



(12) Translation of
European patent specification

(11) NO/EP 2598633 B1

NORWAY

(19) NO
(51) Int Cl.
C12N 5/074 (2010.01)
A61K 35/407 (2015.01)

Norwegian Industrial Property Office

(21)	Translation Published	2019.07.22
(80)	Date of The European Patent Office Publication of the Granted Patent	2019.05.08
(86)	European Application Nr.	11764293.4
(86)	European Filing Date	2011.07.29
(87)	The European Application's Publication Date	2013.06.05
(30)	Priority	2010.07.29, EP, 10171265 2010.07.29, US, 368736 P 2011.06.10, US, 201161520569 P
(84)	Designated Contracting States:	AL ; AT ; BE ; BG ; CH ; CY ; CZ ; DE ; DK ; EE ; ES ; FI ; FR ; GB ; GR ; HR ; HU ; IE ; IS ; IT ; LI ; LT ; LU ; LV ; MC ; MK ; MT ; NL ; NO ; PL ; PT ; RO ; RS ; SE ; SI ; SK ; SM ; TR
	Designated Extension States:	BA ; ME
(73)	Proprietor	Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschappen, Hubrecht Institute Uppsalalaan 8, 3584 CT Utrecht, Nederland
(72)	Inventor	HUCH ORTEGA, Meritxell, Willem Barentszstraat 25-11, 3572 PB Utrecht, Nederland CLEVERS, Johannes, Carolus, Ruysdaellaan 7, 3712 AP Huis ter Heide, Nederland
(74)	Agent or Attorney	OSLO PATENTKONTOR AS, Postboks 7007 M, 0306 OSLO, Norge

(54)	Title	LIVER ORGANOID, USES THEREOF AND CULTURE METHOD FOR OBTAINING THEM
(56)	References Cited:	WO-A2-2009/022907, WO-A2-2007/127454, WO-A2-2004/087896 LEMAIGRE ET AL: "Mechanisms of Liver Development: Concepts for Understanding Liver Disorders and Design of Novel Therapies", GASTROENTEROLOGY, ELSEVIER, PHILADELPHIA, PA, vol. 137, no. 1, 1 July 2009 (2009-07-01), pages 62-79, XP026418789, ISSN: 0016-5085 [retrieved on 2009-03-27] WILLIAMS JENNIFER M ET AL: "The Role of the Wnt Family of Secreted Proteins in Rat Oval "Stem" Cell-Based Liver Regeneration Wnt1 Drives Differentiation", AMERICAN JOURNAL OF PATHOLOGY, vol. 176, no. 6, June 2010 (2010-06), pages 2732-2742, XP002678410, SNYKERS SARAH ET AL: "In Vitro Differentiation of Embryonic and Adult Stem Cells into Hepatocytes: State of the Art", STEM CELLS (MIAMISBURG), vol. 27, no. 3, 2009, pages 577- 605, XP002603406, ISSN: 1066-5099

SNYKERS S ET AL: "Differentiation of neonatal rat epithelial cells from biliary origin into immature hepatic cells by sequential exposure to hepatogenic cytokines and growth factors reflecting liver development", TOXICOLOGY IN VITRO, ELSEVIER SCIENCE, GB, vol. 30, 4 April 2007 (2007-04-04), pages 1-7, XP002453247, ISSN: 0887-2333

MITAKA TOSHIHIRO: "Reconstruction of hepatic organoid by hepatic stem cells", JOURNAL OF HEPATO-BILIARY-PANCREATIC SURGERY, SPRINGER VERLAG, BERLIN, DE, vol. 9, no. 6, 1 January 2002 (2002-01-01) , pages 697-703, XP002331148, ISSN: 0944-1166, DOI: DOI:10.1007/S005340200096

BARKER N ET AL: "Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5", NATURE: INTERNATIONAL WEEKLY JOURNAL OF SCIENCE, NATURE PUBLISHING GROUP, UNITED KINGDOM, vol. 449, 25 October 2007 (2007-10-25), pages 1003-1008, XP002457164, ISSN: 0028-0836, DOI: 10.1038/NATURE06196

Enclosed is a translation of the patent claims in Norwegian. Please note that as per the Norwegian Patents Acts, section 66i the patent will receive protection in Norway only as far as there is agreement between the translation and the language of the application/patent granted at the EPO. In matters concerning the validity of the patent, language of the application/patent granted at the EPO will be used as the basis for the decision. The patent documents published by the EPO are available through Espacenet (<http://worldwide.espacenet.com>) or via the search engine on our website here: <https://search.patentstyret.no/>

Patentkrav

1. Fremgangsmåte for å oppnå et leverorganoid, hvor fremgangsmåten omfatter:

dyrking av en eller flere leverepitelstamceller, eller et leverfragment eller en
5 levergalle i kontakt med en ekstracellulær matrise i nærvær av et ekspansjonsmedium, idet mediet omfatter et basisk medium for animalske eller humane celler, til hvilket det tilsettes:
epidermal vekstfaktor (EGF), en fibroblastvekstfaktor (FGF) som er i stand til å binde til FGFR2 eller FGFR4, Nikotinamid og en Wnt-agonist valgt fra
10 Rspodin 1, Rspodin 2, Rspodin 3 eller Rspodin 4.
2. Fremgangsmåte ifølge krav 1, hvor ekspansjonsmediet videre omfatter HGF.
3. Fremgangsmåte ifølge krav 1 eller krav 2, hvor en TGF-beta-inhibitor er i
15 tillegg til stede i mediet og eventuelt hvor TGF-beta-inhibitoren er en små-molekylær-inhibitor valgt fra gruppen bestående av: A83-01, SB-431542, SB-505124, SB-525334, LY 364947, SD-208, SJN 2511.
4. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 4, hvor
20 fremgangsmåten omfatter dyrking av den ene eller flere epitelstamceller i et cellekulturmedium som omfatter eller består av et basisk medium for animalske eller humane celler, til hvilket det tilsettes EGF, en BMP-inhibitor , R-spondin og Wnt;
og deretter i et ekspansjonsmedium som omfatter eller består av et basisk
25 medium for animalske eller humane celler til hvilket det tilsettes: EGF, en FGF og HGF, nikotinamid og en R-spondin;
og deretter i et differensieringsmedium som omfatter eller består av et basisk medium for animalske eller humane celler, til hvilket det tilsettes:
EGF, FGF og/eller HGF, en TGF-beta-inhibitor og en Notch-inhibitor.
30
5. Fremgangsmåte ifølge krav 4, hvor differensieringsmediet videre omfatter dexametason.
6. Cellekulturmedium omfattende et basisk medium for animalske eller humane
35 celler, til hvilke det tilsettes: EGF, en FGF som er i stand til å binde til FGFR2 eller FGFR4, Nikotinamid, og en Wnt-agonist valgt fra R-spondin 1, R-spondin 2, R-spondin 3 og R-spondin 4.

7. Cellekulturmedium ifølge krav 6, hvor HGF blir tilsatt til mediet.
8. Kulturmedium ifølge krav 6 eller 7, hvor ett, to, tre, fire eller flere fra gruppen gastrin, B27, N2 og N-Acetylcystein blir tilsatt det basiske mediet.
- 5
9. Leverorganoid omfattende celler som uttrykker Lgr5, oppnåelig ved å dyrke en eller flere leverepitelstamceller, eller et leverfragment eller en levergalle i kontakt med en ekstracellulær matrise i nærvær av et ekspansjonsmedium, idet mediet omfatter et basisk medium for animalske eller humane celler, til hvilket det
- 10 tilsettes: epidermal vekstfaktor (EGF), en fibroblastvekstfaktor (FGF) som er i stand til å binde til FGFR2 eller FGFR4, Nikotinamid, en Wnt-agonist valgt fra Rspondin 1, Rspondin 2, Rspondin 3 eller Rspondin 4, og HGF, hvor leverenorganoidet kan dyrkes i minst 3 måneder.
- 15
10. Leverorganoid ifølge krav 9, som omfatter en cystisk struktur og på utsiden et lag av celler med minst en knopp og et sentralt lumen.
11. Leverorganoid ifølge krav 9 eller krav 10, som har en eller flere (f.eks. 2, 3, 4 eller alle 5) med følgende egenskaper: (a) som har en celletetthet på $>5 \times 10^5$ celler/cm³, foretrukket $>10 \times 10^5$ celler/cm³; (b) som har en tykkelse som tilsvarer 2-30 lag celler, foretrukket en tykkelse som tilsvarer 2-15 lag celler; (c) cellene har gjensidig kontakt i tre dimensjoner, (d) viser en funksjon som er iboende med sunt levervev, (e) har en langstrakt form, med to definerte domener.
- 20
12. Leverorganoid ifølge et hvilket som helst av kravene 9 til 11, hvor:
- 25
- (a) organoidet består av et enkeltlags epiteliaalt domene hvor polariserte celler detekteres og keratinmarkører uttrykkes og et andre domene som utgjør hoveddelen av organoidet, dannet av en flerlags epitel med ikke-polariserte celler, som eventuelt uttrykker albumin og /
- 30 eller
- (b) organoidet er oppnådd fra en epitelial stamcelle fra en voksen lever-uttrykkende Lgr5, og som omfatter en populasjon mellom minst 1×10^3 celler og 5×10^4 .
- 35
13. Anvendelse av en leverorganoid som definert i et hvilket som helst av kravene 9 til 12 i en legemiddel-opdagelse-screening.

14. Anvendelse av en leverorganoid som definert i et hvilket som helst av kravene 9 til 12 i en toksisitetsanalyse.
15. Leverorganoid ifølge et hvilket som helst av kravene 9 til 12 til anvendelse
5 ved behandling av leverlidelse, tilstand eller sykdom eller for anvendelse i regenerativ medisin.