



(12) Translation of
European patent specification

(11) NO/EP 3564361 B1

NORWAY

(19) NO
(51) Int Cl.
A61P 1/16 (2006.01)
C12N 5/071 (2010.01)

Norwegian Industrial Property Office

(45)	Translation Published	2025.04.22
(80)	Date of The European Patent Office Publication of the Granted Patent	2024.12.25
(86)	European Application Nr.	19167639.4
(86)	European Filing Date	2011.07.29
(87)	The European Application's Publication Date	2019.11.06
(30)	Priority	2010.07.29, EP, 10171265 2010.07.29, US, 36873610 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
(62)	Divided application	EP2598633, 2011.07.29
(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	ZACCO NORWAY AS, Postboks 488, 0213 OSLO, Norge

(54)	Title	LIVER ORGANOID, USES THEREOF AND CULTURE METHOD FOR OBTAINING THEM
(56)	References Cited:	WO-A2-2012/168930 WO-A2-2009/022907 WO-A2-2004/087896 WO-A2-2007/127454 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 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 (2010-06-01), pages 2732 - 2742, XP002678410
 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

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 20090327]

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: 10.1007/S005340200096

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. En fremgangsmåte for å differensiere leverepitelstamceller, hvor fremgangsmåten omfatter å dyrke epitelstamcellene i nærværet av et kulturmedium, hvor mediet omfatter et basalmedium for animalske eller humane celler, og som videre omfatter en EGF, en Notch-inhibitor og en TGF-beta-inhibitor.

5
2. Fremgangsmåten i henhold til krav 1, hvor kulturmediet videre omfatter FGF og/eller HGF.

10
3. Fremgangsmåten i henhold til krav 2, hvor FGF-en er en FGF som er i stand til å binde til FGFR2 eller FGFR4 og er fortrinnsvis FGF10.

15
4. Fremgangsmåten i henhold til et hvilket som helst av de foregående kravene, hvor Notch-inhibitoren er valgt fra:
 - a) en gamma-sekretase-inhibitor, slik som DAPT eller dibenzazepin (DBZ) eller benzodiazepin (BZ) eller LY-411575;
 - b) en inhibitor som er i stand til å redusere ligandmediert aktivering av Notch; og
 - c) en inhibitor av ADAM-proteaser.

20
5. Fremgangsmåten i henhold til et hvilket som helst av de foregående kravene, hvor TGF-beta-inhibitoren er en TGF-beta-inhibitor hvis den kan inhibere TGF-beta-signalerings i en cellulær analyse hvor celler er stabilt transfektert med en reporterkonstruksjon som omfatter den humane PAI-1 promotoren.

25
6. Fremgangsmåten i henhold til et hvilket som helst av de foregående kravene, hvor TGF-beta-inhibitoren er en liten molekylinhibitor, eventuelt valgt fra gruppen som består av: A83-01, SB-431542, SB-505124, SB-525334, LY 364947, SD-208, SJN 2511.

30
7. Fremgangsmåten i henhold til et hvilket som helst av de foregående kravene, hvor mediet i tillegg omfatter deksametason.

- 8.** Fremgangsmåten i henhold til et hvilket som helst av de foregående kravene, hvor én, to eller tre eller fire fra gruppen gastrin, B27, N2, og N-acetylcystein er tilsatt til basalmediet.
- 5 **9.** Fremgangsmåten i henhold til et hvilket som helst av de foregående kravene, hvor kulturmediet ikke omfatter én eller flere av komponentene valgt fra listen: en Wnt-agonist, nikotinamid, en BMP-inhibitor.
- 10 **10.** Fremgangsmåten i henhold til et hvilket som helst av de foregående kravene, hvor fremgangsmåten videre omfatter å kontakte cellene med en ekstracellulær matriks, eventuelt hvor den ekstracellulære matriksen er et basalmembranpreparat fra Engelbreth-Holm-Swarm musesarkomceller, eller hvor den ekstracellulære matriksen er et syntetisk ekstracellulært matriksmateriale.
- 15 **11.** Fremgangsmåten i henhold til et hvilket som helst av de foregående kravene, hvor leverepitelstamcellene:
- a. uttrykker Lgr5; og/eller
 - b. ikke naturlig uttrykker én eller flere av Cd11b, CD13, CD14, AFP, Pdx1, et CYP-medlem på et signifikant nivå.
- 20 **12.** Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av de foregående kravene, hvor leverepitelstamcellene er muse- eller humaneleverepitelstamceller.
- 13.** Et kulturmedium for å differensiere leverepitelstamceller som beskrevet i et
- 25 hvilket som helst av krav 1 til 9.
- 14.** En sammensetning som omfatter kulturmediet ifølge krav 13 og en ekstracellulær matriks som beskrevet i krav 10.
- 30 **15.** Et leverorganoid, hvor leverorganoidet er oppnåelig ved en fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av krav 1 til 12, hvor organoidet omfatter en cystisk struktur og et sentralt hulrom.
- 35 **16.** Anvendelse av et leverorganoid som definert i krav 15 i en legemiddeloppdagelsesundersøkelse; toksisitetsanalyse; forskning på leverembryologi,

levercellelinjer, og differensieringsveier; genekspresjonsstudier som inkluderer rekombinant genekspresjon; forskning på mekanismer involvert i leverskade og reparasjon; forskning på inflammatoriske og infeksjøs sykdommer i leveren; studier av patogene mekanismer; eller studier av mekanismer av levercelle transformasjon og etiologi av leverkreft.

17. Leverorganoidet i henhold til krav 15 for anvendelse ved behandling av en leverforstyrrelse, -tilstand eller -sykdom eller for anvendelse i regenerativ medisin.