heparina, PVA y MC, mientras que el medio de cultivo de fase 2 comprende un nivel de FGF anteriormente mencionado, tal como FGF9, CHIR, heparina, PVA y MC. Por ejemplo, el medio de cultivo de fase 1 puede comprender 200 ng/ml de FGF9, 1 μ M de CHIR, 10 μ M de ROCKi, 1 μ g/ml de heparina, 0,1 % de PVA y 0,1 % de MC, mientras que el medio de cultivo de fase 2 puede comprender FGF9, 1 μ M de CHIR, 1 μ g/ml de heparina, 0,1 % de PVA y 0,1 % de MC.

En otro ejemplo, las células IM se cultivan con turbulencia en tres etapas. En este ejemplo, los medios de cultivo de las etapas 1 y 2 son como se han definido anteriormente y el medio de cultivo de la etapa 3 comprende un nivel de PVA y MC mencionado anteriormente. Por ejemplo, el medio de cultivo de la etapa 3 puede comprender un 0,1 % de PVA y un 0,1 % de MC.

En un ejemplo, las células MI se cultivan en un medio de cultivo de la etapa 1 durante un día antes de cultivarse en un medio de cultivo de la etapa dos durante cuatro días. En un ejemplo, las células se cultivan en un medio de cultivo de la etapa 1 durante 18 a 24 horas antes de cultivarse en un medio de cultivo de la etapa 2 durante cuatro días. En estos ejemplos, las células pueden cultivarse adicionalmente en un medio de cultivo de fase tres durante siete a 20 días. En otro ejemplo, las células pueden cultivarse adicionalmente en un medio de cultivo de fase tres durante al menos 15 días. En otro ejemplo, las células pueden cultivarse adicionalmente en un medio de cultivo de fase tres durante al menos 30 días.

Los presentes inventores también han identificado que la adición de un ácido retinoico a las células MI después de aproximadamente 5 a 10 días en cultivo vorticial mejora la maduración glomerular en los organoides (mejora la maduración de los podocitos glomerulares). En consecuencia, en un ejemplo, el ácido retinoico se añade al medio de cultivo celular después de 5 a 10 días en un cultivo vorticial. En un ejemplo, todo el ácido trans-retinoico (atRA) se añade al medio de cultivo celular. En un ejemplo, se añaden al menos 0,07 μ M de ácido retinoico al medio de cultivo celular. En otro ejemplo, se añade al menos 0,1 μ M de ácido retinoico al medio de cultivo celular. En otro ejemplo, se añaden al menos 0,2 μ M de ácido retinoico al medio de cultivo celular. En otro ejemplo, se añaden al menos 0,5 μ M de ácido retinoico al medio de cultivo celular.

En otro ejemplo, se añaden al menos 1,5 μ M de ácido retinoico al medio de cultivo celular. En un ejemplo, se añaden al menos 1,8 μ M de ácido retinoico al medio de cultivo celular. En un ejemplo, se añaden al menos 2,0 μ M de ácido retinoico al medio de cultivo celular. En otro ejemplo, se añaden al menos 2,5 μ M de ácido retinoico al medio de cultivo celular. En otro ejemplo, se añaden entre 1,5 μ M y 3 μ M de ácido retinoico al medio de cultivo celular. En otro ejemplo, se añaden entre 2,0 μ M y 3 μ M de ácido retinoico al medio de cultivo celular.

En otro ejemplo, los medios de cultivo de las etapas 1 y 2 son como se han definido anteriormente y el medio de cultivo de la etapa 3 comprende un nivel anteriormente mencionado de PVA, MC y atRA. Por ejemplo, el medio de cultivo de la etapa 3 puede comprender un 0,1 % de PVA y un 0,1 % de MC. 2,5 μ M de atRA.

Los presentes inventores han identificado que someter un número reducido de células MI a un cultivo vorticial en un medio apropiado puede dirigir el desarrollo de organoides renales que tienen una estructura tridimensional simplificada. En consecuencia, en un ejemplo, los métodos de la presente descripción abarcan la agitación en vórtice de una población de células MI que comprende menos de 5×10^5 células MI. En otro ejemplo, los métodos de la presente descripción abarcan la agitación en vórtice de una población de células MI que comprende menos de 4×10^5 células MI. En otro ejemplo, los métodos de la presente descripción abarcan la agitación en vórtice de una población de células MI que comprende menos de 3×10^5 células MI. En otro ejemplo, los métodos de la presente descripción abarcan la agitación en vórtice de una población de células MI que comprende menos de 1×10^5 células MI. En otro ejemplo, los métodos de la presente descripción abarcan la agitación en vórtice de una población de células MI que comprende 5×10^4 células MI. En otro ejemplo, los métodos de la presente descripción abarcan la agitación en vórtice de una población de células MI que comprende 4×10^4 células MI. En otro ejemplo, los métodos de la presente descripción abarcan la agitación en vórtice de una población de células MI que comprende entre 1×10^4 y 1×10^5 células MI. En otro ejemplo, los métodos de la presente descripción abarcan la agitación en vórtice de una población de células MI que comprende entre 2×10^4 y 1×10^5 células MI. En otro ejemplo, los métodos de la presente descripción abarcan la agitación en vórtice de una población de células MI que comprende entre 5×10^3 y 3×10^5 células MI.

En otro ejemplo, los métodos de la presente descripción abarcan la agitación en vórtice entre 1×10^5 células MI/ml y 5×10^6 células MI/ml. En otro ejemplo, los métodos de la presente descripción abarcan la agitación en vórtice entre 5×10^5 y 4×10^6 células MI/ml. En otro ejemplo, los métodos de la presente descripción abarcan la agitación en vórtice entre 5×10^5 y 3×10^6 células MI/ml. En otro ejemplo, los métodos de la presente descripción abarcan la agitación en vórtice de una población de menos de 5×10^6 células MI/ml. En otro ejemplo, los métodos de la presente descripción abarcan la agitación en vórtice de una población de menos de 4×10^6 células MI/ml. En otro ejemplo, los métodos de la presente descripción abarcan la agitación en vórtice de una población de menos de 3×10^6 células MI/ml. En otro ejemplo, los métodos de la presente descripción abarcan la agitación en vórtice de una población de menos de 2×10^6 células MI/ml. En otro ejemplo, los métodos de la presente descripción abarcan la agitación en vórtice de una población de 1×10^6 células MI/ml o menos. En otro ejemplo, los métodos de la presente descripción abarcan la agitación en vórtice entre 5×10^5 y 2×10^6 células MI/ml. En otro ejemplo, los métodos de la presente descripción

abarcen la agitación en vórtice entre 5×10^5 y $1,5 \times 10^6$ células/ml. En estos ejemplos, se pueden producir alrededor de 5000 a 15 000 organoides. En otro ejemplo, se pueden producir alrededor de 8000 a 10 000 organoides. En estos ejemplos, el número total de células aumenta de 30 a 40 veces con respecto al número de células al inicio del cultivo en vórtice durante la duración del cultivo. En estos ejemplos, el número total de células aumenta de 3 a 4 veces en comparación con el aumento del número total de células utilizando el protocolo descrito en Takasato y col. (2015) *Nature*, vol. 526: 564-568. En este ejemplo, el número total de células aumenta de aproximadamente 1×10^5 a 5×10^6 células/ml a aproximadamente 3×10^6 a 2×10^8 células/ml.

En un ejemplo, las células MI se obtienen mediante un método descrito en la presente memoria.

En un ejemplo, la presente descripción abarca un método para producir organoides renales que comprende:

- cultivar una población de células madre durante siete días para producir células MI, donde los primeros 4 a 5 días implican cultivar las células madre en alta concentración de un agonista de Wnt/ β -catenina, tal como CHIR y los días restantes implican cultivar las células en un medio de cultivo celular que comprende FGF9 y una concentración baja de un agonista de Wnt/ β -catenina;
- disociar las células MI;
- producir organoides renales agitando en vórtice las células MI en un medio de cultivo celular que comprende FGF9 durante al menos 5 días, en donde las primeras 24 horas implican cultivar las células en un medio de cultivo celular, que comprende FGF9, heparina, una baja concentración de agonista de Wnt/ β -catenina y ROCKi y los 3 o 4 días siguientes implican cultivar las células en un medio de cultivo celular, que comprende FGF9, heparina, una baja concentración de agonista de Wnt/ β -catenina, PVA y MC.

En el ejemplo anterior, las células madre pueden cultivarse durante siete días, en donde los primeros 4 días implican cultivar las células madre en una alta concentración de un agonista de Wnt/ β -catenina, tal como CHIR y los días restantes implican cultivar las células en un medio de cultivo celular, que comprende FGF9 y una baja concentración de un agonista de Wnt/ β -catenina. En un ejemplo, el agonista de Wnt/ β -catenina es CHIR. En un ejemplo, una alta concentración de CHIR es de aproximadamente $3 \mu\text{M}$ a aproximadamente $12 \mu\text{M}$. En otro ejemplo, una alta concentración de CHIR es de aproximadamente $4 \mu\text{M}$ a aproximadamente $10 \mu\text{M}$, de aproximadamente $5 \mu\text{M}$ a aproximadamente $9 \mu\text{M}$, de aproximadamente $6 \mu\text{M}$ a aproximadamente $8 \mu\text{M}$, de aproximadamente $6,5 \mu\text{M}$ a aproximadamente $8 \mu\text{M}$, o de aproximadamente $6,5 \mu\text{M}$ a aproximadamente $7 \mu\text{M}$. En un ejemplo, una concentración baja de CHIR es de $1 \mu\text{M}$. En un ejemplo, las células IM se disocian usando tripsina. En otro ejemplo, las células se disocian usando EDTA. En un ejemplo, las células MI se agitan en un medio de cultivo celular, que comprende 200 ng/ml de FGF9 durante al menos 4 días, en donde las primeras 24 horas implican cultivar las células en un medio de cultivo celular, que comprende 200 ng/ml de FGF9, $1 \mu\text{g/ml}$ de heparina, $1 \mu\text{g/ml}$ de CHIR y $10 \mu\text{M}$ de ROCKi y los 3 o 4 días siguientes implican cultivar las células en un medio de cultivo celular, que comprende 200 ng/ml de FGF9, $1 \mu\text{g/ml}$ de heparina, $1 \mu\text{M}$, $0,1 \%$ de PVA y $0,1 \%$ de MC.

En otro ejemplo, el método comprende además agitar las células en un medio de cultivo celular que comprende PVA y MC que no comprende CHIR o FGF9. En un ejemplo, el medio de cultivo celular comprende un $0,1 \%$ de PVA y un $0,1 \%$ de MC. En un ejemplo, las células se agitan en un medio de cultivo celular que comprende PVA y MC que no comprende CHIR o FGF9 durante 5 días o más.

Mesodermo intermedio

Los presentes inventores también han identificado sorprendentemente, que cultivar células madre en un medio que comprenda una concentración baja de CHIR y activar la señalización de wnt/ β -catenina durante un período más prolongado es beneficioso para producir un mesodermo intermedio mejorado. El método de cultivo *in vitro* proporciona un sistema para diferenciar las células madre a través de células de la línea primitiva posterior (PPS) y células del mesodermo intermedio (MI) para producir el organoide renal.

En consecuencia, en un ejemplo, la presente descripción abarca un método *in vitro* para producir células del mesodermo intermedio (MI), donde el método comprende cultivar una población de células de la línea primitiva posterior (PPS) durante 2 a 5 días en un medio de cultivo celular, que comprende FGF y menos de $4 \mu\text{M}$ de un agonista de Wnt/ β -catenina. Las concentraciones adecuadas de agonistas de Wnt/ β -catenina y FGF y la duración del cultivo son las que se describen a continuación en relación con el método de producción de células del mesodermo intermedio (MI) durante el período de tiempo posterior a los primeros 3 o 4 días de cultivo.

En consecuencia, en un ejemplo, la presente descripción abarca un método para producir células mesodérmicas intermedias (MI), donde el método comprende cultivar una población de células madre en un medio de cultivo celular, que comprende CHIR durante alrededor de 7 días, en donde se añade un FGF tal como el FGF9 al medio de cultivo después de los primeros 3 o 4 días de cultivo. En un ejemplo, se añaden de 50 ng/ml a 400 ng/ml de FGF9 al medio de cultivo después de los primeros 3 o 4 días de cultivo. En otro ejemplo, se añaden de 50 ng/ml a 300 ng/ml de FGF9 al medio de cultivo después de los primeros 3 o 4 días de cultivo. En otro ejemplo, se añaden de 50 ng/ml a 250 ng/ml

de FGF9 al medio de cultivo después de los primeros 3 o 4 días de cultivo. En otro ejemplo, se añaden de 100 ng/ml a 200 ng/ml de FGF9 al medio de cultivo después de los primeros 3 o 4 días de cultivo. En otro ejemplo, se añaden de 150 ng/ml a 250 ng/ml de FGF9 al medio de cultivo después de los primeros 3 o 4 días de cultivo. En otro ejemplo, se añaden de 175 ng/ml a 225 ng/ml de FGF9 al medio de cultivo después de los primeros 3 o 4 días de cultivo. En otro ejemplo, se añaden de 190 ng/ml a 210 ng/ml de FGF9 al medio de cultivo después de los primeros 3 o 4 días de cultivo. En otro ejemplo, se añaden de 195 ng/ml a 205 ng/ml de FGF9 al medio de cultivo después de los primeros 3 o 4 días de cultivo. En otro ejemplo, se añaden aproximadamente 200 ng/ml de FGF9 al medio de cultivo después de los primeros 3 o 4 días de cultivo. En un ejemplo, la heparina también se añade al medio de cultivo después de los primeros 3 o 4 días de cultivo. En un ejemplo, se añaden entre 0,5 µg/ml y 2 µg/ml de heparina al medio de cultivo después de los primeros 3 o 4 días de cultivo. En otro ejemplo, se añaden entre 0,5 µg/ml y 1,5 µg/ml de heparina al medio de cultivo después de los primeros 3 o 4 días de cultivo. En otro ejemplo, se añaden entre 0,8 µg/ml y 1,2 µg/ml de heparina al medio de cultivo después de los primeros 3 o 4 días de cultivo. En otro ejemplo, se añade 1 µg/ml de heparina al medio de cultivo después de los primeros 3 o 4 días de cultivo. En un ejemplo, un nivel anteriormente mencionado de FGF y heparina se añade al medio de cultivo después de 4 días de cultivo. En un ejemplo, las células madre se cultivan en un medio de cultivo celular que comprende CHIR durante 7 días.

En particular, los presentes inventores han identificado que el cultivo de células madre en una alta concentración de agonista de Wnt/β-catenina, tal como CHIR, seguido del cultivo de las células madre en una concentración baja de agonista de Wnt/β-catenina y un FGF, tal como el FGF9 produce células MI mejoradas. Por ejemplo, las células MI mejoradas expresan niveles altos de PAX2, LHX1 y OSR1 (mesénquima superior) y Wnt11 y GATA3 (epitelio ureteral). En consecuencia, en un ejemplo, las células madre pueden cultivarse en un medio de cultivo que comprenda una alta concentración de agonista de Wnt/β-catenina, tal como CHIR, antes de cultivarse en un medio de cultivo que comprenda una baja concentración de agonista de Wnt/β-catenina y un FGF, tal como FGF9, FGF16, FGF20 o FGF2.

En un ejemplo, la presente descripción abarca un método para producir células mesodérmicas intermedias (MI), donde el método comprende cultivar una población de células madre en un medio de cultivo celular que comprende una alta concentración de CHIR, antes de cultivar la población de células madre en un medio de cultivo celular que comprende una concentración baja de CHIR y un FGF, tal como el FGF9. En este ejemplo, una “concentración alta” de CHIR es de al menos 5 µM y una “concentración baja” de CHIR es inferior a 3 µM. En otro ejemplo, una “concentración alta” de CHIR es de al menos 6 µM y una “concentración baja” de CHIR es inferior a 2 µM. En otro ejemplo, una “concentración alta” de CHIR es de 7 µM y una “concentración baja” de CHIR es de 1 µM o menos.

En consecuencia, en otro aspecto, los métodos de la presente descripción abarcan un método *in vitro* para producir células del mesodermo intermedio (MI). En un ejemplo, el método de producción de células MI comprende, cultivar una población de células madre durante aproximadamente siete días, en donde los primeros 4 a 5 días implican cultivar las células madre en alta concentración de un agonista de Wnt/β-catenina, tal como CHIR y los días restantes implican cultivar las células en un medio de cultivo celular, que comprende FGF9 y una baja concentración de un agonista de Wnt/β-catenina. En un aspecto, el método de producción de células MI comprende cultivar una población de células madre en un medio de cultivo celular que comprende FGF9 y al menos 0,5 µM de un agonista de Wnt/β-catenina, después de los primeros 4 a 5 días de cultivo en alta concentración de un agonista de Wnt/β-catenina. En otro ejemplo, el medio de cultivo celular puede comprender al menos 0,6 µM de agonista de Wnt/β-catenina, después de los primeros 4 a 5 días de cultivo en alta concentración de un agonista de Wnt/β-catenina. En otro ejemplo, el medio de cultivo celular puede comprender al menos 0,7 µM de agonista de Wnt/β-catenina, después de los primeros 4 a 5 días de cultivo en alta concentración de un agonista de Wnt/β-catenina. En otro ejemplo, el medio de cultivo celular puede comprender al menos 0,8 µM de agonista de Wnt/β-catenina, después de los primeros 4 a 5 días de cultivo en alta concentración de un agonista de Wnt/β-catenina. En otro ejemplo, el medio de cultivo celular puede comprender al menos 0,9 µM de agonista de Wnt/β-catenina, después de los primeros 4 a 5 días de cultivo en alta concentración de un agonista de Wnt/β-catenina. En otro ejemplo, el medio de cultivo celular puede comprender aproximadamente 1 µM de agonista de Wnt/β-catenina, después de los primeros 4 a 5 días de cultivo en alta concentración de un agonista de Wnt/β-catenina. En otro ejemplo, el medio de cultivo celular puede comprender 1,1 µM o menos de agonista de Wnt/β-catenina, después de los primeros 4 a 5 días de cultivo en alta concentración de un agonista de Wnt/β-catenina. En otro ejemplo, el medio de cultivo celular puede comprender 1,2 µM o menos de agonista de Wnt/β-catenina, después de los primeros 4 a 5 días de cultivo en alta concentración de un agonista de Wnt/β-catenina. En otro ejemplo, el medio de cultivo celular puede comprender 1,3 µM o menos de agonista de Wnt/β-catenina, después de los primeros 4 a 5 días de cultivo en alta concentración de un agonista de Wnt/β-catenina. En otro ejemplo, el medio de cultivo celular puede comprender 1,4 µM o menos de agonista de Wnt/β-catenina, después de los primeros 4 a 5 días de cultivo en alta concentración de un agonista de Wnt/β-catenina. En otro ejemplo, el medio de cultivo celular puede comprender 1,5 µM o menos de agonista de Wnt/β-catenina, después de los primeros 4 a 5 días de cultivo en alta concentración de un agonista de Wnt/β-catenina. Se apreciará que el medio de cultivo puede comprender cualquier combinación de estos límites superior e inferior de la concentración del agonista de Wnt/β-catenina, después de los primeros 4 a 5 días de cultivo en alta concentración de un agonista de Wnt/β-catenina. En otro ejemplo, el medio de cultivo celular puede comprender entre 0,5 µM y 1,5 µM de agonista de Wnt/β-catenina, después de los primeros 4 a 5 días de cultivo en alta concentración de un agonista de Wnt/β-catenina. En otro ejemplo, el medio de cultivo celular puede comprender entre 0,8 µM y 1,2 µM de agonista de Wnt/β-catenina, después de los primeros 4 a 5 días de cultivo en alta concentración de un agonista de Wnt/β-catenina. En consecuencia, en un ejemplo, el medio de cultivo celular puede comprender menos de 2 µM de agonista de Wnt/β-catenina, después de los primeros 4 a 5 días de cultivo en alta

concentración de un agonista de Wnt/ β -catenina. En otro ejemplo, el medio de cultivo celular puede comprender menos de 1,5 μ M de agonista de Wnt/ β -catenina, después de los primeros 4 a 5 días de cultivo en alta concentración de un agonista de Wnt/ β -catenina.

5 En un ejemplo, el agonista de Wnt/ β -catenina es CHIR. En consecuencia, en un ejemplo, el medio de cultivo celular puede comprender al menos 0,5 μ M de CHIR después de los primeros 4 a 5 días de cultivo en alta concentración de CHIR. En otro ejemplo, el medio de cultivo celular puede comprender al menos 0,6 μ M de CHIR después de los primeros 4 a 5 días de cultivo en alta concentración de CHIR. En otro ejemplo, el medio de cultivo celular puede comprender al menos 0,7 μ M de CHIR después de los primeros 4 a 5 días de cultivo en alta concentración de CHIR.
10 En otro ejemplo, el medio de cultivo celular puede comprender al menos 0,8 μ M de CHIR después de los primeros 4 a 5 días de cultivo en alta concentración de CHIR. En otro ejemplo, el medio de cultivo celular puede comprender al menos 0,9 μ M de CHIR después de los primeros 4 a 5 días de cultivo en alta concentración de CHIR. En otro ejemplo, el medio de cultivo celular puede comprender aproximadamente 1 μ M de CHIR después de los primeros 4 a 5 días de cultivo en alta concentración de CHIR. En otro ejemplo, el medio de cultivo celular puede comprender entre 0,5 μ M y 1,5 μ M de CHIR después de los primeros 4 a 5 días de cultivo en alta concentración de CHIR. En otro ejemplo, el medio de cultivo celular puede comprender entre 0,8 μ M y 1,2 μ M de CHIR después de los primeros 4 a 5 días de cultivo en alta concentración de CHIR. En consecuencia, en un ejemplo, el medio de cultivo celular puede comprender menos de 2 μ M de CHIR después de los primeros 4 a 5 días de cultivo en alta concentración de CHIR. En otro ejemplo, el medio de cultivo celular puede comprender menos de 1,5 μ M de CHIR después de los primeros 4 a 5 días de cultivo en alta concentración de CHIR.
20

En un ejemplo, el medio de cultivo puede comprender una concentración baja de CHIR, tales como las ilustradas anteriormente y de FGF9 después de los primeros 4 a 5 días de cultivo en alta concentración de CHIR. En un ejemplo, el medio de cultivo celular comprende al menos 50 ng/ml de FGF9. En otro ejemplo, el medio de cultivo celular comprende al menos 100 ng/ml de FGF9. En otro ejemplo, el medio de cultivo celular comprende al menos 150 ng/ml de FGF9. En otro ejemplo, el medio de cultivo celular comprende al menos 200 ng/ml de FGF9. En otro ejemplo, el medio de cultivo celular comprende al menos 300 ng/ml de FGF9. En otro ejemplo, el medio de cultivo celular comprende al menos 350 ng/ml de FGF9. En otro ejemplo, el medio de cultivo celular comprende al menos 400 ng/ml de FGF9. En otro ejemplo, el medio de cultivo celular comprende al menos 500 ng/ml de FGF9. En otro ejemplo, el medio de cultivo celular comprende entre 50 ng/ml y 400 ng/ml de FGF9. En otro ejemplo, el medio de cultivo celular comprende entre 50 ng/ml y 300 ng/ml de FGF9. En otro ejemplo, el medio de cultivo celular comprende entre 50 ng/ml y 250 ng/ml de FGF9. En otro ejemplo, el medio de cultivo celular comprende entre 100 ng/ml y 200 ng/ml de FGF9. En otro ejemplo, el medio de cultivo celular comprende entre 180 ng/ml y 220 ng/ml de FGF9. En otro ejemplo, el medio de cultivo celular comprende entre 190 ng/ml y 210 ng/ml de FGF9.
35

En otro ejemplo, un nivel de FGF9 mencionado anteriormente se sustituye por FGF2. Por ejemplo, el medio de cultivo celular puede comprender entre 50 ng/ml y 400 ng/ml de FGF2. En otro ejemplo, el medio de cultivo celular comprende entre 50 ng/ml y 300 ng/ml de FGF2. En otro ejemplo, el medio de cultivo celular comprende entre 50 ng/ml y 250 ng/ml de FGF2. En otro ejemplo, el medio de cultivo celular comprende entre 100 ng/ml y 200 ng/ml de FGF2. En otro ejemplo, el medio de cultivo celular comprende entre 180 ng/ml y 220 ng/ml de FGF2. En otro ejemplo, el medio de cultivo celular comprende entre 190 ng/ml y 210 ng/ml de FGF2.
40

En otro ejemplo, un nivel de FGF9 mencionado anteriormente se sustituye por FGF16. Por ejemplo, el medio de cultivo celular puede comprender entre 50 ng/ml y 400 ng/ml de FGF16. En otro ejemplo, el medio de cultivo celular comprende entre 50 ng/ml y 300 ng/ml de FGF16. En otro ejemplo, el medio de cultivo celular comprende entre 50 ng/ml y 250 ng/ml de FGF16. En otro ejemplo, el medio de cultivo celular comprende entre 100 ng/ml y 200 ng/ml de FGF16. En otro ejemplo, el medio de cultivo celular comprende entre 180 ng/ml y 220 ng/ml de FGF16. En otro ejemplo, el medio de cultivo celular comprende entre 190 ng/ml y 210 ng/ml de FGF16.
45

En otro ejemplo, un nivel de FGF9 mencionado anteriormente se sustituye por FGF20. Por ejemplo, el medio de cultivo celular puede comprender entre 50 ng/ml y 400 ng/ml de FGF20. En otro ejemplo, el medio de cultivo celular comprende entre 50 ng/ml y 300 ng/ml de FGF20. En otro ejemplo, el medio de cultivo celular comprende entre 50 ng/ml y 250 ng/ml de FGF20. En otro ejemplo, el medio de cultivo celular comprende entre 100 ng/ml y 200 ng/ml de FGF20. En otro ejemplo, el medio de cultivo celular comprende entre 180 ng/ml y 220 ng/ml de FGF20. En otro ejemplo, el medio de cultivo celular comprende entre 190 ng/ml y 210 ng/ml de FGF20.
50
55

En un ejemplo, el medio de cultivo que comprende CHIR de alta concentración no comprende FGF.

En otro ejemplo, el medio de cultivo celular puede comprender una concentración baja de CHIR, tales como las ilustradas anteriormente y un nivel de FGF y heparina ilustrados anteriormente después de los primeros 4 a 5 días de cultivo en alta concentración de CHIR. En un ejemplo, el medio de cultivo celular que comprende una concentración baja de CHIR y FGF también comprende heparina. En este ejemplo, el medio de cultivo celular puede comprender 1 μ g/ml de heparina. En otro ejemplo, el medio de cultivo celular puede comprender 1,5 μ g/ml de heparina. En otro ejemplo, el medio de cultivo celular puede comprender 2 μ g/ml de heparina. En otro ejemplo, el medio de cultivo celular puede comprender entre 0,5 μ g/ml y 2 μ g/ml de heparina. En otro ejemplo, el medio de cultivo celular puede
60
65

comprender entre 0,5 µg/ml y 1,5 µg/ml de heparina. En otro ejemplo, el medio de cultivo celular puede comprender entre 0,8 µg/ml y 1,2 µg/ml de heparina.

5 En un ejemplo, los métodos de la presente descripción abarcan la combinación de un método mencionado anteriormente para producir células MI y el uso de estas células MI en un método ilustrado anteriormente para producir un organoide renal.

10 En un ejemplo, las células madre pueden cultivarse usando un método mencionado anteriormente para producir células MI, antes de disociarse y cultivarse en un cultivo vorticial mencionado anteriormente para producir organoides renales. En este ejemplo, las células MI se pueden disociar usando EDTA, tripsina o TrypLE. En otro ejemplo, las células pueden disociarse usando EDTA antes de pasarlas a través de una malla y cultivarse en un cultivo vorticial mencionado anteriormente para producir organoides renales. En otro ejemplo, las células pueden disociarse usando tripsina antes de centrifugarse y resuspender el sedimento resultante en un cultivo vorticial mencionado anteriormente para producir organoides renales.

15 Los organoides renales abarcados en la presente descripción pueden describirse basándose en el número de días de cultivo. Los días de cultivo se pueden separar en dos componentes, incluidos los días para la producción de células MI a partir de células madre (X) y los días para la formación del organoide renal a partir de células MI (Y). En un ejemplo, la etapa que distingue la producción de células MI de las células madre y la producción de organoides renales de las células MI es la disociación de las células MI. Una forma de representar los días en cultivo para la producción de células MI a partir de células madre y los días para la formación de organoides renales a partir de células MI es el día (d) X+Y (por ejemplo, d7+12 describiría 7 días de producción de células MI a partir de células madre seguida de disociación de células MI y 12 días de formación de organoides a partir de células MI (es decir, Y = número de días como organoide).

20 En un ejemplo, los organoides renales abarcados por la presente descripción son unos organoides renales d7+12. En otro ejemplo, los organoides renales abarcados por la presente descripción son el organoide renal d7+14. En otro ejemplo, los organoides renales abarcados por la presente descripción son los organoides renales d7+15 o posteriores. En otro ejemplo, los organoides renales abarcados por la presente descripción son los organoides renales d7+17.

30 En otro ejemplo, los organoides renales abarcados por la presente descripción son los organoides renales d7+20. En otro ejemplo, los organoides renales abarcados por la presente descripción son el organoide renal d7+22. En otro ejemplo, los organoides renales abarcados por la presente descripción son el organoide renal d7+25. En otro ejemplo, los organoides renales abarcados por la presente descripción son el organoide renal d7+30. En otro ejemplo, los organoides renales abarcados por la presente descripción están entre d7+13 y d7+30. En otro ejemplo, los organoides renales abarcados por la presente descripción están entre d7+14 y d7+30. En otro ejemplo, los organoides renales abarcados por la presente descripción están entre d7+15 y d7+30. En otro ejemplo, los organoides renales abarcados por la presente descripción están entre d7+15 y d7+25. En los ejemplos mencionados anteriormente, las células MI pueden cultivarse durante 8, 9 o 10 días (es decir, d8+Y, d9+Y o d10+Y).

40 En otro ejemplo, las células de los organoides renales descritos en la presente memoria proliferan después de D7+7. En otro ejemplo, las células de los organoides renales descritos en la presente memoria proliferan después de D7+10. En otro ejemplo, las células de los organoides renales descritos en la presente memoria proliferan después de D7+12. En otro ejemplo, las células de los organoides renales descritos en la presente memoria proliferan entre D7+5 y D7+10. 45 En otro ejemplo, las células de los organoides renales descritos en la presente memoria proliferan entre D7+5 y D7+12. En estos ejemplos, la proliferación celular se puede detectar preparando una población de organoides, usando los métodos descritos en la presente memoria y aislando y disociando los organoides de la población en puntos temporales específicos (por ejemplo, D7+5, D7+7, D7+10, etc.) y determinando el número de células en cada punto temporal usando, por ejemplo, una prueba de exclusión del colorante azul tripano en un contador celular automatizado 50 (por ejemplo, Life Technologies).

Cribado

55 Los organoides renales abarcados por la presente descripción pueden usarse en diversas aplicaciones de detección. En un ejemplo, los organoides renales se pueden usar para detectar la toxicidad. Por ejemplo, los organoides renales se pueden usar para detectar la nefrotoxicidad.

60 En consecuencia, en un ejemplo, la presente descripción abarca un método para seleccionar un compuesto candidato para determinar su nefrotoxicidad, donde el método comprende poner en contacto un organoide renal descrito en la presente memoria con un compuesto candidato y determinar si el compuesto candidato es nefrotóxico o no.

65 En un ejemplo, un organoide renal descrito en la presente memoria se pone en contacto con un compuesto candidato antes de evaluarse, para determinar los efectos secundarios nefrotóxicos. Entre los efectos secundarios nefrotóxicos ilustrativos se incluyen los efectos tubulares directos, la lesión de los podocitos, la nefritis intersticial y la glomerulonefritis. La nefrotoxicidad también puede evaluarse o medirse mediante cualquier prueba apropiada para determinar la función de las células renales *in vitro*, incluido el análisis de la expresión de biomarcadores utilizando

herramientas disponibles en el mercado, que incluyen, por ejemplo, la matriz de PCR RT² Profiler™ de nefrotoxicidad humana de Qiagen o el ensayo de nefrotoxicidad multiplexada de análisis de alto contenido (HCA) de Eurofins. En otro ejemplo, la nefrotoxicidad se evalúa midiendo la apoptosis aguda de las células glomerulares en los organoides renales descritos en la presente memoria, tras el contacto con un compuesto candidato. En otros ejemplos, la nefrotoxicidad se puede evaluar usando microscopía electrónica, tal como la ME de transmisión o la ME de barrido. Entre otros ejemplos de criterios indicativos de nefrotoxicidad se incluyen la pérdida de la expresión génica del marcador podocitario o la expresión de proteínas y la pérdida de procesos podocitarios (pérdida de borrado).

En otro ejemplo, la presente descripción abarca un método para seleccionar un compuesto candidato para determinar su eficacia terapéutica en el tratamiento de la enfermedad renal, donde el método comprende poner en contacto los organoides renales descritos en la presente memoria con un compuesto candidato en condiciones para determinar si el compuesto candidato es o no terapéuticamente eficaz. En este ejemplo, el método puede comprender poner en contacto los organoides renales descritos en la presente memoria con un compuesto candidato en presencia de un compuesto nefrotóxico y determinar si el compuesto candidato es o no terapéuticamente eficaz.

Otros ejemplos de detección de la eficacia terapéutica incluyen la evaluación de los organoides renales que son representativos de una enfermedad renal. Por ejemplo, la enfermedad renal se puede seleccionar del grupo que consiste en el síndrome nefrótico congénito (SNC), que incluye el síndrome nefrótico resistente a los esteroides y la nefropatía finlandesa, la glomerulonefritis segmentaria focal (FSGS), el síndrome de Alport y el síndrome de Pierson. En un ejemplo, la enfermedad renal es el SNC.

El término “eficacia terapéutica” se usa en el contexto de la presente descripción para referirse a una respuesta en la que cualquier efecto tóxico o perjudicial de un compuesto candidato o composición que lo comprende se supera, debido a los efectos terapéuticamente beneficiosos. La eficacia terapéutica se puede determinar basándose en la mejora de la función de las células renales; el mantenimiento de la función de las células renales; la inhibición (es decir, ralentizar en cierta medida y, en algunos ejemplos, detener) de la disminución de la función de las células renales; la inhibición (es decir, ralentizar en cierta medida y, en algunos ejemplos, detener) de la muerte de las células renales. En un ejemplo, la eficacia terapéutica se determina basándose en la presencia de proteínas podocitarias apropiadas y en la evidencia de que están polarizadas adecuadamente. Un ejemplo incluye la localización de NPHS1, NPHS2 y NEPH-1 en la membrana de los podocitos, en donde NPHS1, NPHS2 y NEPH-1 se determinan usando inmunohistoquímica.

Para los estudios que involucran organoides renales que son representativos de una enfermedad renal, la nefrotoxicidad y la eficacia terapéutica pueden determinarse en relación con un estándar predeterminado, determinado en base a la función celular renal correspondiente en un organoide renal libre de enfermedad. En otro ejemplo, la función mejorada de las células renales puede determinarse basándose en una comparación de la función de las células renales entre un organoide renal representativo de la enfermedad renal y un organoide renal representativo de un riñón sano.

Para los estudios que involucran poner en contacto los organoides renales con un compuesto nefrotóxico y un compuesto candidato, se puede determinar la mejora de la función de las células renales basándose en una comparación con los organoides renales que no están en contacto con el compuesto nefrotóxico y/u los organoides renales en contacto solo con el compuesto nefrotóxico.

El término “compuesto candidato” se usa en el contexto de la presente descripción para referirse a un agente que se va a analizar. Entre los compuestos candidatos se pueden incluir, por ejemplo, moléculas pequeñas, tales como compuestos orgánicos pequeños (por ejemplo, moléculas orgánicas que tienen un peso molecular entre aproximadamente 50 y aproximadamente 2500 Da), péptidos o miméticos de los mismos, ligandos que incluyen ligandos peptídicos y no peptídicos, polipéptidos, moléculas de ácido nucleico, tales como aptámeros, moléculas de ácido nucleico peptídicas y componentes, combinaciones y derivados de los mismos.

Se considera que términos tales como “contactar”, “exponer” o “aplicar” son términos que, en su contexto, pueden usarse indistintamente en la presente descripción. El término contactar requiere que el compuesto o compuestos candidatos se pongan en contacto con un glomérulo descrito en la presente memoria. En un ejemplo, el compuesto se puede disolver en medios de cultivo celular, si el compuesto es soluble en agua o inmiscible en agua. De lo contrario, un sustrato adecuado puede empaparse en el compuesto y colocarse sobre los organoides renales en cultivo. Para la selección de compuestos candidatos volátiles, los organoides renales descritos en la presente memoria pueden exponerse al aire u otras mezclas de gases que comprenden el compuesto o compuestos. Alternativamente, los organoides renales pueden exponerse a una solución o suspensión del compuesto volátil en medios de cultivo celular. De nuevo, si es posible, los compuestos volátiles pueden disolverse o estabilizarse. De lo contrario, un sustrato adecuado puede empaparse en el compuesto y colocarse sobre los organoides renales en cultivo.

Al realizar los métodos de la presente descripción, una pluralidad de compuestos candidatos pueden ponerse en contacto con organoides renales. Por ejemplo, al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14, al menos 15, al menos 16, al menos 17, al menos 18, al menos 19, al menos 20, al menos 25, al menos 30, al menos 35, al menos 40, al

menos 45, al menos 50, al menos 55, al menos 60, al menos 70, al menos 80, al menos 90, al menos 100, al menos 200, al menos 300, al menos 400, al menos 500, al menos 600, al menos 700, al menos 800, al menos 900, al menos 1000, al menos 2000, al menos 3000, al menos 5000, al menos 10 000, al menos 20 000, al menos 40 000, al menos 50 000, al menos 100 000, al menos 200 000 o más compuestos candidatos pueden ponerse en contacto con los organoides renales. En un ejemplo, los compuestos candidatos pueden ponerse en contacto con los mismos organoides renales o con organoides renales separados. Por ejemplo, pueden seleccionarse combinaciones específicas de compuestos candidatos.

En un ejemplo, los compuestos candidatos se marcan antes del cribado. En un ejemplo, el compuesto candidato puede ser una composición. Por ejemplo, el compuesto candidato puede estar presente en una formulación o comprender una mezcla de compuestos o moléculas. Por ejemplo, el compuesto candidato puede ser suero. Por ejemplo, el compuesto candidato puede ser suero aislado de un sujeto con enfermedad renal. En un ejemplo, el suero se aísla de un sujeto con SNC. Por ejemplo, el suero puede aislarse de un sujeto que tiene un síndrome nefrótico resistente a los esteroides. En otro ejemplo, el suero se aísla de un sujeto que se ha sometido a un trasplante de riñón. En otro ejemplo, el suero se aísla de un sujeto con síndrome nefrótico que se ha presentado después de un trasplante renal.

Entre las nefrotoxinas ilustrativas se incluyen antibióticos aminoglucósidos, antibióticos β -lactámicos, cisplatino, medios de radiocontraste, AINE, inhibidores de la ECA, litio, CsA y fármacos antiepilépticos tales como la fenitoína.

Los organoides renales cultivados durante varios períodos de tiempo pueden usarse en las aplicaciones de cribado descritas en la presente memoria. Por lo tanto, como ejemplo, se pueden usar organoides renales d7+15 o posteriores en el cribado. En otro ejemplo, se pueden usar organoides renales entre d7+18 y d7+25 en el cribado. En otro ejemplo, los organoides renales inmaduros se pueden usar en el cribado. Por ejemplo, se pueden usar entre d7+11 y d7+18 en el cribado. En varios ejemplos, las células MI pueden cultivarse durante más tiempo y, por lo tanto, los organoides renales d8+Y, d9+Y o d10+Y pueden usarse en el cribado.

En un ejemplo, el método de selección comprende poner en contacto los compuestos candidatos con una biblioteca de organoides renales. Por ejemplo, los compuestos candidatos pueden seleccionarse usando organoides renales en diferentes etapas de desarrollo. Por ejemplo, se pueden usar organoides renales d7+10, d7+15 y d7+25. En otro ejemplo, los compuestos candidatos pueden seleccionarse usando organoides renales representativos de diferentes enfermedades renales.

Como apreciará el experto en la materia, existe una amplia variedad de procedimientos de selección diferentes, que podrían adaptarse para seleccionar los compuestos candidatos. Por ejemplo, los organoides renales descritos en la presente memoria pueden proporcionarse en un formato de pocillo único o múltiple y ponerse en contacto con los compuestos candidatos durante un período de tiempo determinado. En un ejemplo, los organoides renales se proporcionan en una placa de múltiples pocillos. En un ejemplo, se proporciona un organoide renal por pocillo. En otro ejemplo, se proporcionan dos organoides renales por pocillo. En otro ejemplo, se proporcionan tres organoides renales por pocillo. En otro ejemplo, se proporcionan cuatro organoides renales por pocillo. En otro ejemplo, se proporcionan cinco organoides renales por pocillo. En otro ejemplo, se proporcionan 10 organoides renales por pocillo. En otro ejemplo, se proporcionan 20 o más organoides renales por pocillo. En un ejemplo, los organoides renales se proporcionan en una placa de 96 pocillos.

La presente descripción abarca los métodos de cribado de alto rendimiento. En este ejemplo, el cribado de alto rendimiento implica proporcionar una biblioteca que contenga una gran cantidad de compuestos candidatos. Dichas bibliotecas se analizan luego en uno o más ensayos, para identificar aquellos miembros de la biblioteca (por ejemplo, especies o subclases químicas particulares) que muestran un nivel deseado de actividad (por ejemplo, eficacia terapéutica).

Los sistemas de cribado de alto rendimiento están disponibles en el mercado y, por lo general, automatizan procedimientos completos, incluido todo el pipeteo de muestras y reactivos, la dispensación de líquidos, las incubaciones cronometradas y las lecturas finales de una placa de cultivo (por ejemplo, formatos de 96 pocillos) en los detectores apropiados para el ensayo. Estos sistemas configurables proporcionan una puesta en marcha rápida, así como un alto grado de flexibilidad y personalización. Los fabricantes de dichos sistemas (por ejemplo, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, etc.) proporcionan protocolos detallados de uso.

En un ejemplo, los métodos mencionados anteriormente comprenden además seleccionar un compuesto que muestre eficacia terapéutica. Por ejemplo, compuestos que, en presencia de una nefrotoxina y/o cuando se ponen en contacto con organoides renales representativos de la enfermedad renal, mantienen la función de las células renales; inhiben (es decir, ralentizan en cierta medida y, en algunos ejemplos, detienen) la disminución de la función de las células renales; inhiben (es decir, ralentizan hasta cierto punto y, en algunos ejemplos, detienen) la muerte de las células renales. En otro ejemplo, los métodos mencionados anteriormente comprenden además seleccionar un compuesto que reduzca la nefrotoxicidad. Por ejemplo, se pueden seleccionar compuestos que inhiben la glomerulonefritis. En otro ejemplo, se pueden seleccionar compuestos que mejoran la función de las células renales. En estos ejemplos, la función de las células renales puede determinarse basándose en la expresión de biomarcadores utilizando

herramientas disponibles en el mercado que incluyen, por ejemplo, la matriz de PCR RT² Profiler™ de nefrotoxicidad humana de Qiagen o el ensayo de alto contenido (HCA).

Medicina personalizada y estratificación

Es más probable que un compuesto candidato que muestre eficacia terapéutica en organoides renales representativos de la enfermedad renal en un sujeto muestre eficacia terapéutica en el sujeto. En consecuencia, en un ejemplo, estos organoides renales pueden usarse para seleccionar agentes que tengan más probabilidades de afectar al tratamiento o la profilaxis de la enfermedad renal en el sujeto.

En otro ejemplo, se pueden preparar organoides renales representativos de una enfermedad renal en múltiples sujetos. Estos organoides renales se pueden usar para seleccionar agentes que tienen más probabilidades de afectar al tratamiento o la profilaxis de la enfermedad renal en múltiples sujetos o para identificar grupos de sujetos que tienen más probabilidades de responder al tratamiento con un agente en particular. Dichos métodos pueden ser útiles para estratificar a los sujetos en ensayos clínicos de agentes que se están probando para determinar su capacidad para tratar la enfermedad renal. La agrupación de las poblaciones de sujetos en función de la detección de organoides renales puede eliminar o reducir la variación en el resultado del tratamiento debido a factores genéticos, lo que lleva a una evaluación más precisa de la eficacia de un posible fármaco. En consecuencia, en un ejemplo, la presente descripción abarca un método para estratificar un grupo de sujetos para un ensayo clínico de un agente terapéutico, donde el método comprende obtener una población de células iPS de un grupo de sujetos, generar un organoide renal o una población del mismo a partir de la población de células iPS de cada sujeto, poner en contacto los organoides renales con un agente terapéutico, determinar si el agente terapéutico es terapéuticamente eficaz y utilizar los resultados de la determinación para seleccionar los sujetos con más probabilidades de responder a la terapia. En este ejemplo, el método puede comprender poner en contacto los organoides renales con un agente terapéutico y una nefrotoxina antes de determinar si el agente terapéutico es terapéuticamente eficaz. Entre los ejemplos de agentes terapéuticos se incluyen los compuestos candidatos descritos anteriormente, tales como, por ejemplo, una o más moléculas pequeñas, polinucleótidos, péptidos, proteínas, anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, virus, bacterias, células madre, suero, incluido el suero obtenido de pacientes con enfermedad renal. Para evitar dudas, el suero puede aislarse de un sujeto con una enfermedad renal particular y ponerse en contacto con los organoides renales descritos en la presente memoria. En la presente memoria se describen varios ejemplos de enfermedad renal y se puede aislar el suero de varios sujetos representativos de estas enfermedades. Los métodos para aislar el suero de los sujetos son conocidos en la técnica. En un ejemplo, el suero se purifica a partir de una muestra de sangre completa mediante centrifugación.

Bioimpresión

En un ejemplo, la presente descripción abarca estructuras renales “bioimpresas”, tales como riñones u otros órganos que contienen nefronas, organoides o estructuras similares a órganos producidas usando las composiciones o células descritas en la presente memoria. Términos tales como “bioimpreso” o “bioimpresión” se usan en el contexto de la presente descripción para referirse a un proceso que utiliza la deposición tridimensional y precisa la deposición de las células (por ejemplo, soluciones celulares, geles que contienen células, suspensiones celulares, concentraciones celulares, agregados multicelulares, cuerpos multicelulares, tinta biológica, etc.) mediante una metodología que es compatible con un dispositivo de creación de prototipos tridimensional automatizado asistido por ordenador (por ejemplo, una bioimpresora). Los ejemplos de métodos adecuados para la bioimpresión se describen en los documentos WO 2012/054195 y WO 2013/040087. En un ejemplo, la bioimpresión se realiza usando una máquina de impresión de órganos, que usa una estructura de hidrogel para colocar las células humanas en una orientación deseada para recrear órganos humanos (por ejemplo, Organovo/Invetech).

En un ejemplo, las estructuras renales se bioimprimen a partir de tinta biológica. El término “tinta biológica” se usa en el contexto de la presente descripción para referirse a una composición líquida, semisólida o sólida, que comprende las composiciones o células definidas en la presente memoria. En un ejemplo, la tinta biológica comprende soluciones celulares, agregados celulares, geles que comprenden células, cuerpos multicelulares o tejidos. En otro ejemplo, la tinta biológica comprende además material de soporte.

Las estructuras renales bioimpresas que se abarcan en la presente descripción tienen una o más características funcionales de un riñón o un componente del mismo, o son capaces de desarrollar una o más características funcionales de un riñón o un componente del mismo. Por ejemplo, una estructura renal bioimpresa puede comprender glomérulo, aparato yuxttaglomerular, tejido intersticial, conducto colector, cápsula de Bowman y túbulos contorneados proximales y/o distales. En un ejemplo, la estructura renal bioimpresa no está vascularizada. En otro ejemplo, la estructura renal bioimpresa comprende una vasculatura tal como arteriolas, arterias, venas y/o capilares.

En un ejemplo, la estructura renal bioimpresa es implantable o transferible adoptivamente de otro modo a un huésped.

Composiciones/Kits

En un ejemplo, la presente descripción se refiere a un kit o ensayo para su uso en aplicaciones de detección. Por ejemplo, la presente descripción abarca un kit o ensayo para su uso en la selección de compuestos candidatos para determinar su nefrotoxicidad y/o eficacia terapéutica. En un ejemplo, los organoides renales descritos en la presente memoria se proporcionan en cultivo, los compuestos candidatos pueden luego ponerse en contacto con los organoides renales y analizarse para determinar su nefrotoxicidad y/o eficacia terapéutica. En consecuencia, en un ejemplo, la presente descripción abarca un ensayo, cuando se usa para el cribado, donde el ensayo comprende los organoides renales descritos en la presente memoria en cultivo. En un ejemplo, el ensayo se usa para la detección de nefrotoxicidad. En un ejemplo, el ensayo se usa para la selección de eficacia terapéutica. En un ejemplo, los organoides renales se proporcionan con medios de cultivo u otros componentes para mantener los organoides renales en cultivo. En un ejemplo, los organoides renales se proporcionan con instrucciones escritas para llevar a cabo los métodos de la presente descripción. En un ejemplo, el ensayo comprende un organoide renal descrito en la presente memoria. En otros ejemplos, el ensayo comprende más de un organoide renal. Por ejemplo, el ensayo puede comprender 10, 20, 30 o más organoides renales. Los organoides renales se pueden proporcionar en un formato de uno o múltiples pocillos, tal como una placa de 96 pocillos.

Ejemplos

Ejemplo 1: Cultivo y mantenimiento de hPSC

Las células ES humanas (células H9) se cultivaron en alimentadores de fibroblastos embrionarios de ratón (MEF) en un medio DMEM complementado con un 10 % de KOSR (Life technologies) y bFGF. Las células se cultivaron hasta una confluencia del 80 % antes de dividirse usando TrypLE (Life technologies). Antes de la diferenciación, las células ES se adaptaron a la superficie del matrigel (Corning) en ausencia de alimentadores de MEF en un medio condicional de MEF y bFGF.

Las células IPS humanas se cultivaron como colonias individuales en placas recubiertas con geltrex (Life technologies) en un medio E8 (Life technologies). El paso de las células IPS se realizó una vez con EDTA, una vez que las células alcanzaron una confluencia del 60-70 % o cada 3 días.

La disociación de las hPSC en células individuales se logró usando TrypLE y las células se sembraron en una placa recubierta con matrigel a 15 000 células/cm². El número de células se determinó usando un hemocitómetro. Las células hES adaptadas a Matrigel se sembraron usando medios condicionales MEF. Las células IPS humanas se sembraron como células individuales en medio E8 usando células Revita (dilución 1: 100) en una placa recubierta con matrigel durante la noche.

Ejemplo 2: Producción de MI mejoradas

Las hPSC o hES se diferenciaron en mesodermos intermedios exponiendo las células a una alta concentración de CHIR (7 μ M) durante los primeros 4 días en medios APEL2 o TeSR-E6 (Stem cell technologies) con medios de hibridoma sin proteínas (PFHM) (Thermo Fischer) al 3,5 %, APEL (Stem cell technologies) o E6 (Stem cell technologies). Los medios se renovaron el día 2. Los cultivos se sometieron a 3 días adicionales (días 5 a 7 desde la siembra) de una concentración baja de CHIR (1 μ M), además de FGF9 y heparina (Figura 1A, Ejemplos 1-3). Esto da como resultado la inducción de una mezcla de células intermedias del mesodermo (MI).

Los perfiles de expresión génica realizados mediante qPCR en los cultivos en suspensión en vórtice a D7+0 mostraron que la adición de una concentración baja y una exposición más prolongada al CHIR dio como resultado un aumento del número de células del mesénquima superior en comparación con una exposición más corta (Figura 1E, panel izquierdo). La expresión de las células PAX2, LHX1 y OSR1 fue más de 2 veces mayor en comparación con los grupos de exposición corta a CHIR (Figura 1E, panel izquierdo). La exposición de las células a una concentración baja de CHIR también resultó en un aumento del epitelio ureteral, ilustrado por un aumento de más de 2 veces en la expresión de Wnt1 y GATA3 en comparación con los grupos de exposición corta al CHIR (Figura 1E, panel derecho). La adición de una concentración baja de CHIR para activar la señalización de Wnt/ β -catenina durante más tiempo demuestra un método para producir un mesodermo intermedio mejorado.

Ejemplo 3: Cultivos en suspensión en vórtice

El día 7, las células MI producidas usando los métodos del ejemplo 2 se disociaron usando 1 ml de solución de EDTA, se incubaron adicionalmente en 1 ml de EDTA durante 3 minutos a 37 °C y la solución de EDTA se retiró por aspiración sin alterar la capa de células MI (Figura 1A). Las células MI también se pueden disociar usando 1,5 ml de TrypLE™ select durante 3 minutos a 37 °C y el exceso de TrypLE™ se retiró mediante centrifugación a 1500 RPM en un tubo Falcon de 15 ml.

Se añadieron medios de fase 1 (medio base, FGF9 200 ng/ml, heparina 1 μ g/ml, 1 μ M de CHIR, 0,1 % de PVA, 0,1 % de MC) (2 ml) junto con 10 μ M de inhibidor de la quinasa Rho (ROCKi, dilución 1: 1000 10 μ M, stem cell technologies) y las células se separaron suavemente en grumos usando una pipeta Gilson. La suspensión celular se transfirió a placas de baja adhesión de 6 cm² (Greiner bio) y se pasó a través de filtros celulares de 40 μ m (BD biosciences).

El medio de la fase 1 se cubrió hasta 5 ml y las placas se agitaron en un agitador orbital Ratek a 60 rpm en una incubadora de cultivo celular estándar a 37 °C y un 5 % de CO₂. Se formaron espontáneamente los organoides de 20 a 40 µm de diámetro después de colocar las placas de cultivo en un agitador orbital en las 24 horas siguientes. Los medios de la fase 1 se sustituyeron por los medios de la fase 2 (medio base, FGF9 200 ng/ml, heparina 1 µg/ml, 1 µM de CHIR, 0,1 % de PVA, 0,1 % de MC) después de 24 horas en cultivo en vórtice. Las células se cultivaron en medios de fase 2 durante otros 4 días. A partir del día 7+5, todos los organoides se renovaron con medios de fase 3 (medio base, 0,1 % de PVA, 0,1 % de MC) en días alternos y se cultivaron hasta el día 7+18.

Después de 18 días después de la agregación (día 7+18), cada organoide renal mostró estructuras epiteliales tubulares, como lo confirmó la tinción de Schiff (PAS) con ácido peryódico de campo claro y el análisis microscópico confocal confirmó la presencia de 6 a 10 nefronas (Figura 1 y Figura 2). Estas nefronas mostraron evidencia de patrones y segmentación tempranos. La formación de glomérulos fue evidente a partir de la tinción positiva para NPHS1 y MAFB. Los segmentos de nefrona proximales eran EpCAM⁺ y se tiñeron de forma positiva para LTL, CUBN, LRP2 y HNF4A (Figura 1G). Los segmentos LTL⁺ pudieron endocitosar la albúmina FITC dentro de las 24 horas posteriores a la adición al medio de cultivo, lo que indica una vía de absorción de albúmina funcional. Los segmentos de la nefrona distal se tiñeron con ECAD y EpCAM, mientras que el presunto conducto colector era ECAD⁺/GATA3⁺. También se observó la presencia de células endoteliales (PECAM1⁺/SOX17⁺), cuando se generaron organoides renales utilizando una línea celular indicadora *SOX17mCherry* (Ng y col., 2016) (Figura 1D; Figura 2C, D y E). Como indicación de la transferibilidad del protocolo entre líneas de células madre pluripotentes humanas, se proporcionan datos sobre la generación exitosa de organoides renales a partir de 4 líneas celulares diferentes, incluidas las líneas indicadoras de hESC (H9 *GAPTrapLuc2*, *hES3-SOX17mCherry*) (Kao y col., 2016; Ng y col., 2016; van den Berg y col., 2018) e iPSC humanas (CRL1502.C32, CRL1502.3) (Briggs y col., 2013; Takasato y col., 2015). Todas las líneas de hPSC respondieron uniformemente al protocolo y tuvieron un patrón similar al de los organoides renales (Figura 2B).

Ejemplo 4: Efecto de la duración, la concentración y el momento de la señalización canónica de Wnt en patrones de organoides renales

Para optimizar la diferenciación dentro del protocolo de organoides renales, se estimularon las monocapas de hPSC utilizando una concentración fija de CHIR99021 (7 µM) durante diferentes duraciones (3, 4, 5 y 6 días), antes de continuar el cultivo hasta el día 7 en presencia de heparina con bajo contenido en CHIR y FGF9+ (Figuras 2C, 2D y 2E). Después de 18 días, se evaluó la estructura renal de los organoides renales resultantes mediante microscopía confocal (Figuras 2C, 2D y 2E). La activación canónica de Wnt durante solo 3 días no logró generar una morfología renal (Figura 2B, panel izquierdo). En cambio, las estructuras epiteliales presentes mostraron un epitelio indefinido con un gran lumen quístico y sin evidencia de formación de nefronas. La inducción inicial con 4 o 5 días de CHIR99021 7 µM generó organoides renales que contenían nefronas modeladas, incluida la presencia de poblaciones circundantes de SOX17⁺ y MEIS1/2/3⁺, que sugerían la presencia de células del endotelio y del estroma intersticial, respectivamente (Figuras 2C, 2D y 2E, panel central). Sin embargo, la activación de Wnt durante 6 días, si bien generaba organoides renales más grandes con una mayor tinción de NPHS1, contenía una población estromal de MEIS1⁺ expandida, que aparentemente comprometía la estructura epitelial (Figuras 2C, 2D y 2E, panel derecho). Se confirmó que la inducción inicial de CHIR99021 7 µM durante 4 días era óptima y se utilizó en estudios posteriores.

Ejemplo 5: Disociación de organoides renales

Los organoides renales representan una estructura epitelial heterogénea de aproximadamente 250-300 µm de diámetro. El uso de enzimas agresivas puede destruir los marcadores de la superficie celular y provocar la pérdida de la identidad celular para su uso posterior. Se realizó una disociación leve con una proteasa activa en frío (LiberaseTM, Roche) para producir el máximo de células individuales viables. Los organoides renales se transfirieron a un tubo Falcon de 15 ml utilizando una pipeta serológica de 5 ml y se dejaron reposar. El sobrenadante del medio se retiró usando vacío, después el sedimento organoide se lavó tres veces usando PBS 0,1 M. Los organoides se trataron luego con 500 µl de una solución de LiberaseTM de 1 µg/ml y se incubaron a 4 °C durante 20 minutos con trituración continua cada 5 minutos. Después de 20 minutos, los organoides renales se disociaron en células individuales y se lavaron dos veces usando medio DMEM con FCS al 10 % para inactivar LiberaseTM y el sedimento celular final se suspendió en medio DMEM con FCS al 10 %.

Ejemplo 6: La agitación vorticial de células del mesodermo intermedio genera microorganoides renales en cultivo en suspensión

Los métodos existentes para generar organoides renales son laboriosos, caros y producen organoides de baja calidad. Los inventores han generado un método económico, sencillo y rápido para generar organoides renales en cultivo en suspensión. A diferencia de los métodos anteriores, los agregados celulares se forman en la etapa de diferenciación del mesodermo intermedio (MI) (día 7), como resultado de una disociación mínima y una agitación en vórtice a baja velocidad de las monocapas antes del cultivo en placas de cultivo de baja adhesión. Esto da como resultado la formación de entre 8000-10 000 organoides renales, que son mucho más pequeños que los producidos con los métodos anteriores. Tras 18 días de cultivo en suspensión, cada organoide renal comprende alrededor de 6-10

nefronas, con evidencia de un patrón y una segmentación tempranos, incluida la formación de epitelio proximal y distal y glomérulos que contienen podocitos. Es importante destacar que el perfil transcripcional de una sola célula ha revelado la equivalencia entre estos organoides más pequeños y los organoides estándar producidos utilizando métodos anteriores con respecto a la diversidad y madurez celular. El uso de esta estrategia para la diferenciación dirigida dio como resultado una expansión celular de 30-40 veces a lo largo de 21 días de cultivo, lo que representa una mejora de 3 a 4 veces en el rendimiento y una reducción de 4 veces en el coste por millón de células renales obtenidas de organoides en comparación con las estrategias anteriores, como las basadas en Takasato y col. (2015) *Nature*, vol. 526: 564-568.

El método descrito ilustrado en la Figura 1A y descrito en los ejemplos 1-3 implica la adición de alcohol polivinílico (PVA) al 0,1 % y metilcelulosa (MC) al 0,1 % al medio de cultivo del cultivo en vórtice, para mejorar las fuerzas de cohesión de las células del mesodermo intermedio (MI) para agregarse espontáneamente en organoides esféricos 3D. Tras 24 horas de cultivo en vórtice, los organoides formaron una membrana basal externa de laminina.

Los organoides C32 cultivados durante 12 a 18 días adicionales se recolectaron, se montaron enteros y se tiñeron para detectar NPHS, LTL, ECAD y GATA3 para su análisis microscópico confocal. Para evaluar la presencia de vasculatura, los organoides se tiñeron con anti-CD31 humano de ratón (1: 300, BD Biosciences), para el túbulo proximal maduro se utilizó anti-CUBN humano de cabra. El análisis de tinción por inmunofluorescencia de los organoides en D7+12 mostró la principal segmentación de las nefronas en forma de una expresión distinta de los glomérulos positivos a la nefrina, el túbulo proximal positivo al LTL, los túbulos distales positivos al ECAD y las células del conducto colector doble positivas al ECAD y GATA3, incluidas las células estromales positivas al GATA3 (Figuras 1G y 4E y F), que era comparable al sistema de organoides Transwell (Figura 4A). Los microorganoides renales vorticiales muestran una morfología simple en comparación con el organoide Transwell con respecto al número de nefronas (de 5 a 10 nefronas en cada organoide) y la presencia de tipos de células no renales.

En conjunto, los resultados demuestran un método de suspensión en vórtice, que genera organoides que están organizados y tienen la capacidad de producir organoides renales multicelulares complejos con todos los segmentos de las nefronas. El método se ha probado con éxito con líneas celulares ES humanas e iPS donde se producían organoides. Se ha demostrado que diferentes condiciones de los medios basales, tales como APEL, APEL 2 y E6 son adecuadas para el método descrito. Como tal, el método es potencialmente útil para aumentar el cultivo de células renales con fines de medicina personalizada, detección de fármacos y terapia celular regenerativa.

Ejemplo 7: Microorganoides renales en cultivo en suspensión adecuados para el aumento de células renales obtenidas de iPS

Para evaluar el cultivo en suspensión a mayor escala, se diferenciaron las células iPS C32 para generar MI como se describe en los ejemplos 1 y 2. El crecimiento de los organoides se monitorizó midiendo el tamaño y el número total de células en cultivo a partir de D7+0 (Figuras 4C y 4D).

Las imágenes de campo brillante del organoide C32 generadas mediante un cultivo en suspensión en vórtice mostraron un aumento de tamaño y mantuvieron las estructuras epiteliales (Figuras 4A y 4B). El tamaño de los organoides se midió en imágenes de campo claro de hasta 10 organoides muestreados al azar en el *software* de microscopía NIS-Elements (Nikon). Se tomaron muestras aleatorias de hasta 10 organoides a diferentes intervalos de velocidad de crecimiento y se midieron los diámetros de los organoides. Se informó que el tamaño era de rango bajo a alto. Se observó un aumento constante en el tamaño de los organoides a medida que pasaba el tiempo y se detectaron organoides de 30 µm a 300 µm de diámetro (Figura 4C). El número total de células se evaluó después de la disociación con TrypLE™ select y se contó manualmente usando un hemocitómetro. Se observó un aumento de 40 veces en el número de células de D7+12 a D7+18 en comparación con la densidad de siembra en D7+0 (Figura 4D).

Ejemplo 8: Los microorganoides de riñón en cultivo en suspensión muestran segmentos de nefrona organizados y un lumen tubular transparente

Los organoides Transwell clásicos presentan una morfología compleja, que limita la capacidad de estudiar la estructura 3D de las nefronas individuales. Los microorganoides renales vorticiales producidos mediante el método descrito en la presente memoria son mucho más simples y contienen un menor número de nefronas.

Los organoides presentan una morfología 3D clara, que permite el estudio de las nefronas en el espacio 3D. Los organoides renales obtenidos del C32 se generaron usando el método descrito en los ejemplos 1-3 y la inmunotinción se realizó usando anticuerpos contra NPHS 1, LTL, ECAD y GATA3 para visualizar los segmentos de nefrona en un microscopio confocal de alto rendimiento, con una resolución Z que coincidía con la del orificio.

Los organoides renales se recogieron en un tubo de Falcon de 15 ml y se lavaron con PBS (dos veces) para eliminar el exceso de medio y se fijaron en PFA al 2 % recién preparado durante 20 minutos a 4 °C. El exceso de PFA se retiró luego lavando los organoides tres veces con PBS con TritonX100 (PBST) al 0,3 % y se almacenó en PBST a 4 °C hasta la tinción. Los organoides fijos se bloquearon en PBST con suero de burro al 10 % (tampón de bloqueo) durante al menos 1 hora antes de la incubación con anticuerpos primarios diluidos en tampón de bloqueo. La evaluación de la

capacidad de diferenciación de los organoides renales se confirmó mediante la tinción de los principales segmentos de las nefronas. Los anticuerpos principales utilizados fueron: anti-NPHS1 humano de oveja (1: 300 R&D Systems), anti-LTL humano de biotina (1: 300 Vector Laboratories), anti-ECAD humano de ratón (1: 300 Life technologies) y anti-GATA3 humano de conejo (1: 300 Cell signalling technologies), anti-CD31 humano de ratón (1: 300, BD biosciences) y anti-CUBN humano de cabra (1: 300 Santa Cruz y LRP2 (1: 300 Sapphire Bioscience). Los organoides se incubaron en el anticuerpo primario durante la noche a 4 °C, luego se lavaron 5 veces en PBST y luego se incubaron con anticuerpos secundarios de la misma especie con etiquetas fluorescentes. Tras la tinción, los organoides se deshidrataron utilizando diferentes concentraciones de metanol y, a continuación, se eliminaron con BABB (alcohol bencílico y benzoato de bencilo, proporción 1: 2), tal como lo describieron anteriormente Dodt HU y col. (Dodt y col., 2007). Los organoides limpios se montaron en una placa con fondo de vidrio MatTek y se realizó una microscopía confocal utilizando un microscopio Zeiss LSM 780 invertido. Las imágenes se analizaron utilizando el software ZEN (Zeiss).

Las imágenes se analizaron utilizando el *software* Imaris para reconstruir la representación 3D de la imagen confocal adquirida (Figura 4E y 4F). Las imágenes en 3D mostraron segmentos de nefrona claros conectados entre sí de manera polarizada a partir de los glomérulos (NPHS1), el túbulo proximal (LTL+), los túbulos distales (ECAD+), el conducto colector (ECAD+, GATA3+) y las células intersticiales (GATA3+) (Figura 5E). El uso de herramientas de corte permitió la visualización del lumen formado en las células tubulares (Figura 5F). Los resultados de las Figuras 5E y 5F demuestran que el método vorticial descrito en la presente memoria es útil para permitir el estudio de la morfología de los organoides renales en desarrollo en un espacio 3D.

Ejemplo 9: El análisis de secuenciación de ARN unicelular muestra un fenotipo renal prometedor

Para caracterizar aún más ampliamente los organoides renales en vórtice, se realizó un análisis de secuenciación del ARN unicelular de los microorganoides renales obtenidos del C32 en D7+18. Se cultivaron aproximadamente 40-50 microorganoides renales y 1 organoide estándar completo hasta el día 7+18 usando la misma línea de hPSC (CRL1502.C32 en medio APEL). Los organoides se recogieron y se lavaron 3 veces con PBS para eliminar el exceso de medio. Los organoides se trataron con 400 µl de una solución de 1 µg/ml de Liberase™ (Roche) a 4 °C durante 20 minutos mediante agitación usando una pipeta de 1 ml cada 5 minutos. En los 20 minutos posteriores, los organoides se disociaron en células individuales. Se añadió medio de cultivo celular (2 ml) al Liberase™ inactivo. Las células se centrifugaron a 1300-1500 rpm durante 3-5 minutos para formar un sedimento. Se retiró el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en medio DMEM F12 fresco y se pasó a través de filtros celulares de 20 µm para eliminar los grumos y se almacenó en hielo hasta su análisis. La viabilidad y el número de células se analizaron mediante FACS y una prueba de exclusión de colorante azul tripano en un contador celular automatizado (Life Technologies). Las células se almacenaron en hielo hasta el análisis. Las células se mezclaron minuciosamente usando una punta de pipeta de 1 ml de diámetro ancho y se usaron aproximadamente 4000 células vivas para el análisis de secuenciación del ARN. Se usó una solución 3' de cromo unicelular desarrollada mediante la técnica genómica 10X. La preparación de la muestra se realizó según el protocolo unicelular 10x Genomics (hay más información disponible en la guía del usuario de Chromium Single Cell 3' Reagent Kits v2, accesible en línea). La suspensión unicelular, las perlas de gel y el aceite de partición se cargarán en el pocillo apropiado del chip de cromo 10x. El chip se fijará con una junta 10x y el conjunto completo se cargará en el controlador de cromo 10x. Esto generará automáticamente la suspensión de una sola célula recubierta con gotitas de aceite que contienen UMI únicos para cada célula. Esta suspensión se utilizará para la RT-PCT convencional para amplificar las transcripciones.

Las células se codificaron con barras para indexar por separado el transcriptoma de cada célula utilizando perlas de gel en emulsiones (GEM) y UMI a escala de nanolitros. Las perlas magnéticas se utilizan para eliminar los reactivos e cebadores sobrantes después de los códigos de barras. Se usó ADNc con código de barras de longitud completa para amplificar por PCR el transcriptoma para generar masa suficiente para la construcción de la biblioteca. Estas bibliotecas se secuenciaron simultáneamente para los fragmentos de UMI y ADNc en 2 lecturas diferentes. El análisis de la biblioteca se realizó utilizando Cell Ranger™, lo que permitió el estudio de los datos de expresión con una resolución de una sola célula. El proceso Cell Ranger (v1.3.1) se utilizó para realizar la demultiplexación de muestras, el procesamiento de códigos de barras y el recuento de genes unicelulares (Zheng y col., 2017). Las muestras se demultiplexaron para producir un par de archivos FASTQ para cada muestra. Las lecturas que contenían información de secuencia se alinearon con el genoma de referencia de GRCh38. Los códigos de barras celulares se filtraron para eliminar las gotitas vacías y los duplicados de PCR se eliminaron seleccionando combinaciones únicas de códigos de barras celulares, UMI e ID de genes, donde resultado final es una matriz de expresión génica, que se utilizó para un análisis posterior, lo que permite el estudio de los datos de expresión con una resolución de una sola célula. Se realizaron análisis adicionales para representar la agrupación celular, la clasificación del tipo de célula y la expresión génica diferencial utilizando el paquete Seurat R (versión 2.3.1).

Las matrices de expresión génica generadas en Cell Ranger se importaron a Seurat (Satija y col., 2015) para el control de calidad y su posterior análisis. Todas las células pasaron el filtrado inicial para eliminar los genes expresados en menos de 3 células y las células con menos de 200 genes expresados. El filtrado adicional eliminó 1 célula con más del 15 % de transcripciones mitocondriales. La función ciclónica en Scran (Lun y col., 2016; Scialdone y col., 2015) se utilizó para asignar una puntuación relacionada con la probabilidad de que cada célula esté en la fase G1, S o G2M, y una fase del ciclo celular asignada en función de esta puntuación.

Los datos de expresión se normalizaron y escalaron, y la variabilidad relacionada con el número de UMI, el porcentaje de expresión mitocondrial, el porcentaje de expresión ribosómica y la puntuación G2M se ajustaron mediante la función ScaleData de Seurat. Las células se agruparon utilizando el algoritmo de agrupamiento compartido basado en la optimización de la modularidad del vecino más cercano implementado en Seurat utilizando los 15 primeros componentes principales y un valor de resolución de 1,2. Las listas de genes marcadores se generaron utilizando la función FindAllMarkers de Seurat para encontrar genes expresados diferencialmente entre grupos, con un nivel de cambio logarítmico superior a 0,25.

Para el análisis combinado de conjuntos de datos de organoides estándar y renales, se generaron matrices de células genéticas en Cell Ranger como se ha indicado anteriormente. Todas las células pasaron el filtrado inicial para detectar los genes expresados en menos de 3 células y las células con menos de 200 genes. Cada conjunto de datos se normalizó y escaló con regresión en función del número de UMI, el porcentaje de expresión mitocondrial, el porcentaje de expresión ribosómica y la puntuación S, G1 y G2M generada en Scraper. La agrupación se basó en componentes combinados alineados calculados en Seurat mediante las funciones RunCCA y AlignSubspace (Butler y col., 2018). Para el conjunto de datos combinado, la agrupación se realizó con una resolución de 0,6. (Butler y col., 2018).

Se analizaron los perfiles de expresión génica de ARN unicelular de los organoides producidos mediante el método descrito en la presente memoria y el método clásico de Transwell. Los recuentos de UMI se representaron gráficamente como gráficos de tSNE y se realizó una agrupación automática (Figura 6A-6B) en función de los genes presentes dentro de las células. El análisis de enriquecimiento con GO de todos los grupos mostró un 22,3 % de nefronas, un 37,5 % de estroma total y un 9,8 % de vasculatura (Figura 6A), mientras que los microorganoides renales en vórtice mostraron un 32,5 % de nefrona madura (excluyendo los progenitores de nefronas y el mesénquima superior) y un 25,9 % de estroma, sin embargo, los organoides C32 en vórtice no mostraron la presencia de vasculatura (Figura 6B). Por lo tanto, los microorganoides del riñón en vórtice mostraron mejores marcadores del desarrollo renal en comparación con los organoides Transwell. Los microorganoides renales también mostraron una composición de nefronas mejorada en comparación con los organoides cultivados en Transwell (Figura 4).

Ejemplo 10: Validación transcripcional de la diferenciación renal dentro de los organoides renales

La caracterización de los tipos de células presentes en los organoides renales se realizó mediante la secuenciación de ARN de una sola célula (scRNA-seq). Se disoció un conjunto de 20-30 organoides renales en células individuales viables utilizando la proteasa Liberase™ activa en frío. Esto dio como resultado la generación de un 89,4 % de células individuales, de las cuales el 88,5 % estaban vivas (datos no mostrados). Se utilizó Cell Ranger (10x Genomics) para generar una matriz de recuentos de UMI por célula, que se importó para su posterior análisis utilizando el paquete Seurat R (versión 2.3.1) (Satija y col., 2015). Los datos filtrados representaron 1673 células con una mediana de 3759 genes expresados por célula. La agrupación utilizando el paquete Seurat R produjo 7 grupos de células distintos (Figura 3A y 3B, Tabla 1) con una resolución de 0,6. Se realizaron pruebas de expresión diferencial para identificar los marcadores de cada grupo y, para los principales genes con una regulación positiva significativa en cada grupo, se realizó un análisis de enriquecimiento funcional y de ontología genética utilizando el paquete de ontología génica PANTHER (Mi y col., 2013; Tabla 1).

Tabla 1: Términos de ontología genética para diferentes grupos con microorganoides en el riñón.

Grupo	Proceso biológico de GO completado	Término de GO	Nivel de enriquecimiento	FDR
0	Especificación de patrones involucrada en el desarrollo de pronefros	GO: 0039017	> 100	0,01
	Especificación de campo pronefrico	GO: 0039003	> 100	0,01
	Regulación negativa del proceso apoptótico de las células mesenquimales involucrado en la morfogénesis de la nefrona metanefrica	GO: 0072305	> 100	0,01
1	Formación de capilares glomerulares metanefricos	GO: 0072277	80,16	3.36E-02
	Morfogénesis de la vasculatura del glomérulo metanefrico	GO: 0072276	80,16	3.35E-02
	Morfogénesis del glomérulo metanefrico	GO: 0072275	80,16	3.34E-02
2	Regulación de la respuesta celular a los rayos X	GO: 2000683	> 100	5.35E-03
	Morfogénesis del tracto digestivo endodérmico	GO: 0061031	> 100	7.99E-03
	Regulación positiva de la formación de yemas ureterales	GO: 0072107	> 100	1.14E-02

Grupo	Proceso biológico de GO completado	Término de GO	Nivel de enriquecimiento	FDR
3	Especificación de patrones involucrada en el desarrollo de pronefros	GO: 0039017	99,73	1,80E-02
	Especificación de campo pronefrico	GO: 0039003	99,73	1,80E-02
	Regulación negativa del proceso apoptótico de las células mesenquimales involucrado en la morfogénesis de la nefrona metanefrica	GO: 0072305	99,73	1,80E-02
4	Regulación positiva del proceso apoptótico de las células mesenquimales regulación negativa del desarrollo de la unión neuromuscular	GO: 2001055	96,97	3,43E-02
		GO: 1904397	96,97	3,41E-02
	Morfogénesis del tracto corticoespinal	GO: 0021957	48,48	6,53E-03
5	Regulación de la organización de la membrana presináptica	GO: 1901629	> 100	2,85E-02
	Regulación negativa del proceso apoptótico de las células mesenquimales involucrado en la morfogénesis de las nefronas	GO: 0072040	85,31	2,71E-03
	Regulación del proceso apoptótico de las células mesenquimales involucrado en la morfogénesis de las nefronas	GO: 0072039	85,31	2,69E-03
6	Vía de señalización de la neuropilina	GO: 0038189	32,61	1,48E-02
	Formación de capilares glomerulares	GO: 0072104	26,09	2,17E-02
	Morfogénesis de la vasculatura del glomérulo	GO: 0072103	26,09	2,16E-02

Si bien es claramente evidente al utilizar la inmunofluorescencia de organoides de montura completa, el endotelio (un subconjunto del grupo 1) y los podocitos (Grupo 6, 18 células) estuvieron representados solo por un pequeño número de células individuales en los datos de scRNA-seq. El grupo 3 (293 células) y el grupo 5 (122 células) mostraron la expresión de genes consistentes con el epitelio de la nefrona renal, y el grupo 0 mostró la expresión de genes de la vesícula renal/cuerpo en forma de S (nefrona temprana), mientras que el grupo 5 de células epiteliales también mostró la expresión de marcadores del túbulo distal/conducto colector, tales como el *GFRA1* (Figura 3C). El grupo 2 mostró la expresión de los marcadores progenitores de las nefronas *SIX1*, *SIX2* y *CITED1*, así como del marcador estromal *PAX3*, que anteriormente se había asociado a tumores de Wilms miogénicos (Hueber y col., 2009). Las células del grupo 2 también expresan marcadores del destino miogénico, tales como *MYF5* y *MYF6*, pero no *PAX7*, *MYOD1* y *TBX6*. El grupo 0 (430 células), que representa los grupos más grandes, mostró una firma progenitora de nefrona más comprometida con la expresión de los marcadores tempranos de las vesículas renales *PAX2*, *PAX8*, *LHX1* y *JAG1*, así como de los marcadores NP humanos *LYPD1* y *DAPL1* (Lindstrom y col., 2018). El grupo 1 (337 células) mostró una firma estromal como *PDGFRB* y *MEIS2*. El grupo 4, si bien expresaba el marcador nefrónico temprano cadherina *CDH6*, mostró una firma transcripcional neuronal que sugería la presencia de una población neuronal fuera del objetivo, como se ha informado anteriormente en los organoides renales (Wu y col., 2017). Este análisis respaldó firmemente la identidad de los tipos de células observados en los organoides renales a nivel de inmunofluorescencia.

Ejemplo 11: El perfil transcripcional unicelular comparativo de organoides estándar y renales demuestra la equivalencia del patrón nefrogénico.

Para comparar directamente los componentes celulares de los organoides renales con otro método de organoides renales, los datos del scRNA-seq del organoide renal se combinaron con datos de 1421 células de organoides renales generadas utilizando la misma línea celular iPSC (CRL1502.C32) y el protocolo estándar de organoides renales de Takasato y col., 2016. Los dos conjuntos de datos se combinaron utilizando el algoritmo de alineación implementado en Seurat (Butler et al., 2018), que utiliza un análisis de componentes correlacionados seguido de una distorsión temporal dinámica. La agrupación identificó 8 grupos transcripcionales dentro del conjunto de datos combinado, que representan progenitores de nefronas comprometidos (Grupo 0), epitelio de nefrona (Grupo 6), podocitos (Grupo 7), estroma (Grupos 1 y 3), células endoteliales (Grupo 5), células *PAX3*⁺ (Grupo 2) y una población neuronal fuera del objetivo (Grupo 4) (Figura 5A y Figura 5B). Todos los grupos se representaron en ambos conjuntos de datos, aunque la proporción de células atribuidas a cada grupo varió (Figuras 5B-5D). Una comparación directa de los marcadores clave de cada grupo muestra que, si bien había diferencias aparentes en la proporción que contribuía a cada grupo entre los protocolos (Figuras 5B y 5C), había una fuerte congruencia transcripcional entre las células identificadas en cualquier grupo dado entre ambos protocolos (Figura 5D). La población neuronal fuera del objetivo identificada en los organoides renales también fue evidente en los organoides estándar. En general, el conjunto de datos de organoides renales contenía una mayor proporción de células nefronas y una menor proporción de células estromales que el conjunto de datos de organoides estándar (Figura 5E). Este aumento en las células de nefrona que expresan *PAX2* y

la reducción de las células estromales que expresan MEIS 1/2/3 en los organoides renales en comparación con los organoides estándar se confirmó mediante un análisis de inmunofluorescencia de organoides de montura completa (Figura 5F y Figura 6).

- 5 Ejemplo 12: Los organoides renales proporcionan una mejor plataforma para el aumento eficiente de células renales derivadas de hPSC.

Los organoides renales estándar cultivados con filtros Transwell™ pueden tener limitaciones de difusión después de 3 semanas de cultivo debido al tamaño del tejido organoide generado (Figura 4A). La tinción por inmunofluorescencia de los segmentos de nefrona después de este tiempo sugirió una restricción espacial de las estructuras de las nefronas hasta el borde de los organoides. Por el contrario, los organoides renales contienen túbulo renal en toda la estructura (Figura 4B). Los organoides renales también se pueden formar simultáneamente en grandes cantidades utilizando un agitador orbital, lo que evita el tedioso proceso de manipulación manual que implica el protocolo estándar de organoides. Como resultado, es posible generar aproximadamente de 8000 a 10 000 organoides renales de tamaño uniforme en 5-10 minutos, en comparación con aproximadamente 30 organoides en 60 minutos para el protocolo de organoides estándar. Los organoides renales presentan un tamaño final mucho más pequeño (250-300 µm) en comparación con los organoides estándar (3000-5000 µm) (Figura 4C). Como muestra la inmunofluorescencia, las nefronas que se forman dentro de un organoide estándar están presentes en un borde alrededor de la periferia del tejido en comparación con los organoides renales (Figura 4A). Sin embargo, estas estructuras son mucho más grandes que los organoides del riñón. Para comparar directamente la eficiencia y el costo de cada estrategia, los organoides estándar y los organoides renales, cada uno generado utilizando las líneas indicadoras iPSC y hESC, se disociaron en una única suspensión celular en múltiples puntos de tiempo a lo largo del protocolo de diferenciación desde el día 7 para la cuantificación del número total de células (Figura 4D). Los organoides estándar no mostraron un cambio sustancial en el recuento total de células por organoide después del día 7+7, mientras que los organoides renales continuaron aumentando en el número total de células hasta el día 7+12. En general, el recuento de células aumentó 8-10 veces en condiciones organoides estándar, pero hasta 30-40 veces en el caso de los organoides renales. Esto representa una mejora de 3 a 4 veces en el rendimiento celular usando este protocolo modificado.

- 30 Ejemplo 13: La adición de todo el ácido trans-retinoico mejora la maduración de los podocitos glomerulares

Para determinar si la adición de todo el ácido trans-retinoico (atRA) facilitaría la maduración glomerular de los organoides producidos por el método de cultivo en vórtice descrito en los ejemplos 1-3, se complementó con atRA en el medio después de D7+0. Todo el ácido trans-retinoico (2,5 µM) se añadió de D7+5 a D7+10 a organoides vorticiales derivados de C32 (Figura 5). Tras D7+18, el análisis de inmunofluorescencia mostró que la adición de atRA mejoraba el fenotipo de los podocitos en comparación con el grupo de control (Figuras 7A y 7B). Los resultados se confirmaron mediante la expresión del ARNm, el análisis por qPCR de las muestras D7+11 y D7+18, que mostró que la adición de atRA 2,5 µM aumentaba la expresión de marcadores glomerulares, tales como el NPHS1 y de los marcadores tubulares proximales como el CUBN en comparación con el control (Figura 7C).

- 40 Ejemplo 14: Ensayos de toxicidad farmacológica en microorganoides renales

Para evaluar la idoneidad de usar el método de cultivo en suspensión descrito en la presente memoria para probar la toxicidad farmacológica de los riñones *in vitro*, se realizaron estudios de toxicidad farmacológica. Los organoides producidos por el método el día 7+18 se recolectaron y se distribuyeron al azar en grupos de tratamiento en placas de 45 24 pocillos con baja adherencia en 250 µl de medio. Los organoides se estimularon con diferentes concentraciones del fármaco citotóxico adriamicina (0, 2,5 y 5 µg/ml) durante 24 horas. Tras la estimulación, se retiró el medio y los organoides se fijaron con PFA al 2 % para el análisis de tinción por inmunofluorescencia para la apoptosis mediante tinción TUNEL y algunos organoides se lisaron para el análisis del ARN (Figura 8A-8D).

- 50 Ejemplo 15: Resumen de las mejoras en la producción de organoides renales

Los organoides renales resultantes de los métodos ilustrados anteriormente muestran una formación fiable de componentes celulares epiteliales, estromales y endoteliales de la nefrona renal, equivalentes a un nivel transcripcional de una sola célula a los presentes en el protocolo de organoides renales descrito anteriormente (Takasato y col., 2016; Takasato y col., 2015). Sin embargo, las alteraciones en las condiciones de cultivo dieron como resultado una mejora de 3-4 veces en el rendimiento celular relativo a un coste 4 veces menor por millón de células renales generadas. La solidez de los métodos ilustrados queda demostrada por la capacidad de recapitular la generación exitosa de organoides renales utilizando 2 hESC diferentes (H9 y hES3) y 3 líneas de iPSC diferentes (iPSC GAPTrap td-Tomato, CRL1502.C32 y CLR1502.3), incluidas las líneas informadoras fluorescentes hES3 SOX17mCherry, H9 GAPTrap Luc2 e iPSC GAPTrap td-Tomato.

Cualquier análisis de documentos, actos, materiales, dispositivos, artículos o similares que se haya incluido en la presente memoria descriptiva tiene únicamente el propósito de proporcionar un contexto para la presente invención. No debe tomarse como una admisión de que alguno o todos estos asuntos formen parte de la base de la técnica anterior o fueran de conocimiento general común en el campo relevante para la presente invención, tal como existían antes de la fecha de prioridad de cada reivindicación de esta solicitud.

Referencias

Barberi y col., (2005) *Plos Medicine* 2(6): 0554-0559.

5 Briggs y col., (2013) *Stem Cells* 31: 467-78.

Butler y col., (2018) *Nat Biotechnol* 36: 411-420.

Cima y col., (1991) *Biotechnol. Bioeng.* 38: 145 1991.

10 Dodt y col., (2007) *Nat Methods* 4: 331-6.

Forbes y col., (2018) *Am J Hum Genet.* 102: 816-831

15 Hueber y col., (2009) *Pathol.* 12: 347-54.

Kao y col., (2016) *Stem Cell Reports* 7: 518-526.

Lindstrom y col., (2018) *J Am Soc Nephrol.* 29: 806-824.

20 Lun y col., (2016) *F1000Res* 5: 2122.

Mi y col., (2013) *Nat Protoc* 8: 1551-1556.

25 Ng y col., (2016) *Nat Biotechnol* 34: 1168-1179.

Satija y col., (2015) *Nat Biotechnol*, 33: 495-502.

Scialdone y col., (2015) *Methods* 85: 54-61.

30 Takasato y col., (2015) *Nature* 526: 564-8.

Vacanti y col., (1988) *J. Ped. Surg.* 23: 3-9.

35 Vacanti y col., (1991) *Plast. Reconstr. Surg.* 88: 753-9.

van den Berg y col., (2018) *Stem Cell Reports* 10: 751-765.

Vodyanik y col., (2010) *Cell Stem cell* 7:718-728.

40 Wu y col., (2017).

Zheng y col., (2017) *Nat Commun* 8: 14049.

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un método *in vitro* para producir un organoide renal, comprendiendo el método agitar en vórtice una población de células del mesodermo intermedio (MI) en un medio de cultivo celular, que comprende el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), en donde el organoide renal comprende podocitos NPHS1+, segmentos proximales LTL+, segmentos distales ECAD+ y conducto colector ECAD+/GATA3+, en donde las células MI se agitan en cultivo durante al menos 5 días, en donde las primeras 24 horas comprenden la agitación en vórtice de células en un medio de cultivo celular, que comprende FGF, heparina, CHIR99021 (CHIR) y un inhibidor de la Rho quinasa (ROCK) y los cuatro días siguientes comprenden cultivar células en un medio de cultivo celular que comprende FGF, heparina y CHIR.
2. El método de la reivindicación 1, en donde el medio de cultivo celular comprende poli(alcohol vinílico) (PVA) y metilcelulosa (MC).
3. El método según la reivindicación 1 o 2, en donde las primeras 24 horas comprenden la agitación en vórtice de las células en un medio de cultivo celular, que comprende de 100 a 300 ng/ml de FGF9, de 0,5 a 1,5 µg/ml de heparina, de 0,5 a 1,5 µM de CHIR y de 9 a 11 µM de inhibidor de ROCK.
4. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde los cuatro días siguientes comprenden agitar en vórtice las células en un medio de cultivo celular, que comprende de 100 a 300 ng/ml de FGF9, de 0,5 a 1,5 µg/ml de heparina y de 0,5 a 1,5 µM de CHIR.
5. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde las células MI se agitan entre 30 y 90 rpm.
6. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde las células MI se agitan durante 18 a 24 días.
7. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde una población de células madre se cultiva durante al menos siete días y en donde los primeros 4 a 5 días comprenden cultivar células madre en un medio de cultivo celular, que comprende al menos 6 µM de un agonista de Wnt/β-catenina y los días restantes de cultivo comprenden cultivar células en un medio de cultivo celular, que comprende FGF y al menos 0,5 µM de un agonista de Wnt/β-catenina para proporcionar la población de células MI.
8. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde la población de células MI se disocia con EDTA o tripsina y se pasa a través de una malla antes de agitar.
9. El método según la reivindicación 7 u 8, en donde las células madre son células madre pluripotentes, células madre embrionarias o células madre pluripotentes inducidas (iPS).
10. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que comprende agitar en vórtice una población de células MI, que comprende de $0,5 \times 10^6$ células MI/ml a $1,5 \times 10^6$ células MI/ml.
11. Un organoide renal producido según el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.
12. El organoide renal según la reivindicación 11, que comprende células que expresan niveles altos de uno o más de PAX2, SIX1, LHX1, OSR1, WNT11, GATA3, PAX8, EYA1 y CITED1, en donde la expresión alta es al menos 1 veces mayor en relación con los organoides renales cultivados sin generación de vórtice.
13. El organoide renal según las reivindicaciones 11 o 12, que comprende células que expresan niveles bajos de uno o más de PDGFRA, MEIS2, WT1 y/o C-RET, en donde la expresión baja es al menos 1 vez menor en relación con los organoides renales cultivados sin generación de vórtice.
14. El organoide renal según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, que comprende al menos un 25 % de nefrona madura y al menos un 15 % de estroma.
15. El organoide renal según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14, en donde las nefronas de los organoides comprenden el conducto colector (GATA3+; ECAD+), el túbulo distal temprano (GATA3-; LTL-; ECAD+), el túbulo proximal temprano (LTL+; ECAD-) y el glomérulo (WT1+).

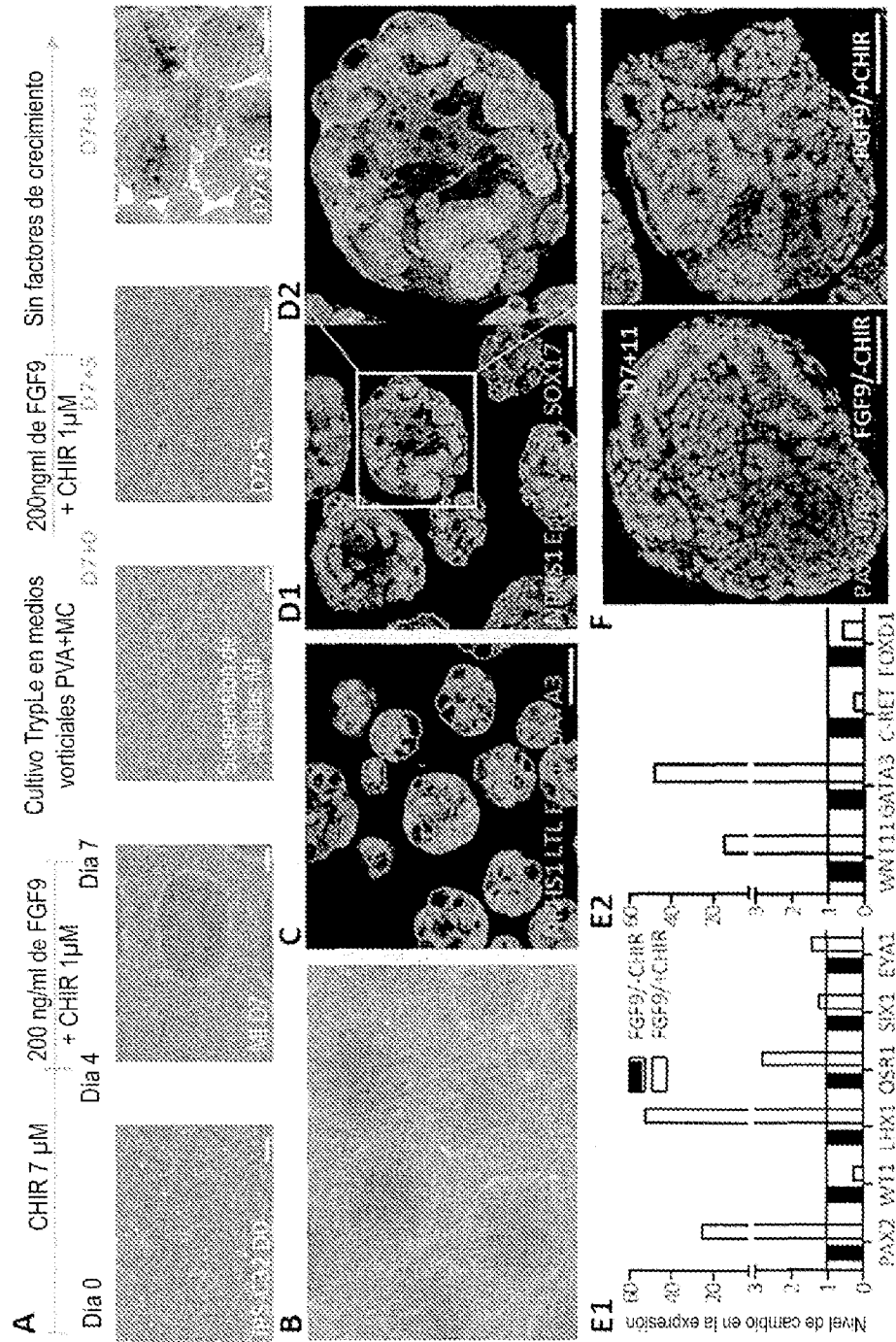


Figura 1-1

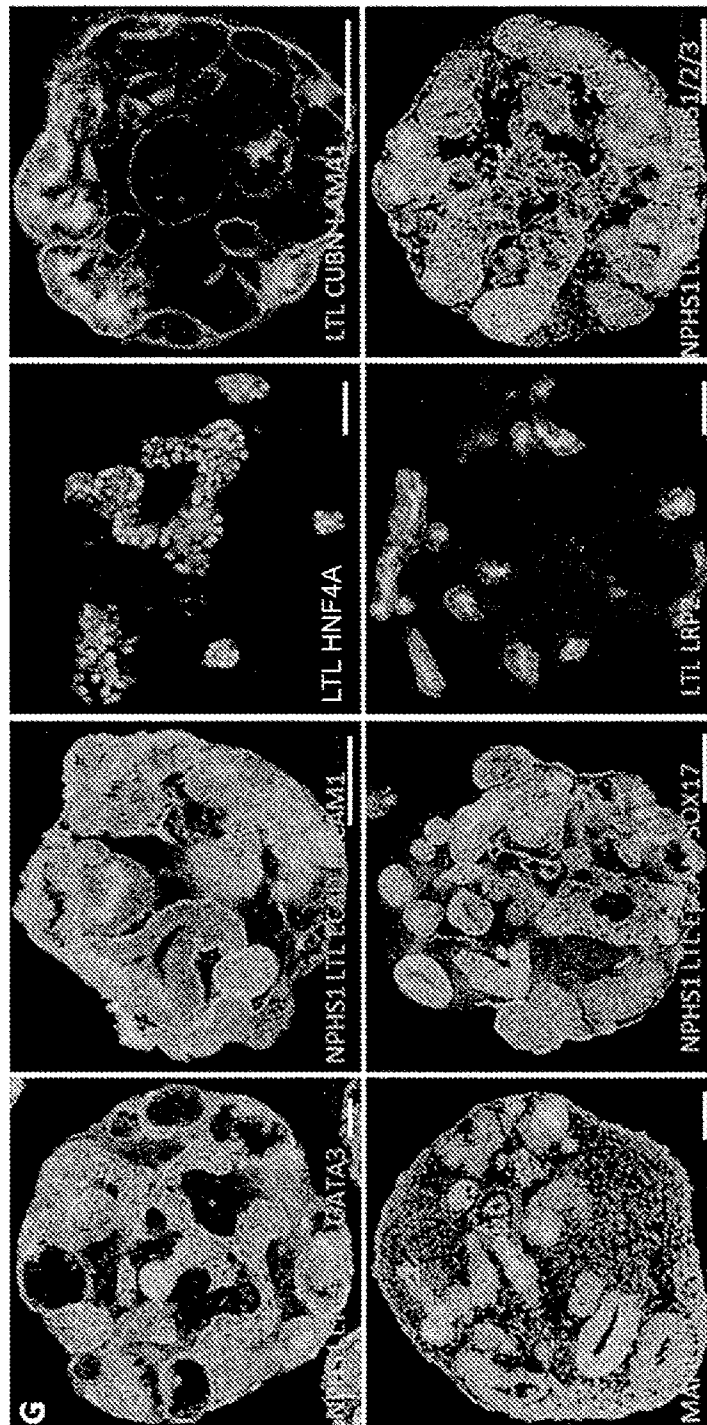


Figura 1-2

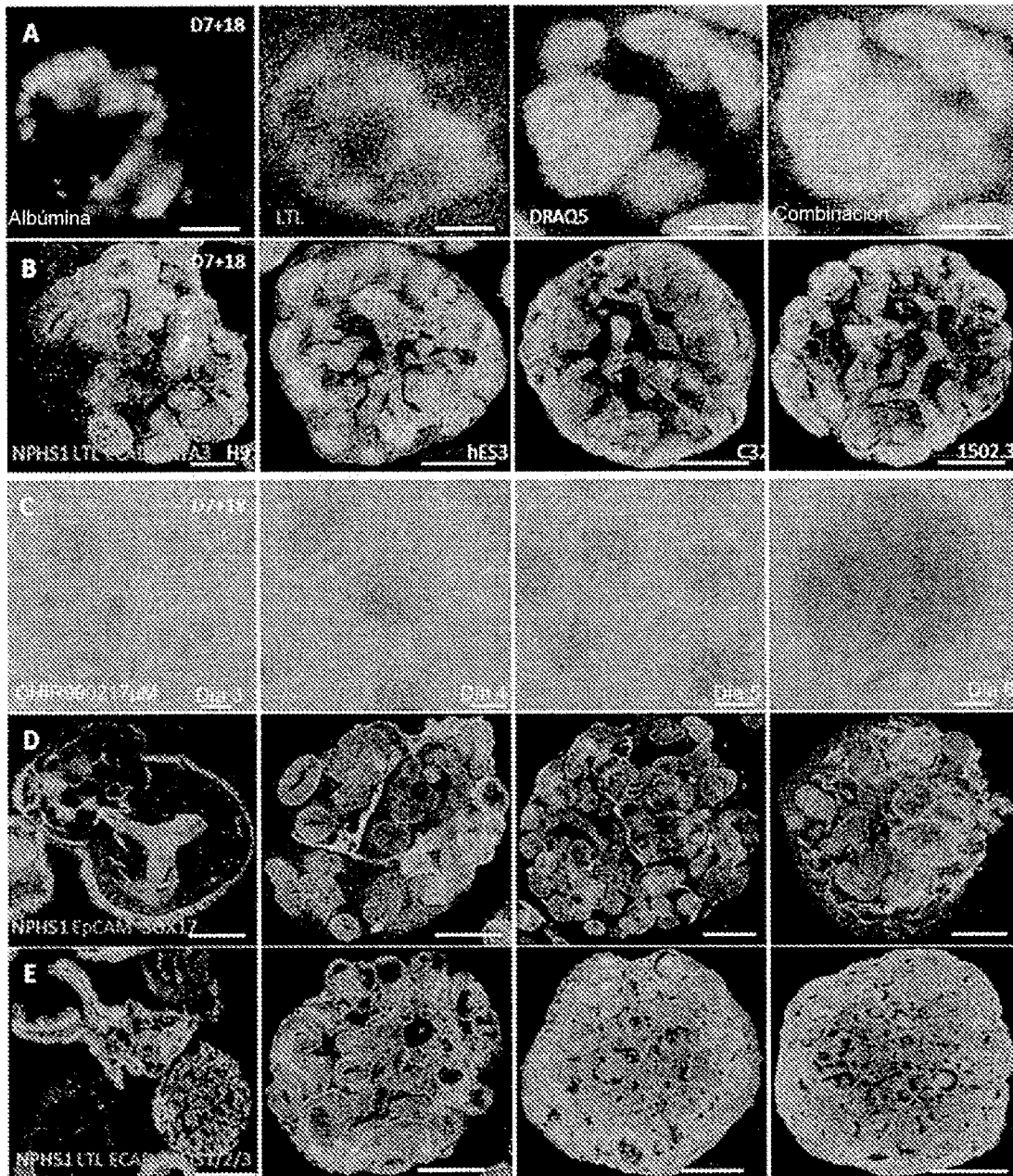


Figura 2

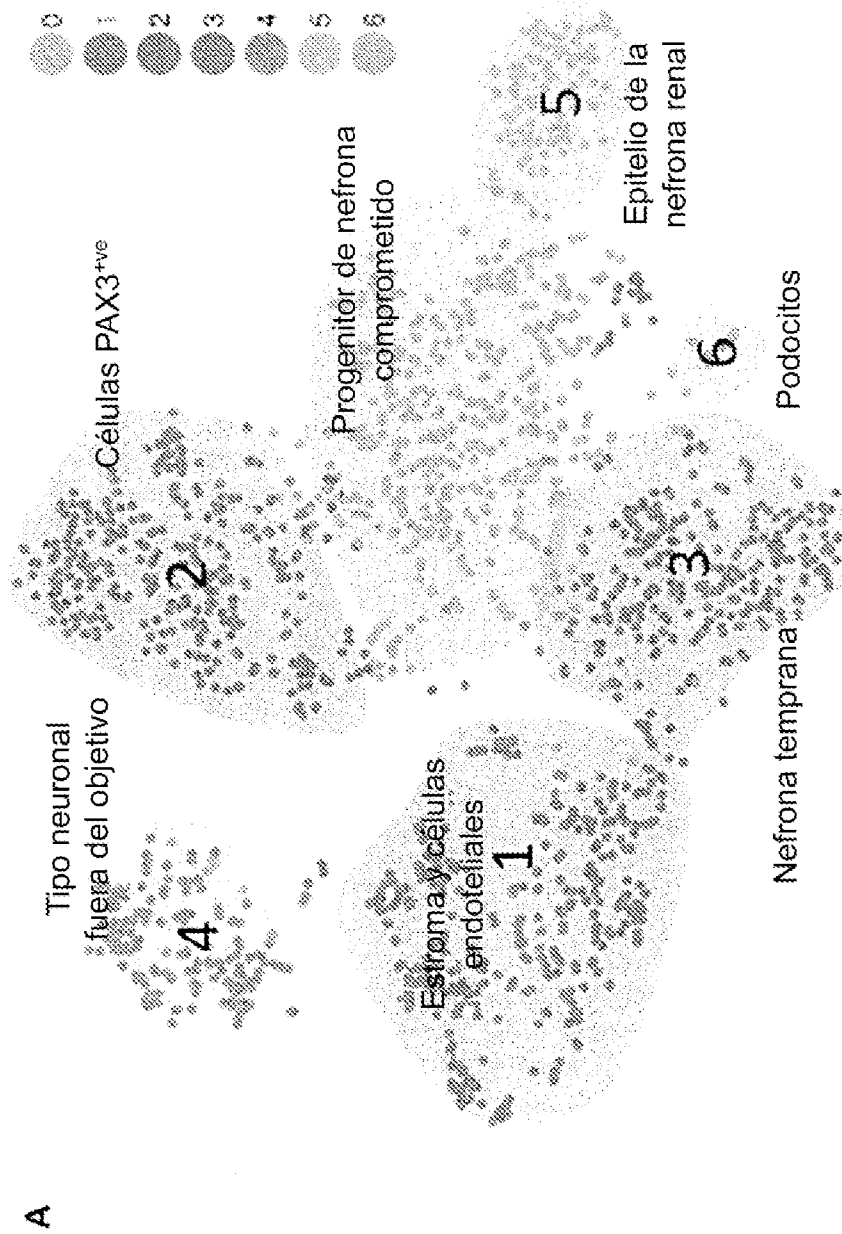


Figura 3-1

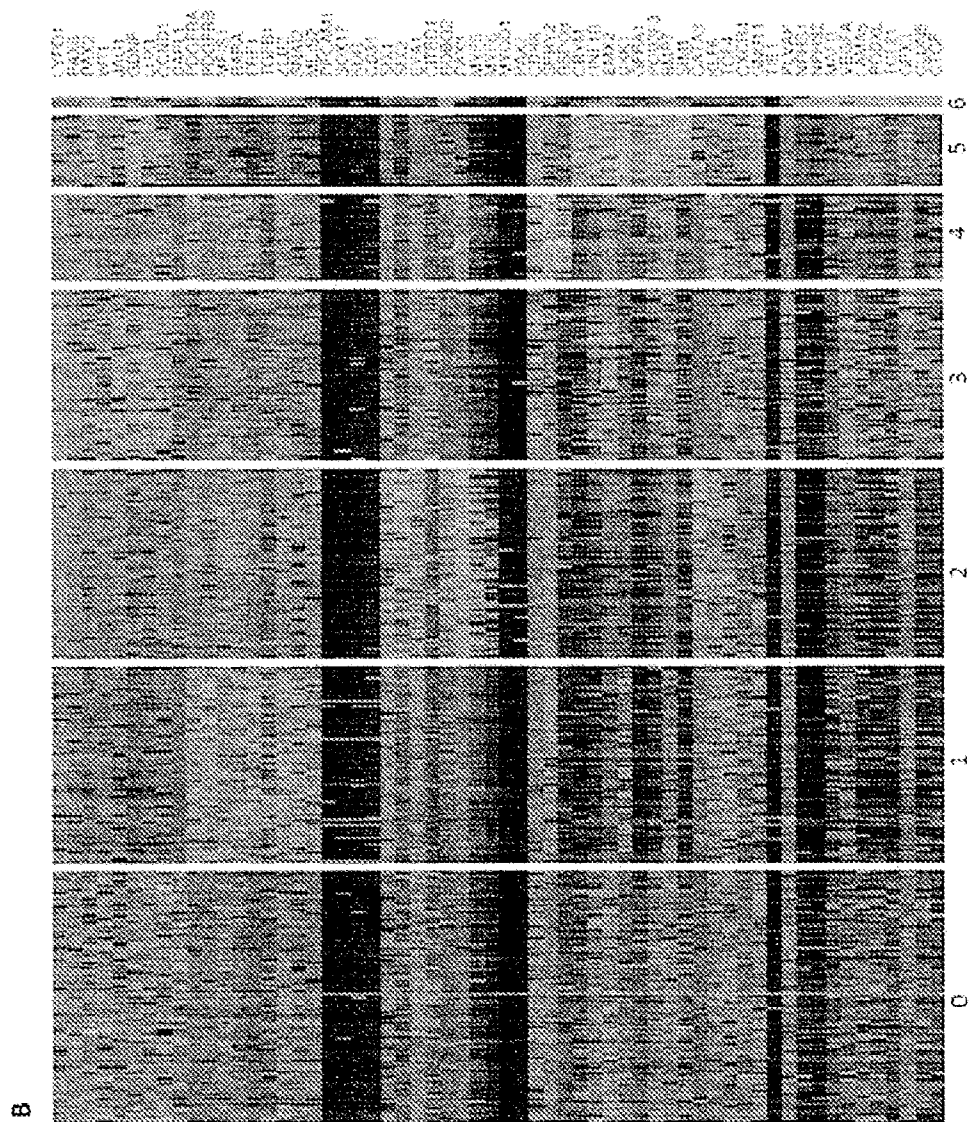


Figura 3-2

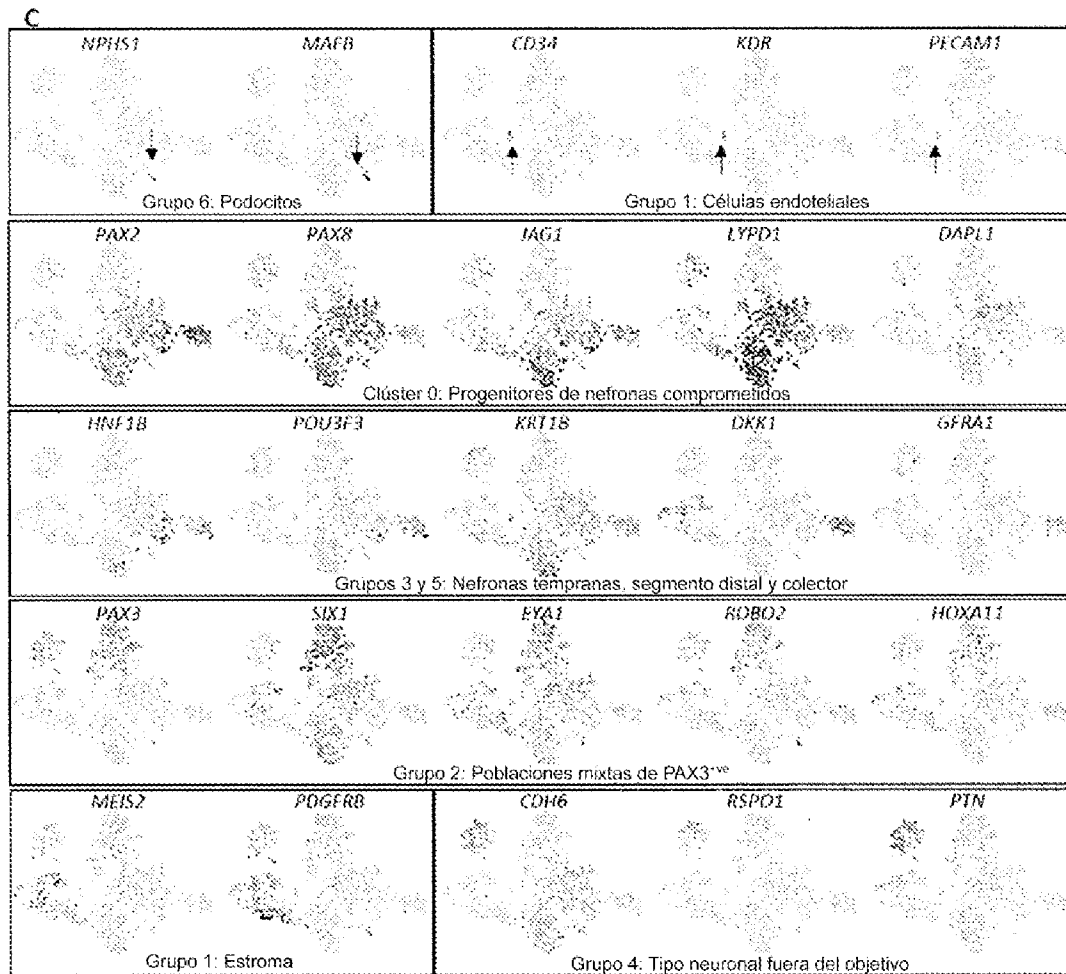


Figura 3-3

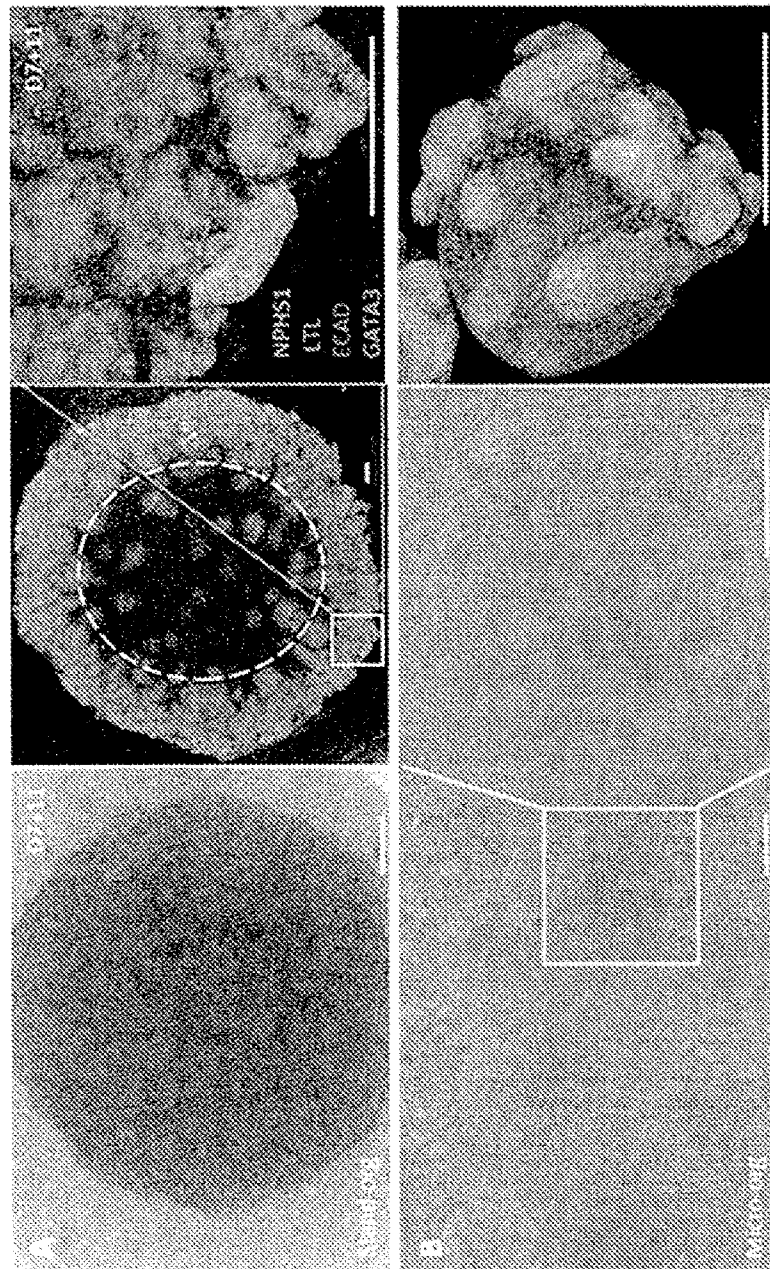


Figura 4-1

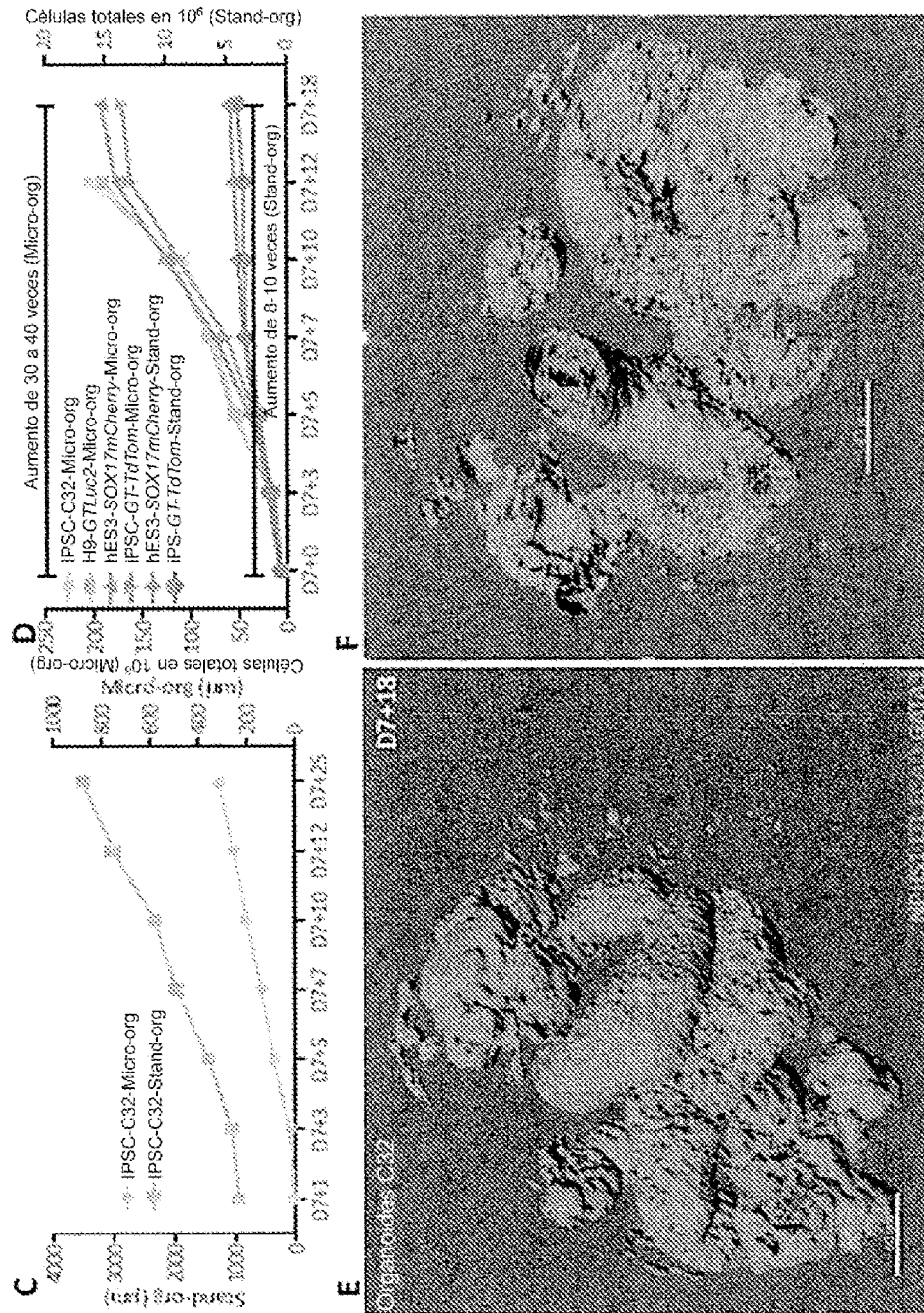


Figura 4-2

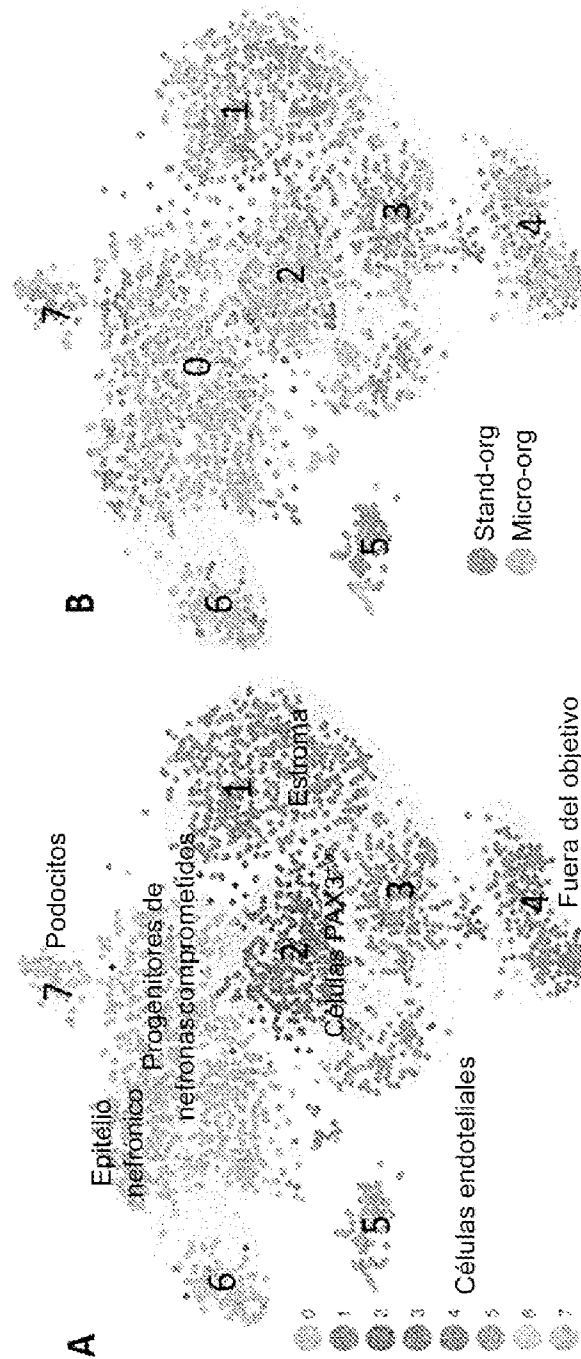


Figura 5-1

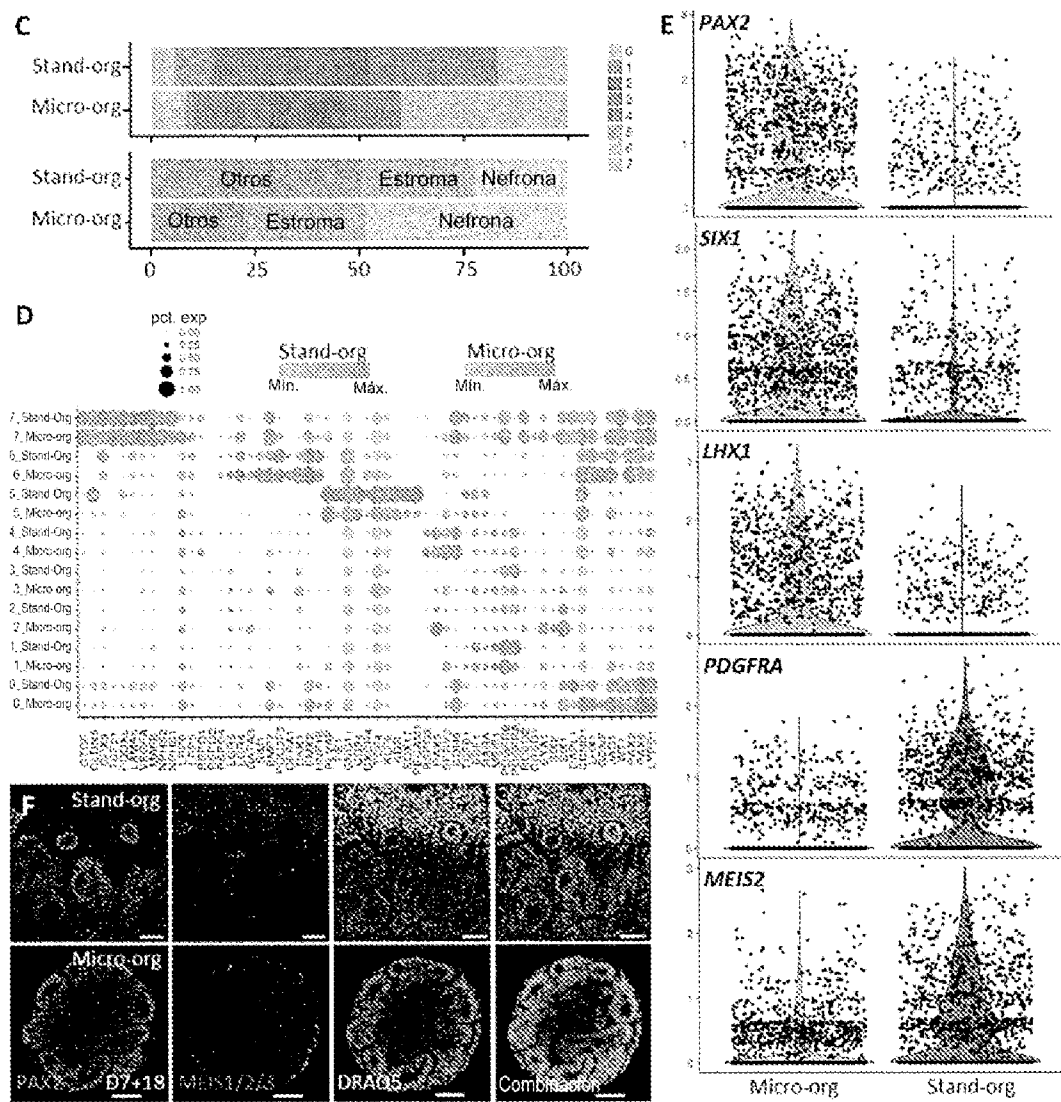


Figura 5-2

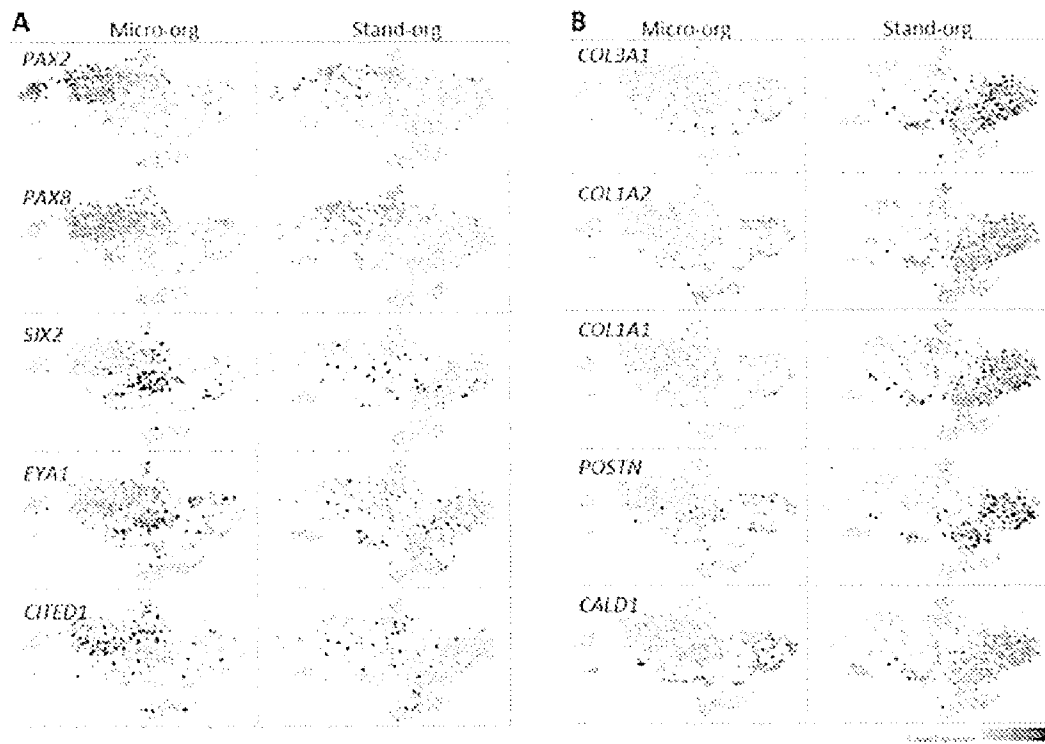


Figura 6

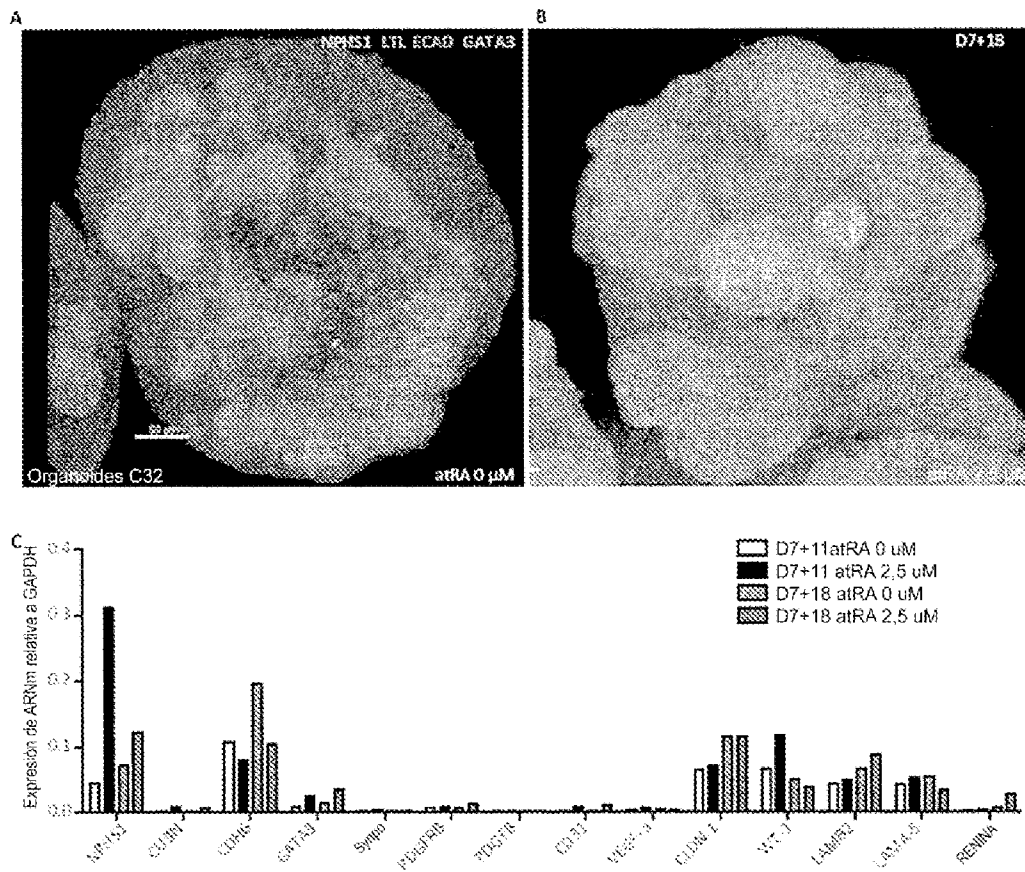


Figura 7

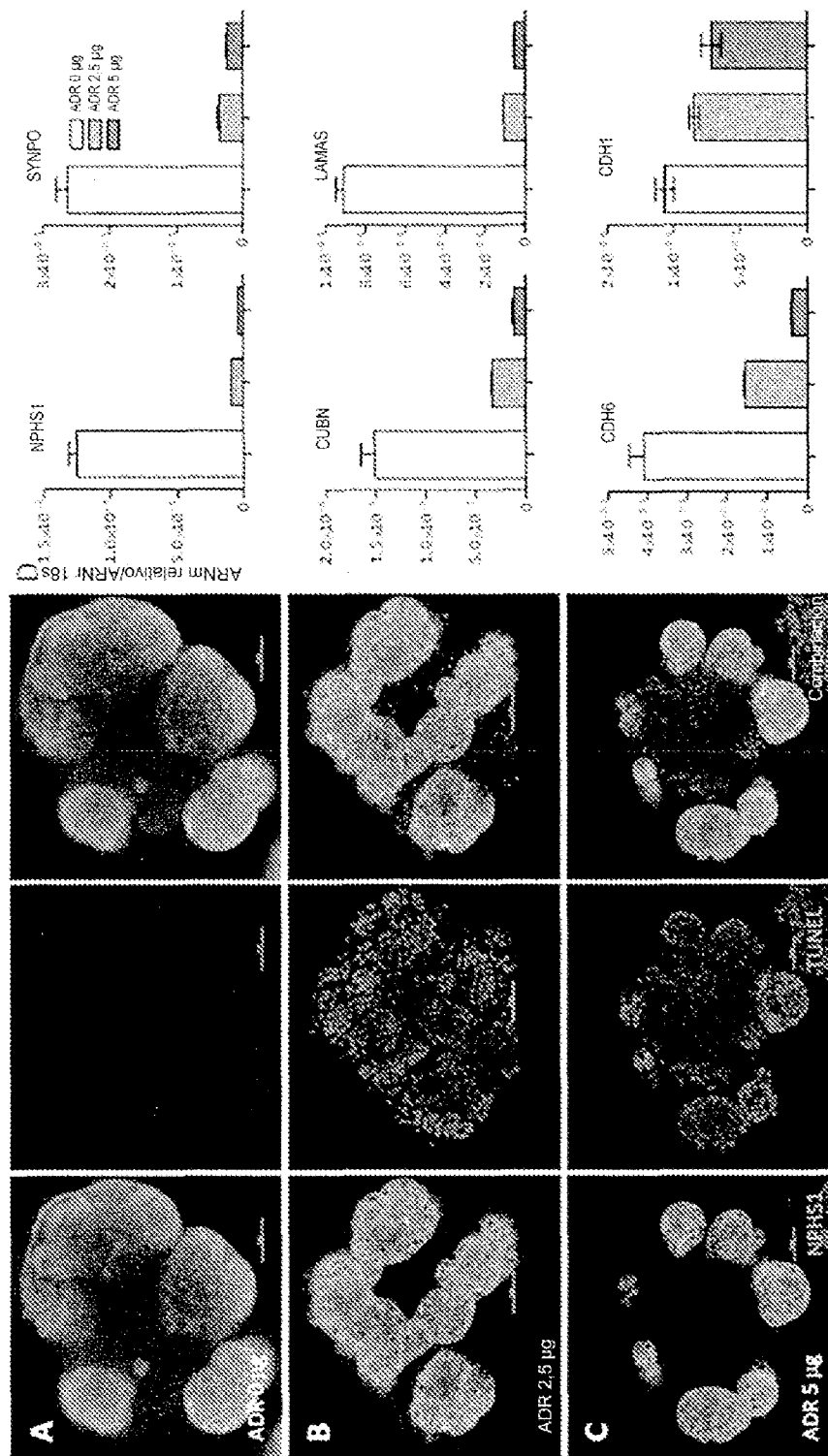


Figura 8