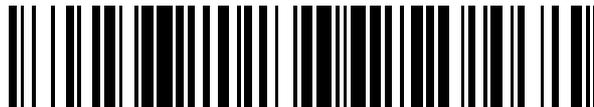


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 561 604**

51 Int. Cl.:

G01N 33/50 (2006.01)

C12N 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.12.2012 E 12824909 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.12.2015 EP 2795322**

54 Título: **Un ensayo cuantitativo rápido para medir la función de CFTR en un modelo de cultivo intestinal primario**

30 Prioridad:

19.12.2011 US 201161577110 P

23.12.2011 US 201161579661 P

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

29.02.2016

73 Titular/es:

UMC UTRECHT HOLDING B.V. (50.0%)

Yalelaan 40

3584 CM Utrecht, NL y

KONINKLIJKE NEDERLANDSE AKADEMIE VAN WETENSCHAPPEN (50.0%)

72 Inventor/es:

BEEKMAN, JEFFREY MATTHIJN;

DEKKERS, JOHANNA FLORENTIA;

VAN DER ENT, CORNELIS KORSTIAAN y

CLEVERS, JOHANNES CAROLUS

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 561 604 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).

Un ensayo cuantitativo rápido para medir la función de CFTR en un modelo de cultivo intestinal primario**DESCRIPCIÓN****CAMPO DE LA INVENCION**

La invención se refiere a un ensayo para la homeostasis de fluidos y de electrolitos en un método de cultivo basado en organoide.

ANTECEDENTES

El regulador de la conductancia transmembranaria de la fibrosis quística (CFTR) funciona como un canal de aniones, y es esencial para la homeostasis de fluidos y de electrolitos en superficies epiteliales de muchos órganos, incluyendo pulmón e intestino. La fibrosis quística (CF) de trastorno recesivo autosómico se causa por mutaciones del gen CFTR. La enfermedad de CF es altamente variable, y los pacientes tienen una esperanza de vida media de aproximadamente 40 años. Las mutaciones de pérdida de función causan transporte alterado de iones y de fluidos, que producen la acumulación de moco viscoso en el tracto pulmonar y gastrointestinal. Esto está asociado a infecciones bacterianas, inflamación aberrante y desnutrición. Se han descrito más de 1500 mutaciones, pero la mutación más dominante (~67 % de alelos mutantes totales en todo el mundo) es una delección de fenilalanina en la posición 508 (CFTR-delF508). Esto causa plegamiento incorrecto, retención de ER y degradación temprana de la proteína CFTR que impide la función en la membrana plasmática. Otras mutaciones en el gen CFTR que se han encontrado en pacientes con CF también alteran el plegamiento de las proteínas o deterioran la producción de proteínas, apertura, conductancia, corte y empalme y/o interacciones con otras proteínas.

La terapia actual para CF es principalmente sintomática y se centra en la reducción de la presión bacteriana, inflamación y normalización de la absorción de nutrientes y el crecimiento físico. Recientemente se han identificado múltiples compuestos que se dirigen a los defectos específicos de mutación de la propia proteína CFTR. Actualmente se realizan ensayos clínicos que usan compuestos que inducen i) ultralectura del codón de terminación prematuro, ii) corrección del tráfico de la membrana plasmática de CFTR (correctores), y iii) mejora de la apertura de CFTR (potenciadores). Recientemente se ha completado con éxito un ensayo clínico de fase III para un potenciador en pacientes con CF con una mutación CFTR-G551D, demostrando que el objetivo del fármaco específico de mutación es factible en CF. Las combinaciones de correctores y potenciadores se evalúan actualmente en un ensayo de fase II para el grupo de pacientes dominantes que alberga la mutación CFTR-delF508.

Aunque estos desarrollos recientes son muy prometedores, el nivel de restauración funcional de CFTR por estos fármacos en sistemas de modelo *in vitro* todavía está limitado. Además, los pacientes muestran respuestas variables a estas terapias debido a mecanismos todavía no definidos. La incapacidad para seleccionar estos subgrupos que no responden limita la eficacia clínica y el registro de fármacos. Juntos, esto indica que se necesita con urgencia el desarrollo de nuevos compuestos y cribados eficientes de eficacia de fármaco al nivel de pacientes individuales, así como el cribado de grandes bibliotecas para identificar compuestos novedosos. Hasta el momento, no están disponibles modelos de células primarias para cribar los compuestos que restauran la función de CFTR mutante, solo se han usado líneas celulares transformadas para identificar compuestos y su eficacia. Un modelo *in vitro* que permite la ampliación y el mantenimiento de células humanas primarias permitirá el análisis de la respuesta al fármaco de pacientes individuales e identificará subgrupos de pacientes con respuesta para cada tratamiento. Además, permitirá el cribado de bibliotecas de fármacos novedosos para su efecto en células primarias.

SUMARIO DE LA INVENCION

La invención proporciona un método *in vitro* de estudio de la eficacia de uno o más fármacos para tratar fibrosis quística, enfermedad renal poliquística o cólera, en el que el método comprende estimulación de uno o más organoides de fibrosis quística, enfermedad renal poliquística o cólera generados a partir de células primarias con dichos uno o más fármacos y medir la hinchazón del uno o más organoides, en el que hinchazón significa un cambio en el tamaño del uno o más organoides debido a la absorción o secreción de fluido.

La invención proporciona un método *in vitro* de diagnóstico de fibrosis quística, enfermedad renal poliquística o cólera, en el que el método comprende medir la hinchazón de uno o más organoides generados a partir de células primarias, en el que hinchazón significa un cambio en el tamaño del uno o más organoides debido a la absorción o secreción de fluido.

La divulgación describe un ensayo para diagnosticar una enfermedad o afección que afecta la absorción o secreción de fluido o para estudiar la eficacia de uno o más fármacos para tratar la enfermedad o afección, en el que el ensayo comprende medir la hinchazón de uno o más organoides.

La invención proporciona un método *in vitro* de cribado de una biblioteca de compuestos para identificar compuestos que afectan la absorción y/o secreción de fluido, en el que el método comprende:

estimulación de organoides generados a partir de células primarias con la biblioteca de compuestos;
 medir la hinchazón de dicho uno o más organoides, en el que hinchazón significa un cambio en el tamaño del
 uno o más organoides debido a la absorción o secreción de fluido; e
 5 identificar un compuesto que es capaz de inducir hinchazón de los organoides.

La invención proporciona el uso *in vitro* de uno o más organoides en un método como se expone en las reivindicaciones.

10 El término “ensayo” pretende ser equivalente a “método”. Por lo tanto, la divulgación también describe un método de diagnóstico de una enfermedad o afección que afecta la absorción o secreción de fluido o de estudio de la eficacia de uno o más fármacos para tratar la enfermedad o afección, en el que el método comprende medir la hinchazón de uno o más organoides.

15 La invención proporciona un ensayo cuantitativo rápido y simple para función de CFTR (u otras enfermedades o afecciones que afecten la absorción o secreción de fluido) en un método de cultivo basado en la cripta intestinal primaria¹⁵⁻¹⁷. Este método de cultivo permite a las células madre intestinales expandirse en organoides cerrados que contienen estructuras tipo cripta y una luz interna revestida por células diferenciadas, que da lugar a la arquitectura de tejido *in vivo*. El CFTR intestinal se expresa predominantemente en la membrana apical de las células de las
 20 criptas en las que su activación conduce a la secreción de electrólitos y fluidos¹⁸⁻²⁰. Se encontró que la forskolina²¹ inducía la hinchazón rápida de tanto organoides de control (HC) sanos humanos como de no mutantes murinos que dependen completamente de CFTR, como se demuestra por la estimulación de organoides intestinales derivados de ratones deficientes para CFTR o pacientes con CF, o tras la inhibición química de CFTR no mutante. Los niveles de hinchazón inducida por forskolina por organoides rectales expandidos *in vitro* son comparables a las corrientes de
 25 aniones inducidas por forskolina medidas en biopsias rectales humanas *ex vivo*. La temperatura y corrección química de la función de F508del-CFTR se detectó fácilmente por mediciones del transporte de fluido basadas en organoides, y las respuestas a un panel de fármacos que restauran CFTR fueron variables entre organoides rectales derivados de diferentes pacientes homocigotos F508del. Este ensayo robusto es la primera lectura funcional desarrollada en organoides humanos, y facilitará el diagnóstico, estudios funcionales, desarrollo de fármacos y
 30 medicina personalizada para CF y otras enfermedades y afecciones relacionadas.

Organoides

35 El término “organoide” se refiere a una colección *in vitro* de células que se asemejan a sus homólogos *in vivo* y forman estructuras 3D. Así, el ensayo es un ensayo *ex vivo* o *in vitro*.

En algunas realizaciones, los organoides del ensayo son organoides de mamífero, por ejemplo, organoides humanos o murinos, es decir, se derivan de células tomadas de un mamífero. El mamífero puede ser cualquier mamífero de interés, por ejemplo, un ser humano o ratón. En algunas realizaciones, los organoides son no humanos. En una
 40 realización preferida, los organoides son humanos.

En algunas realizaciones, los organoides del ensayo son organoides epiteliales u organoides endoteliales. En una realización preferida, los organoides son organoides epiteliales. En algunas realizaciones, los organoides no comprenden células no epiteliales, es decir, el único tipo de célula presente en el organoide es una célula epitelial.
 45

Los organoides del ensayo normalmente comprenden una luz, preferiblemente una luz cerrada. Las células del organoide normalmente forman una capa epitelial o capa endotelial alrededor de la luz, y se polarizan las células de la capa epitelial o capa endotelial. Por polarizado se entiende que la capa epitelial o capa endotelial imita la funcionalidad de una capa epitelial o capa endotelial *in vivo* de tal manera que tiene un lado basolateral funcional (orientado hacia fuera) y un lado apical funcional (orientado a la luz). Una disposición polarizada funcional es importante para el ensayo debido a que significa que todos los canales de iones se orientan en la misma dirección de modo que la absorción o secreción de fluido ocurre en una forma consistente, permitiendo que se produzca la hinchazón.
 50

En algunas realizaciones, los organoides del ensayo son organoides gástricos, intestinales (por ejemplo, intestino delgado, colónicos, recto, duodeno o íleon), pancreáticos, de próstata, pulmón, mama, riñón, vaso sanguíneo o de vaso linfático. Esto normalmente significa que los organoides se derivan de células gástricas, intestinales (por ejemplo, intestino delgado, colónicas, recto, duodeno o íleon), pancreáticas, de próstata, pulmón, mama, riñón, vaso sanguíneo o vaso linfático, respectivamente. Sin embargo, el experto entenderá que puede haber formas alternativas de generar un organoide que tiene un genotipo y fenotipo *in vivo*. Así, un organoide que tiene el genotipo y fenotipo *in vivo* del intestino está comprendido, para los fines de la presente invención, dentro de la definición de un organoide intestinal. Lo mismo aplica para los otros tipos de organoide enumerados anteriormente. En algunas realizaciones, el uno o más organoides son organoides intestinales o de pulmón.
 55

60 El término “asemeja” significa que el organoide tiene características genéticas y fenotípicas que permiten que sea reconocido por el experto como que es de o está asociado a un tipo de tejido particular (tal como los tejidos
 65

enumerados anteriormente). Esto no significa que el organoide tenga que ser necesariamente genéticamente y fenotípicamente idéntico (o aproximadamente) al tipo de célula de tejido *in vivo* correspondiente. Sin embargo, en una realización preferida, los organoides usados en el ensayo comprenden células que son genéticamente y fenotípicamente estables en relación con la célula *in vivo* o células de las que se derivó el organoide. Por genéticamente y fenotípicamente estable se entiende que no hay manipulación genética involucrada, solo un número mínimo de mutaciones (es decir, próximo al número normal de mutaciones que cabría esperar en células *in vivo*, por ejemplo, durante la replicación y síntesis de ADN).

Las líneas celulares y células iPS no son genéticamente y fenotípicamente estables según esta definición, por ejemplo, las células MDCK (por ejemplo, como se describe en Yang et al., J am Soc Nephrol 19 (7) 1300-1310, 2008) no son genéticamente y fenotípicamente estables. Tradicionalmente, las líneas celulares y más recientemente las células iPS se han usado como modelo de célula / órgano *ex vivo* (por ejemplo, Currid et al. J. Physiol. 555, 241-250, 2003) y/o modelos de enfermedad (por ejemplo, véase Robinton et al. Nature 481, 295, 2012; Yang et al., J am Soc Nephrol 19(7) 1300-1310, 2008). Sin embargo, tradicionalmente, estas células han sufrido varios retos y desventajas. Por ejemplo, las líneas celulares no siempre pueden obtenerse de todos los pacientes (solo ciertas biopsias producen satisfactoriamente líneas celulares debido a que solo con poca frecuencia y frecuentemente después de periodos de tiempo prolongados, las células comenzarán a proliferar permitiéndoles someterse a pases para convertirse a una línea celular; estas líneas celulares normalmente comprenden mutaciones que permiten inmortalidad) y, por lo tanto, las líneas celulares no pueden usarse en diagnósticos personalizados y medicina y son generalmente malos factores pronósticos del resultado terapéutico, por ejemplo, en el cribado de fármacos. Las células iPS también requieren normalmente algún nivel de manipulación genética para reprogramar las células en destinos de célula específica. Alternativamente, están sujetas a condiciones de cultivo que afectan la integridad cariotípica o genética y entonces el tiempo en cultivo debe mantenerse a un mínimo (éste también es el caso para células madres embrionarias humanas). Esto significa que las células iPS no pueden representar con precisión la situación *in vivo*, pero en cambio son un intento de imitar el comportamiento de células *in vivo*. Las líneas celulares y células iPS también padecen inestabilidad genética. Los organoides preferidos para uso en el método de la invención proporcionan una plataforma genéticamente y fenotípicamente estable que representa fielmente la situación *in vivo*. La integridad genética de las células madre de la invención puede confirmarse, por ejemplo, por análisis de cariotipo o análisis de secuenciación. Las células pueden ser cariotipadas usando métodos conocidos como se describe en Sato, T et al., (Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures *in vitro* without a mesenchymal niche. Nature 459, 262-265, 2009). Un "cariotipo normal" es uno en el que todos los cromosomas están presentes (es decir, euploidía) sin alteraciones notables. En consecuencia, en realizaciones preferidas, más del 50 %; más del 70 %; más del 80 %; más del 90 %; más del 95 %; o más del 99 % de las células en un organoide presentan cariotipos normales. Un "fenotipo normal" se refiere a células que presentan, a una primera aproximación, las mismas características visuales, expresión de gen y comportamiento que la célula homóloga *in vivo* promedio. En realizaciones preferidas de la invención, más del 50 %; más del 70 %; más del 80 %; más del 90 %; más del 95 %; o más del 99 % de las células en un organoide cultivado según la invención presentan fenotipos normales. Ejemplos de organoides genéticamente y fenotípicamente estables adecuados para uso con el método de la invención y métodos de obtención de tales organoides se proporcionan en los documentos WO2010/090513, WO2012/168930 y Sato et al., GASTROENTEROLOGY 2011; 141:1762-1772. Las células de estos organoides tienen un genoma particularmente estable y tienen una velocidad mutacional baja. Por ejemplo, los organoides intestinales pueden expandirse, mantenerse y diferenciarse según los métodos desvelados en estas solicitudes.

En algunas realizaciones, los organoides intestinales (tales como organoides intestinales pequeños) se obtienen usando un medio de cultivo para criptas del intestino delgado, tal como criptas del intestino delgado humano, que comprende o consiste de un medio basal (por ejemplo, que consiste de Advanced DMEM/F12 complementado con penicilina/estreptomicina, HEPES 10 mM, Glutamax, 1X N2, 1X B27 (todo de Invitrogen) y *N*-acetilcisteína 1 mM (Sigma)), y adicionalmente comprende: un factor de crecimiento mitogénico tal como EGF; un inhibidor de BMP, tal como Noggin; y uno cualquiera o más de Rspodin 1-4, tal como Rspodin-1 o 4. En algunas realizaciones, este medio de cultivo comprende además un inhibidor de TGF-beta (tal como A83-01) y/o un inhibidor de p38 (tal como SB202190). En algunas realizaciones, los organoides intestinales (tales como organoides colónicos) se obtienen usando un medio de cultivo para criptas colónicas, tales como criptas colónicas humanas, que comprende o que consiste de un medio basal, por ejemplo, como se ha descrito anteriormente, que comprende adicionalmente: un agonista de Wnt, tal como Wnt-3A recombinante o medio acondicionado con Wnt-3A; factor de crecimiento mitogénico, tal como EGF; un inhibidor de BMP, tal como Noggin; y uno cualquiera de Rspodin 1-4, tal como Rspodin-1 o 4 humano. En algunas realizaciones, este medio de cultivo comprende además un inhibidor de TGF-beta (tal como A83-01) y/o un inhibidor de p38 (tal como SB202190). En algunas realizaciones, el medio de cultivo para células madre intestinales humanas, criptas de intestino delgado humano o criptas colónicas humanas (también conocido como el medio de cultivo HISC), comprende o consiste de un medio basal, por ejemplo, como se ha descrito anteriormente, que comprende adicionalmente: un agonista de Wnt, tal como Wnt-3A humano recombinante o medio acondicionado con Wnt-3A; EGF; un inhibidor de BMP, tal como Noggin; Rspodin 1-4, tal como Rspodin-1 humano; un inhibidor de TGF-beta, tal como A83-01; un inhibidor de p38, tal como SB202190; gastrina; y nicotinamida. En algunas realizaciones, el inhibidor de p38 y/o la gastrina pueden excluirse del medio de cultivo HISC. En algunas realizaciones la divulgación describe un medio de cultivo para cultivar células intestinales, que comprende o que consiste en un medio basal, Wnt-3a, EGF, Noggin, uno cualquiera de Rspodin 1-4, un inhibidor de TGF-beta, nicotinamida, y preferiblemente un inhibidor de p38. En algunas realizaciones, el medio de cultivo para

expandir células madre del intestino delgado o del colon, por ejemplo, células del intestino delgado o del colon humano, comprende o consiste en un medio basal (por ejemplo, que comprende Advanced DMEM/F12, B27 (50x), n-acetilcisteína (1 mM) y glutamina/Glutamax), Wnt3A (medio opcionalmente condicionado), uno cualquiera de Rspodin 1-4 (preferiblemente 1 ug/ml), Noggin (preferiblemente 50-100 ng/ml), nicotinamida (preferiblemente 10 mM), EGF (preferiblemente 10-50 ng/ml), gastrina (preferiblemente 10 nM), un inhibidor de TGF-beta, por ejemplo, A83-01 (preferiblemente 500 nM). En una realización adicional, este medio de cultivo comprende adicionalmente un inhibidor de p38, por ejemplo, SB202190 (preferiblemente 100 nM). En una realización adicional, este medio de cultivo comprende adicionalmente un inhibidor de Rock, por ejemplo, LY2157299. En algunas realizaciones, el medio de cultivo para diferenciar células intestinales comprende o consiste en un medio basal, EGF, Noggin, un inhibidor de TGF-beta y un inhibidor de p38. En algunas realizaciones, el medio de cultivo para diferenciar células madre del intestino delgado o del colon, por ejemplo, células del intestino delgado o del colon humano, comprende o consiste en un medio basal (por ejemplo, que comprende Advanced DMEM/F12, B27 (50x), n-acetilcisteína (1 mM) y glutamina/Glutamax), Noggin (preferiblemente 50-100 ng/ml), EGF (preferiblemente 10-50 ng/ml), gastrina (preferiblemente 10 nM), un inhibidor de TGF-beta, por ejemplo, A83-01 (preferiblemente 500 nM) y un inhibidor de p38, por ejemplo, SB202190 (preferiblemente 100 nM). En algunas realizaciones, la gastrina puede excluirse de este medio de diferenciación. En algunas realizaciones, un inhibidor de gamma-secretasa puede añadirse al medio de diferenciación (preferiblemente en una concentración de 1 µM). Los inhibidores de gamma-secretasa pueden influir en las decisiones del destino celular durante la diferenciación, por ejemplo, hacia células secretoras, tales como células calciformes. En algunas realizaciones, puede añadirse un RANKL al medio de diferenciación (por ejemplo, a una concentración de 100 ng/ml). RANKL puede influir en las decisiones del destino celular durante la diferenciación, por ejemplo, hacia células M. Véase también el Ejemplo 2, para una descripción de cómo pueden generarse organoides para usar en la invención.

En algunas realizaciones, los organoides son organoides de "enfermedad". Similarmente a los organoides "normales", los organoides de enfermedad imitan el genotipo y fenotipo de enfermedad *in vivo*. Esto normalmente significa que se derivan de células *in vivo* con fenotipos de enfermedad. Sin embargo, puede haber otros medios para obtener organoides de enfermedad, por ejemplo, por mutación de un organoide normal. Así, en algunas realizaciones, los organoides tienen una enfermedad o aflicción. En algunas realizaciones, la enfermedad o aflicción se caracteriza por el transporte alterado de iones y/o fluidos. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la enfermedad o aflicción es fibrosis quística o cólera. Un organoide que tiene un genotipo y fenotipo de fibrosis quística se denomina en el presente documento un "organoide de fibrosis quística". Otros organoides de enfermedad se denominan de la misma manera. Diversas enfermedades y/o aflicciones se describen en más detalle en la sección de "enfermedades o aflicciones". Todas las enfermedades o aflicciones enumeradas en esta sección son relevantes para los organoides de enfermedad.

Los organoides del ensayo se generan a partir de células primarias, por ejemplo, de células humanas primarias. Por "primaria" se entiende que la célula es genéticamente sustancialmente idéntica a una célula *in vivo*. Por ejemplo, una célula primaria podría ser una célula tomada directamente de un paciente de interés. En una realización alternativa, una célula primaria se toma de un cultivo celular, preferiblemente un organoide, y en el que la velocidad de acumulación de mutaciones en las células es sustancialmente la misma como la velocidad de acumulación de mutaciones de células *in vivo*. En realizaciones preferidas, los organoides se generan a partir de células madre, preferiblemente células madre adultas, más preferiblemente células madre adultas que expresan Lgr5 (Barker et al., Cell Stem Cell 7,656 2010, documentos WO2010/090513, WO2012/168930 y Sato et al., GASTROENTEROLOGY 2011; 141:1762-1772). Los organoides de la invención no se generan a partir de células madre embrionarias humanas. En realizaciones preferidas, los organoides se generan y se mantienen usando el medio de cultivo y los métodos descritos en los documentos WO2010/090513, WO2012/168930 y/o Sato et al., GASTROENTEROLOGY 2011; 141:1762-1772.

En una realización, los organoides no se derivan de líneas celulares inmortalizadas derivadas de tumor o una célula de las mismas. En una realización, los organoides no se derivan de una población clonal de células o una célula de la misma. En una realización, los organoides no se derivan de una línea celular o una célula de una línea celular.

En algunas realizaciones, el método de la invención comprende además generar uno o más organoides expandiendo células madre en organoides cerrados que incluyen una luz cerrada sobre la membrana apical de las células.

En algunas realizaciones, el método de la invención comprende además generar uno o más organoides a partir de una célula primaria.

En algunas realizaciones, el método de la invención comprende además generar uno o más organoides intestinales expandiendo células madre intestinales en organoides cerrados que incluyen una luz cerrada sobre la membrana apical de las células.

Hinchazón

La hinchazón del uno o más organoides comprende un cambio en el tamaño, tal como un cambio en el área

superficial, diámetro y/o volumen, debido a la absorción o secreción de fluido, opcionalmente en la que la hinchazón comprende además un cambio en el contenido del organoide.

Los inventores han mostrado que los organoides normales tienen visiblemente y mediblemente diferentes fenotipos a organoides de enfermedad. Esta diferencia puede surgir de mutaciones en los canales de iones y proteínas reguladoras que regulan la absorción y secreción de fluido. Normalmente, la absorción y secreción de fluido se regula por el transporte activo de iones a través de membranas celulares o capas que conduce a cambios en la presión osmótica y al movimiento de agua dentro/fuera de la luz. Por ejemplo, en epitelios secretores normales, la secreción de fluido dentro de la luz está conducida por la salida de cloruro a través de la membrana apical celular que produce sodio transepitelial y secreción de agua. Esta acumulación de fluido luminal se imita por los organoides y, como se ha observado por primera vez por los inventores, causa "hinchazón" de los organoides normales. Esto produce organoides con presión interna relativamente alta (por ejemplo, en la luz) que fuerza a los organoides a una forma de bola turgente grande, produciendo normalmente el estiramiento celular que promueve la división y el adelgazamiento.

Por el contrario, un organoide de enfermedad caracterizado por transporte alterado de iones y/o de fluidos presenta "hinchazón anormal". En algunas realizaciones, un organoide de enfermedad puede tener hinchazón reducida (cuando se compara con un organoide normal), que se caracteriza por una reducción en uno o más de los rasgos descritos arriba, por ejemplo, menor presión interna, organoide más pequeño, menor turgencia, forma de bola reducida, estiramiento reducido, etc., cuando se compara con un organoide normal. Estas características producen una estructura más plegada (más extrusiones o estructuras tipo pliegue que forman la superficie del organoide). Un ejemplo de un organoide de enfermedad con hinchazón reducida es un organoide de fibrosis quística. La estimulación de los organoides con ciertos fármacos y/o compuestos también puede producir hinchazón reducida. Ejemplos de compuestos que producen hinchazón reducida son CFTRinh172 y GlyH-101 (por ejemplo, véanse las figuras 3 y 4). En realizaciones alternativas, un organoide de enfermedad puede tener hinchazón elevada (cuando se compara con un organoide normal), que se caracterizan por una mejora de uno o más de los rasgos descritos arriba por ejemplo, mayor presión interna, organoide más grande, mayor turgencia, forma de bola mejorada, elevado estiramiento, etc., cuando se compara con un organoide normal. Un ejemplo de un organoide de enfermedad con elevada hinchazón es un organoide del cólera. La estimulación de los organoides con ciertos fármacos y/o compuestos también puede producir hinchazón mejorada. Ejemplos de compuestos que producen hinchazón mejorada son forskolina, salbutamol, epinefrina, ritodrina, dopamina o toxina del cólera. Un ejemplo de un fármaco que produce hinchazón mejorada (particularmente cuando se estimula un organoide de fibrosis quística) es genisteína (por ejemplo, véase la figura 7). Otros fármacos de fibrosis quística que podrían producir hinchazón mejorada de organoides de fibrosis quísticas se enumeran en la Tabla 2.

En consecuencia, como se mencionó arriba, el grado de la hinchazón del organoide puede determinarse midiendo el cambio en el tamaño o el cambio en el contenido de uno o más organoides en el ensayo. El "cambio" puede referirse a la diferencia cuando un organoide normal se compara con un organoide de enfermedad y/o cuando un organoide de control se compara con un organoide que se ha estimulado por uno o más fármacos o compuestos. Alternativamente, el "cambio" puede referirse a la diferencia en la hinchazón de un organoide antes y después de la estimulación con un fármaco y/o compuesto.

Así, en algunas realizaciones, el cambio en el tamaño y/o el cambio en el contenido es el cambio en el tamaño en comparación con un organoide de control sano. En una realización preferida, el organoide de control sano es similar o sustancialmente idéntico al organoide de enfermedad, excepto que no tiene la enfermedad de interés. Por ejemplo, en una realización preferida, los organoides de control y de enfermedad se derivan del mismo tipo de tejido (por ejemplo, el tamaño de un organoide generado de una biopsia intestinal de CF se compararía con el tamaño de un organoide generado de una biopsia intestinal sana). Se entendería por el experto que los organoides son preferiblemente de la misma "edad", es decir, las células se han cultivado y/o sometido a pases un número similar de veces y/o el tamaño de partida es sustancialmente el mismo.

En una realización alternativa, el cambio en el tamaño y/o el cambio en el contenido es el cambio en el tamaño en comparación con un organoide de control que no se ha estimulado con uno o más fármacos. En una realización preferida, el organoide de control es similar o sustancialmente idéntico al organoide que se ha estimulado con uno o más fármacos, excepto que no se ha estimulado con uno o más fármacos. Por ejemplo, en una realización preferida se deriva del mismo tipo de tejido. Se entendería por el experto que los organoides son preferiblemente de la misma "edad", es decir, las células se han cultivado y/o sometido a pases un número similar de veces y/o el tamaño de partida es sustancialmente el mismo.

En una realización adicional, el cambio en el tamaño y/o el cambio en el contenido es el cambio en la hinchazón de un organoide antes y después de la estimulación con un fármaco y/o compuesto.

En algunas realizaciones, el cambio en el tamaño de organoide puede ocurrir concurrentemente con un cambio en el diámetro o volumen de la luz. Sin embargo, una de las ventajas del método de la invención es que permite usar el tamaño del organoide, en vez del tamaño de la luz, como una indicación de organoides sanos frente a enfermos frente a tratados con éxito. Currid et al., (2003) describe la observación de que el tratamiento con forskolina de líneas

celulares derivadas de tumor (con estructuras tipo organoide) produce la formación de una estructura tipo luz. Sin embargo, los autores no hacen la conexión de que esta formación de luz sería inhibida por enfermedades o afecciones que inhibieran la función del CFTR (u otras proteínas implicadas en transporte y secreción de fluido). Además, los “organoides” de Currid no cambian en tamaño en respuesta a tratamiento con forskolina; el único cambio parece ser la formación de la luz (en particular véase la figura 1 de Currid et al.). Por el contrario, el ensayo de la presente invención implica la observación de la hinchazón de los propios organoides. Esto es ventajoso ya que el tamaño global del organoide (por ejemplo, diámetro/volumen/área superficial) es mucho más fácil de medir. Por ejemplo, como se describe en los presentes ejemplos, bajo ciertas condiciones de etiquetado, el software de cuantificación no fue capaz de discriminar entre las células y la luz debido a la falta de contraste. Por lo tanto, no siempre es posible observar cambios en el tamaño de la luz. Por el contrario, es posible usar métodos de cuantificación automatizados para determinar cambios globales en el tamaño del organoide.

El cambio puede evaluarse por medición manual o automatizada del organoide, como se describe más adelante.

En algunas realizaciones, medir comprende medir cuantitativamente el cambio en el tamaño del organoide. Por cambio en el tamaño se entiende que hay un cambio en el área superficial y/o diámetro y/o volumen del organoide. En algunas realizaciones, el cambio en el tamaño será un cambio de al menos el 1 %, al menos el 2 %, al menos el 5 %, al menos el 10 %, al menos el 20 %, al menos el 50 % o más del área superficial y/o diámetro y/o volumen del organoide. En algunas realizaciones, el cambio en el tamaño es un cambio de al menos 2 veces, al menos 3 veces, al menos 4 veces, al menos 5 veces, al menos 6 veces al menos 7 veces, al menos 10 veces, al menos 20 veces o más del área superficial y/o diámetro y/o volumen del organoide. El cambio puede ser un aumento en el tamaño (hinchazón aumentada) o una disminución en el tamaño (hinchazón reducida). Por ejemplo, la Figura 8 muestra que la forskolina y la toxina del cólera hacen que los organoides humanos aumenten de tamaño más del doble en el espacio de 120 minutos.

En otras realizaciones, medir comprende observar la hinchazón del organoide. Esto puede implicar, por ejemplo, determinar el cambio en el contenido del organoide. Por cambio en el contenido se entiende que cambia el contenido o estructura del organoide. En algunas realizaciones, el cambio en el contenido se caracteriza por un cambio en la forma del organoide (por ejemplo, más tipo bola o más plegado o menos tipo bola o menos doblado); cambio en el tamaño celular y estiramiento y/o cambio en la presión interna y/o rigidez. Así, en algunas realizaciones, medir el cambio en el contenido o estructura comprende observar si el organoide se pliega o no más o menos, o, por ejemplo, determinar si un organoide de interés (un organoide de enfermedad o un organoide tratado con fármaco, respectivamente) es más grande o más pequeño que un organoide de control (por ejemplo, un organoide sano o un organoide tratado sin fármaco, respectivamente). En algunas realizaciones, si hay hinchazón reducida, el observar la hinchazón puede implicar determinar si se deshinchiza o se pliega más o no. El cambio en el contenido y estructura también puede medirse cuantitativamente.

En algunas realizaciones, la hinchazón del organoide puede observarse visiblemente de manera que puedan observarse uno o más de los rasgos descritos anteriormente. Debe entenderse que “visiblemente” no requiere visibilidad usando la simple vista, sino que incluye, por ejemplo, el uso de microscopía, técnicas de formación de imágenes y/o de tinción.

Podrían usarse diversas técnicas conocidas en la técnica para determinar el tamaño o contenido del organoide. En una realización preferida, el tamaño o contenido del organoide se determina usando formación de imágenes de célula viva, por ejemplo, usando un microscopio, tal como un microscopio confocal. En algunas realizaciones, los organoides se tiñen antes de la formación de imagen para mejorar el contraste de la imagen. En una realización adicional, los organoides se tiñen con colorantes permeables a la célula que opcionalmente emiten fluorescencia tras la conversión metabólica por las células vivas, por ejemplo, Cell tracker-Orange, Cell tracker-Green, Calcein-Green (todos comercialmente disponibles de Invitrogen). En una realización, los organoides se tiñen con Calcein-Green, opcionalmente a aproximadamente 10 μ M durante aproximadamente 60 minutos. Así, en algunas realizaciones el método de la invención comprende la etapa de teñir los organoides, por ejemplo, por incubación con un agente de tinción.

En algunas realizaciones, el cambio en el tamaño puede cuantificarse, por ejemplo, usando software de formación de imagen tal como el “Software de cuantificación Velocity”. En algunas realizaciones, el aumento del área de organoide total con respecto a T=0 (tiempo de estimulación) se calcula y opcionalmente se promedia de múltiples organoides. El área bajo la curva (ABC) puede calcularse, por ejemplo, usando Graphpad Prism, para mostrar el cambio en el área del organoide.

En algunas realizaciones, los organoides pueden experimentar hinchazón rápida, (por ejemplo, en respuesta a la estimulación por fármacos o compuestos) que puede detectarse dentro de horas, minutos o incluso segundos. Así, en algunas realizaciones del ensayo, la hinchazón del organoide se mide en menos de 48 horas, menos de 36 horas, menos de 24 horas, menos de 18 horas, menos de 12 horas, menos de 6 horas, menos de 1 hora, menos de 45 minutos, menos de 30 minutos, menos de 15 minutos, menos de 10 minutos, menos de 9 minutos, menos de 8 minutos, menos de 7 minutos, menos de 6 minutos, menos de 5 minutos, menos de 4 minutos, menos de 3 minutos, menos de 2 minutos, menos de 1 minuto o menos de 30 segundos.

En algunas realizaciones, los organoides pueden experimentar hinchazón lenta (por ejemplo, cuando se determina la diferencia entre un organoide enfermo y normal que no se han estimulado por fármacos o compuestos) que puede detectarse dentro de semanas o días. Así, en algunas realizaciones del ensayo, la hinchazón del organoide se mide en menos de 4 semanas, menos de 3 semanas, menos de 2 semanas, menos de 1 semana, menos de 6 días, menos de 5 días, menos de 4 días o menos de 3 días.

Estimulación de la hinchazón del organoide

En algunas realizaciones, el ensayo comprende la estimulación de uno o más organoides con un compuesto que es capaz de inducir la hinchazón, por ejemplo, un cambio en el tamaño, de los organoides.

Los inventores han mostrado que ciertos compuestos producen hinchazón del organoide mejorada. Por ejemplo, la forskolina, que se conoce por aumentar AMPc intracelular y así activar el receptor transmembranario de la fibrosis quística (CFTR) produce hinchazón del organoide mejorada, presuntamente debido a la elevada absorción de fluido en la luz del organoide. El efecto es dependiente de CFTR, como se demuestra usando inhibidores de CFTR que impiden la hinchazón inducida por forskolina. Así, los inventores han demostrado que los organoides estimulados por forskolina, u otros activadores de CFTR, mejoran el fenotipo hinchado visto en organoides normales y también mejora la hinchazón en organoides de enfermedad tratados con éxito. Este efecto puede usarse para mejorar el "cambio" en el tamaño o contenido del organoide medido en el método de la invención y para alcanzar respuestas del organoide rápidas, que podrían ser útiles para diagnóstico rápido, pruebas de fármaco o medicina personalizada.

La forskolina es un diterpeno de labdano, con la fórmula química $C_{22}H_{34}O_7$, que se produce por la planta coleo indio. Así, es un inhibidor de molécula pequeña con una masa molecular de 410,5 g/mol. Su ID de UPAC es: acetato de (3R,4aR,5S,6S,6aS,10S,10aR,10bS)-6,10,10b-trihidroxi-3,4a,7,7,10a-pentametil-1-oxo-3-vinildodecahidro-1H-benzo[f]cromen-5-ilo. La forskolina se usa comúnmente para aumentar los niveles de AMP cíclico en el estudio e investigación de fisiología celular. El salbutamol, epinefrina, ritodrina, dopamina y la toxina del cólera han demostrado tener un efecto similar a la forskolina en los organoides.

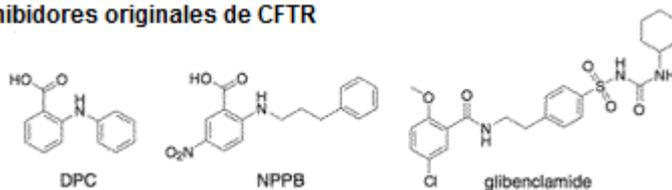
Así, en algunas realizaciones, el ensayo comprende la estimulación de uno o más organoides con un compuesto que es capaz de inducir un cambio en el tamaño de los organoides, en el que el compuesto activa indirectamente el CFTR, por ejemplo, por medio de la ruta de AMPc-PKA. En algunas realizaciones, el compuesto es forskolina, salbutamol, epinefrina, ritodrina, dopamina o toxina del cólera.

En algunas realizaciones, el compuesto es un receptor de proteína acoplada a G (GPCR) que mejora los niveles de AMPc. En algunas realizaciones, el compuesto es una molécula pequeña que mejora los niveles de AMPc, por ejemplo, forskolina. En algunas realizaciones, el compuesto es un diterpeno o diterpenoide, opcionalmente un diterpeno de labdano y/o un diterpeno tipo forskolina de diterpenoide como se describe, por ejemplo, en Rijo P et al. (Magn Reson Chem. 2005 Jul; 43(7):595-8).

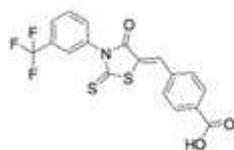
Se acepta generalmente que todos los reactivos asociados a la modulación de la secreción o absorción de fluido modulando la señalización celular regulan la función de los canales de iones de CFTR. Éstos incluyen moduladores de AMPc, GMPc, proteína cinasa A, proteína cinasa C, fosforilación de la actividad de CFTR y de ATP-asa de CFTR.

En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto que genera AMPc, tal como un estímulo de receptores adrenérgicos. Ejemplos de estímulos adrenérgicos incluyen, pero no se limitan a, isoproterenol, salbutamol, epinefrina; prostaglandina E2, VIP y sustancia P. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto que genera GMPc, tal como una guanilina o ácido biliar. En algunas realizaciones, el compuesto es un inhibidor de fosfodiesterasas, por ejemplo, milrinona, IBMX, sildenafilo (Viagra). En algunas realizaciones, el compuesto es un modulador del calcio, por ejemplo, ionomicina, acetilcolina o carbacol. En algunas realizaciones, el compuesto es un modulador de la señalización celular, tal como PI3K, Syk o p38. En algunas realizaciones, el compuesto es un modulador del plegamiento y tráfico de CFTR, por ejemplo, Vertex-809 y Vertex-661, SAHA, miARN-138. En algunas realizaciones, el compuesto es un modulador epigenético, por ejemplo, de SAHA o TSA. En algunas realizaciones, el compuesto es un modulador de la expresión de CFTR, tal como miARN-138, IL-1, TNF-alfa o regulador de p38. En algunas realizaciones, el compuesto es un modulador de la degradación de CFTR, tal como un inhibidor del proteasoma que incluye bortezomib o un modulador de la degradación asociada al retículo endoplásmico mediante rutas dependientes de ubiquitina. En algunas realizaciones, el compuesto es un inhibidor de CFTR adaptado de JR Thiagarajah et al. (Clin Pharmacol Ther, 2012 CFTR Inhibitors for Treating Diarrheal Disease), por ejemplo, uno de los compuestos mostrados a continuación:

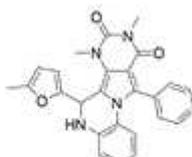
Inhibidores originales de CFTR



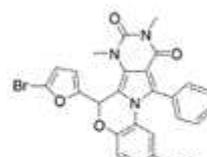
Inhibidores absorbibles



CFTR_{inh}-172
thiazolidinone



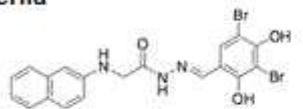
PPO-102



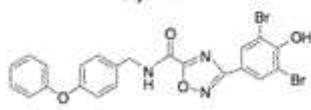
BPO-27

Inhibidores PPQ/BPO

Inhibidores de acción externa

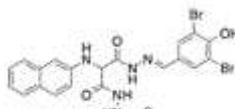


GlyH-101



IOWH032

hydrazides



MalH-lectin

LECTIN

Puede usarse cualquier compuesto adecuado para estimular uno o más organoides en el método de la invención. Por ejemplo, pueden usarse todos los reactivos asociados a la modulación de la secreción o absorción de fluido modulando la señalización celular para estimular uno o más organoides en el método de la invención. Ejemplos de compuestos que pueden usarse para estimular uno o más organoides en el método de la invención incluyen moduladores de AMPc, GMPc, proteína cinasa A, proteína cinasa C, fosforilación de la actividad de CFTR y de ATPasa de CFTR. Por ejemplo, otros compuestos que activan el CFTR y, por lo tanto, podrían reemplazar la forskolina en el ensayo incluyen toxina del cólera y salbutamol, y miméticos y derivados de los mismos.

En algunas realizaciones, el ensayo comprende la estimulación de uno o más organoides con un compuesto que es capaz de inducir un cambio en el tamaño de los organoides, en el que el compuesto es forskolina o un mimético o derivado de la misma. En una realización adicional, la hinchazón inducida por forskolina de organoides puede invertirse después de la eliminación de la forskolina lavando. Similarmente, la hinchazón de organoides causada por otros compuestos puede invertirse lavando para eliminar el compuesto.

Varios canales de iones no de CFTR y otras proteínas participan en la transferencia de organoide y sustancias inorgánicas a través de las membranas celulares en las membranas apical y basolateral, y, por lo tanto, afectan la secreción o absorción de fluido. Así, en algunas realizaciones, el compuesto activa indirectamente el CFTR u otro canal de iones o proteína reguladora implicada en la regulación de la absorción y secreción de fluido. En una realización alternativa, el compuesto activa directamente el CFTR u otro canal de iones o proteína reguladora implicada en la regulación de la absorción y secreción de fluido.

Los canales de iones diferentes del CFTR, y otras proteínas implicadas en la regulación de los canales de iones en células, también son importantes para la regulación de la homeostasis de fluidos y de electrolitos en las células. Por ejemplo, todos los canales de iones mostrados en las Tablas 1 y 2 participan en la regulación de la secreción y absorción de fluido en las células. En un ejemplo adicional, se predice que el CFTR ayuda a regular varios otros canales de iones que incluyen, pero no se limitan a: ORCC, ROMK⁺, ENaC, y el intercambiador Cl⁻/HCO³⁻. Se supone que los moduladores de estos canales de iones y proteínas reguladoras, tales como los activadores e inhibidores enumerados en las Tablas 1 y 2 (adaptado de Toczyłowska-Maminska et al, 2012, J of Cell Biochem 113: 426-432) funcionan de una manera similar a la forskolina mejorando o reduciendo la hinchazón de organoides. Así, en algunas realizaciones de la invención, el compuesto del ensayo que es capaz de inducir un cambio en el tamaño de los organoides activa o inhibe directamente o indirectamente uno cualquiera o más de los canales de iones en las Tablas 1 o 2 y/o uno cualquiera o más de intercambiador del ión NHE3, DRA, SGLT1, transportadores de ácidos grasos de cadena corta, ORCC, ROMK⁺, ENaC, o el intercambiador Cl⁻/HCO³⁻.

En algunas realizaciones, el compuesto del ensayo que es capaz de inducir un cambio en el tamaño de los organoides puede ser uno cualquiera o más de los activadores o inhibidores enumerados en las Tablas 1 o 2.

TABLA I. Activadores e inhibidores de proteínas de transporte en la membrana apical del epitelio bronquial humano.

Nombre	Gen	Activador	Inhibitor
5 canales K^+ TREK-1	kenk2	halotano, cloroformo, isoflurano, ácido araquidónico	lidocaina, quinidina, Gd^{3+} , fluoxetina bupivacaína
TW1K-1	kenk1	FMA	quinidina, Ba^{2+}
10 TWIK-2	kenk6	ácido araquidónico	halotano
TASK-2	kenk5	halotano	bupivacaína, quinina, quinidina, pH ácido, lidocaina, clofilium
Kir4.2	kvnj15	ATP	Ba^{2+}
15 canales Cl^- CFTR	cftr	ATP, forskolina, genisteína, floxina, apigenina	glibenclamida, ácido araquidónico, ibuprofeno
CaCC (CLCA)	clca1 clca2 tmem16a	ionomicina, >2 mM Ca^{2+} , norepinefrina, ATP, endotelina	ácido niflúmico, DIDS, DTT
20 VSOR	no conocido	H_2O_2	glibenclamida, DIDS, NPPB, ácido niflúmico, Mg^{2+} , verapamilo
25 canales Na^+ ENaC	enac	aldosterona, insulina, vasopresina	amilorida, triamtereno, benzamilol
Transportadores de Iones			
30 Na/H ion intercambiador	nhe1	pH ácido	angiotensina II, amilorida
HKATPase	atp1a1	histamina	ouabaina, oligomicina, SCH28080

TABLA II. Activadores e inhibidores de proteínas de transporte en la membrana basolateral del epitelio bronquial humano

Nombre	Gen	Activador	Inhibidor
40 Canales K^+ KvLQT1	kenq1	cAMP, Ca^{2+} , 1-EBIO	compuesto cromanol 293B, clofilium, linopirdina, Ba^{2+}
45 hIK-1 (hSK4, KCa3.1)	kenn4	1-EBIO, Ca^{2+} , 7,8-benzoquinolina	clotrimazol, ChTx, Ba^{2+}
Canales Cl^- ORCC	no conocido	cAMP Gd^{3+}	DIDS
50 Canales Cl^- ClC-2	clc-2	pH ácido, lubiprostona, ácido araquidónico, omeprazol	Zn^{2+}
bestrophins	best1	NO, ATP, ionomicina	DIDS, ácido niflúmico
transportador de Iones			
transportador de ion Na_2HCO_3	nbc1, nbc4	forskolina, calmodulina, carbacol	DIDS, DNDS
60 transportador de ion NaK_2Cl	nkcc1	ATP, pinacidil	bumetanida, furosemida, bumetanida, torsemida
intercambiador de ion Cl^-/HCO_3^-	ac2	NH_4^+	calmidazol, pH ácido, DNDS, DIDS
65 NaKATPase (NKA, EC 3.6.1.3)	atp1q, atp1a2	tirotopina, aldosterona	β -mercaptoetanol, vanadato, DTT, ouabaina, oligomicina, 3,4,5,6-tetrahidroxi-xantona, oleandrina, digoxina

En algunas realizaciones, los compuestos capaces de inducir un cambio en el tamaño para su uso en el método de la invención pueden ser, por ejemplo, proteínas, péptidos, moléculas pequeñas sintéticas, adaptámeros, ácidos nucleicos (tal como compuestos antisentido) o anticuerpos (o fragmentos de los mismos).

- 5 En una realización adicional, algunos organoides, tales como organoides de CFTR-delF508 de ratón, tienen actividad de CFTR residual mayor que la de los homólogos humanos (por ejemplo, véase la Figura 6), y responden a corrección de CFTR por temperatura, así como compuestos por hinchazón elevada inducida por forskolina.

10 Las mutaciones en los canales de iones (tales como aquellas mencionadas arriba o enumeradas en las Tablas 1 y 2) y proteínas reguladoras pueden causar el transporte alterado de iones y de fluido que produce fenotipos de enfermedad que incluyen, pero no se limitan a: diarrea inducida por bacterias (por ejemplo, causada por el cólera, u otras toxinas bacterianas); infección por rotavirus; *E. coli* enterohemorrágica; adrenoleucodistrofia; asma, enfermedad de Tangier; resistencia multi-fármaco (muchos cánceres, así como algunas bacterias resistentes a los antibióticos); colestasis obstructiva y enfermedad renal poliquística. Así, en algunas realizaciones de la invención, la enfermedad o afección diagnosticada o estudiada por el método de la invención se selecciona de: diarrea inducida por bacterias causada por el cólera y enfermedad renal poliquística. En algunas realizaciones de la divulgación, la enfermedad o afección diagnosticada o estudiada por el método de la invención se selecciona de: diarrea inducida por bacterias causada por otras toxinas bacterianas; infección por rotavirus; *E. coli* enterohemorrágica; adrenoleucodistrofia; asma, enfermedad de Tangier; resistencia multi-fármaco (muchos cánceres, así como algunas bacterias resistentes a los antibióticos) y colestasis obstructiva. El experto entendería qué canales de iones y qué mutaciones hay que seleccionar como diana dependiendo de la enfermedad que se estudia.

25 La invención proporciona un método según la invención, que comprende la estimulación de uno o más organoides con un compuesto que dirige el CFTR y que forma imágenes de uno o más organoides, por lo cual la hinchazón inducida por compuesto de uno o más organoides es dependiente de CFTR.

La invención también proporciona un método para el cribado de una biblioteca de compuestos para identificar compuestos que afectan la absorción y/o secreción de fluido, en el que el ensayo comprende:

- 30 estimulación de uno o más organoides con la biblioteca de compuestos;
formación de imágenes de la hinchazón de dicho uno o más organoides; e
identificación de un compuesto que es capaz de inducir la hinchazón de los organoides.

35 Debe entenderse que cualquiera de los compuestos enumerados en esta sección puede ser igualmente aplicable como ejemplos de fármacos para el cribado de fármacos y medicina personalizada. A la inversa, cualquiera de los ejemplos de fármacos proporcionados en el cribado de fármacos y la sección de medicina personalizada puede ser igualmente aplicable como ejemplos de compuestos para inducir la hinchazón del organoide. Una diferencia que puede existir entre compuestos apropiados para estimular la hinchazón del organoide en el ensayo frente a los fármacos que podrían probarse en el ensayo es que los compuestos normalmente actúan aguas arriba de los canales de iones y/o proteínas que regulan la secreción y absorción de fluido en una célula y de ese modo mejoran (o reducen) la hinchazón del organoide. Por el contrario, los fármacos normalmente actúan en y/o aguas abajo de los canales de iones y/o proteínas disfuncionales para corregir la secreción y absorción normal de fluido.

45 Enfermedad o afección

En algunas realizaciones, la invención proporciona un método *in vitro* según la reivindicación 1 o la reivindicación 2 para el diagnóstico de fibrosis quística, enfermedad renal poliquística o cólera que afecta la captación o secreción de fluido (de organoides y/o las células de los organoides) o para estudiar la eficacia de uno o más fármacos para tratar fibrosis quística, enfermedad renal poliquística o cólera.

50 Así, en una realización, la invención proporciona un método según la invención en el que la hinchazón de uno o más organoides es una medida del efecto de mutación de CFTR y/o el tratamiento con fármaco.

55 Otras enfermedades o afecciones que son relevantes para uso con el ensayo de la divulgación incluyen, pero no se limitan a: diarrea inducida por bacterias (por ejemplo, *E. coli* enterohemorrágica); infección por rotavirus; adrenoleucodistrofia; asma, enfermedad de Tangier; resistencia multi-fármaco (muchos cánceres, así como algunas bacterias resistentes a los antibióticos); colestasis obstructiva, COPD, fumar, sinusitis, insuficiencia pancreática, pancreatitis, infertilidad, desnutrición, enfermedades inflamatorias, enfermedad renal, enfermedad alérgica, osteoporosis, diabéticos, hipertensión, hipotensión, diarrea inducida por patógenos (cólera, *E. coli*), 'deseccación', cirrosis hepática, insuficiencia del hígado, tumorigénesis. El fumar puede reducir la función de CFTR y por lo tanto la tos del fumador u otros efectos secundarios de fumar son otras afecciones que son relevantes para el uso con el método de la invención.

65 El CFTR también juega un papel importante en la patogénesis de la enfermedad renal poliquística, particularmente la enfermedad renal poliquística dominante autosómica (Li et al., Am J Physiol Renal Physiol 303, 1176-1186, 2012). Las mutaciones en las proteínas de policistina conducen a la formación de quistes epiteliales que contienen una

cavidad llena de fluido rodeada por una única capa de células epiteliales renales inmaduras (por ejemplo, Sullivan et al., J. Am Soc Nephrol 9, 903-916, 1998). La acumulación de fluido dentro de estos quistes implica movimientos de Cl⁻ transepitelial estimulados por AMPc que recuerdan a aquellos encontrados en epitelios secretores afectados por fibrosis quística (por ejemplo, Torres et al., Lancet 369, 1287-1301, 2007). Se ha mostrado que la mutación F508del-CFTR interrumpe la formación de quistes renales. Esto muestra que el ensayo también sería adecuado para el diagnóstico de la enfermedad renal poliquística y para estudiar la eficacia de uno o más fármacos para tratar enfermedad renal poliquística. El ensayo también sería adecuado para otras enfermedades, tales como aquellas enumeradas arriba, que producen disfunción del transporte de fluido similar.

En algunas realizaciones, la enfermedad o afección está asociada a una mutación de pérdida de función de un canal de iones, por ejemplo, CFTR, ORCC, ROMK⁺, ENaC, o el intercambiador Cl⁻/HCO³⁻, o está asociada a una mutación de pérdida de función de otras proteínas asociadas a la regulación de estos canales de iones. En algunas realizaciones, la enfermedad o afección está asociada a una eliminación de fenilalanina en la posición 508 (CFTR-delF508). Esto causa plegamiento incorrecto, retención de ER y degradación temprana de la proteína CFTR que impide la función en la membrana plasmática. Así, en algunas realizaciones, la enfermedad o afección se caracteriza por plegamiento incorrecto, retención de ER y/o degradación temprana de la proteína CFTR. En algunas realizaciones, la enfermedad o afección está asociada a una o más mutaciones en el gen CFTR que altera el plegamiento de proteínas, producción de proteínas, apertura, conductancia, corte y empalme y/o interacciones con otras proteínas. En algunas realizaciones, la enfermedad o afección está asociada a la mutación CFTR-G551D. En algunas realizaciones, la enfermedad o afección está asociada a la mutación CFTR-G542X. En algunas realizaciones, la enfermedad o afección está asociada a la mutación CFTR-L927P. En algunas realizaciones, la enfermedad o afección está asociada a la mutación CFTR-E60X. En algunas realizaciones, la enfermedad o afección está asociada a la mutación CFTR-4 015delATTT. En algunas realizaciones, la enfermedad o afección está asociada a la mutación CFTR-A455E (véase, por ejemplo, la figura 14a). En algunas realizaciones, la enfermedad o afección puede ser causada por el alelo homocigoto de una cualquiera de las mutaciones mencionadas anteriormente. En una realización alternativa, la enfermedad o afección puede ser causada por el alelo heterocigoto de cualquier combinación de las mutaciones anteriores o una combinación de la mutación anterior con un gen CFTR normal (no mutante). En algunas realizaciones, una mutación de pérdida de función en CFTR conduce a fibrosis quística, y esta enfermedad puede detectarse y/o diagnosticarse por observación de la reducción en la hinchazón del organoide en comparación con un organoide sano normal.

En una realización alternativa, la funcionalidad de CFTR se altera por una toxina, tal como una toxina bacteriana, tal como la toxina del cólera, y así la toxina del cólera puede detectarse y/o diagnosticarse por observación de hinchazón del organoide mejorada en comparación con un organoide sano normal.

Las enfermedades y/o afecciones anteriormente mencionadas también son relevantes para los tipos de organoide de enfermedad que se han mencionado anteriormente. Puede usarse un organoide de enfermedad como un modelo de enfermedad para estudiar el efecto de fármacos en un fenotipo y/o genotipo de enfermedad particular, opcionalmente para el descubrimiento de fármacos o para medicina personalizada, tal como elección del tratamiento con fármaco, como se explica en más detalle más adelante.

La invención proporciona un método *in vitro* según la invención que además comprende correlacionar la hinchazón de uno o más organoides con:

- la presencia o gravedad de la enfermedad o afección, o
- la capacidad de respuesta del organoide al tratamiento con un fármaco conocido o supuesto o la eficacia de un fármaco conocido o supuesto.

Uso del ensayo en el diagnóstico

La invención proporciona un método *in vitro* para el diagnóstico de fibrosis quística, enfermedad renal poliquística o cólera, en el que el método comprende medir la hinchazón de uno o más organoides generados a partir de células primarias, en el que hinchazón significa un cambio en el tamaño de uno o más organoides debido a la absorción o secreción de fluido.

La invención también proporciona un método *in vitro* según la invención, para su uso en el diagnóstico de una enfermedad o afección de fibrosis quística, enfermedad renal poliquística o cólera, en el que el método comprende medir la hinchazón de uno o más organoides generados a partir de células primarias, en el que hinchazón significa un cambio en el tamaño de uno o más organoides debido a la absorción o secreción de fluido.

La invención también proporciona un método *in vitro* según la invención, que comprende medir la hinchazón de uno o más organoides generados a partir de un paciente que se diagnostica, por ejemplo, con fibrosis quística o cólera, y comparar esto con la hinchazón en uno o más organoides de un control sano.

En algunas realizaciones, el método comprende además la estimulación de uno o más organoides con un

compuesto, tal como forskolina, que mejora el fenotipo de hinchazón normal.

En algunas realizaciones, el cambio en el hinchazón del organoide de paciente en comparación con el organoide sano indica la presencia de la enfermedad o afección. Además, la cuantificación del cambio en el tamaño puede demostrar la presencia de la enfermedad o afección y/o su gravedad. Por ejemplo, la hinchazón reducida de un organoide de paciente podría indicar la presencia de un CFTR disfuncional (u otro canal de iones o proteína reguladora que afecta la absorción o secreción de fluido). Por ejemplo, en algunas realizaciones, el cambio se ejemplifica por comparación de hinchazón inducida por forskolina en organoides crecidos de un control sano o un paciente con CF que lleva mutaciones de F508del homocigóticas (por ejemplo, véase la Figura 5a). En algunas realizaciones, esto indicaría un diagnóstico positivo para fibrosis quística. Alternativamente, la elevada hinchazón de un organoide de paciente podría indicar la presencia de un CFTR superactivo (u otro canal de iones o proteína reguladora que afecta la absorción o secreción de fluido). En algunas realizaciones, esto indicaría un diagnóstico positivo para cólera. El diagnóstico de una enfermedad o afección, tal como fibrosis quística o cólera, puede luego conducir al tratamiento del paciente para la enfermedad o afección relevante.

La invención también proporciona el uso de uno o más organoides para el diagnóstico de fibrosis quística, enfermedad renal poliquística o cólera, en el que dicho diagnóstico comprende el uso de un ensayo según la invención.

La divulgación también proporciona un método de tratamiento de un paciente, en el que el método comprende el uso del método de la invención para el diagnóstico, en el que si se obtiene un diagnóstico positivo, el paciente se trata para la enfermedad o afección.

Un agente terapéutico para su uso en el tratamiento de fibrosis quística, enfermedad renal poliquística o cólera, en el que dicho tratamiento comprende diagnosticar un paciente por la presencia de fibrosis quística, enfermedad renal poliquística o cólera usando un método de la invención y en el que si se obtiene un diagnóstico positivo, el paciente se trata para la fibrosis quística, enfermedad renal poliquística o cólera.

En algunas realizaciones, el paciente se trata usando uno o más fármacos identificados usando un método de cribado de fármacos de la invención como se describe a continuación.

Uso del ensayo en el cribado de fármacos

La invención también proporciona un método según la invención para su uso en el cribado de fármacos, por ejemplo, para el cribado de una biblioteca de posibles fármacos.

En algunas realizaciones, el ensayo es un ensayo de cribado de alto rendimiento. Por ejemplo, en algunas realizaciones, los organoides se cultivan en un formato de matriz, por ejemplo, en placas de múltiples pocillos, tales como placas de 96 pocillos o placas de 384 pocillos.

En algunas realizaciones, los organoides en el cribado de fármacos, por ejemplo, en la matriz, se derivan de un paciente individual. En algunas realizaciones, los organoides en el cribado de fármacos, por ejemplo, en la matriz, se derivan de diferentes pacientes. En otras realizaciones, el cribado de fármacos, por ejemplo, la matriz, comprende organoides derivados de uno o más pacientes enfermos, además de organoides derivados de uno o más controles sanos.

Pueden usarse bibliotecas de moléculas para identificar una molécula que afecta los organoides. Bibliotecas preferidas comprenden bibliotecas de fragmentos de anticuerpos, bibliotecas de presentación de fagos de péptidos, bibliotecas de péptidos (por ejemplo, LOPAP™, Sigma Aldrich), bibliotecas de lípidos (BioMol), bibliotecas de compuestos sintéticos (por ejemplo, LOP AC™, Sigma Aldrich), bibliotecas de compuestos naturales (Specs, TimTec) o bibliotecas de moléculas pequeñas. Además, pueden usarse bibliotecas genéticas que inducen o reprimen la expresión de uno o más genes en la progenie de las células madre. Estas bibliotecas genéticas comprenden bibliotecas de ADNc, bibliotecas antisentido, y ARNip u otras bibliotecas de ARN no codificante. Las células pueden exponerse a múltiples concentraciones de un agente de prueba durante un cierto periodo de tiempo. Al final del periodo de exposición, los cultivos se evalúan. El término “que afecta” se usa para cubrir cualquier cambio en una célula, que incluye, pero no se limita a, una reducción en, o pérdida de, proliferación, un cambio morfológico, y muerte celular.

En algunas realizaciones, los organoides pueden usarse en el ensayo para probar bibliotecas de productos químicos, anticuerpos, producto natural (extractos de planta), etc., para idoneidad para su uso como fármacos, cosméticos y/o medicinas preventivas. Por ejemplo, en algunas realizaciones, una biopsia de célula de un paciente de interés, tal como células intestinales de un paciente con fibrosis quística, puede cultivarse usando medio de cultivo y métodos de la invención y luego tratarse con un fármaco o una biblioteca de cribado. Entonces es posible determinar qué fármacos restauran eficazmente la función al canal de iones defectuoso u otra proteína reguladora. Esto permite probar la capacidad de respuesta del paciente específico a un fármaco particular, permitiendo así que el tratamiento se adapte a un paciente específico. Así, esto permite un enfoque de medicina personalizada, que se

describe en más detalle más adelante.

La ventaja añadida de usar los organoides para identificar fármacos de esta manera es que también es posible cribar organoides normales (organoides derivados de tejido sano) para verificar qué fármacos y compuestos tienen efecto mínimo sobre el tejido sano. Esto permite el cribado para fármacos con actividad inespecífica mínima o efectos secundarios no deseados.

En algunas realizaciones, el ensayo es para probar el efecto de fármacos novedosos en la restauración funcional de canales de iones mutantes u otras proteínas implicadas en regular la absorción o secreción de fluido. En algunas realizaciones, la restauración funcional comprende restauración de la traducción, transcripción, de loci de genes o interactores biológicos, para el tratamiento de enfermedades y afecciones asociadas a la absorción o secreción de fluido.

Por ejemplo, los inventores observaron hinchazón inducida por forskolina en organoides de CF tras la adición de fármacos que son conocidos por corregir la función de CFTR *in vitro* (Figura 5b). Así, en algunas realizaciones, el método de la invención puede usarse para medir el efecto de tratamientos existentes o novedosos para CFTR.

En algunas realizaciones, la invención proporciona un método *in vitro* usando los organoides para probar el efecto de fármacos novedosos para tratar deficiencia de CFTR a través de la corrección de la función de CFTR.

En algunas realizaciones, el ensayo es para probar el efecto de fármacos novedosos en la restauración funcional de proteína CFTR mutante, o restauración funcional de la traducción de CFTR, transcripción, loci de genes CFTR o interactores biológicos de CFTR, por ejemplo, para tratamiento de fibrosis quística o toxinas microbianas, tales como cólera. En algunas realizaciones, los fármacos son potenciadores o correctores. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el potenciador es genisteína (véase, por ejemplo, la figura 7, que muestra que la genisteína puede inducir hinchazón de organoide rápida).

La restauración funcional de CFTR comprende restauración funcional de proteína CFTR mutante, restauración funcional de la traducción de CFTR (por ejemplo, codones de detención prematura), transcripción (por ejemplo, defectos de corte y empalme), o restauración funcional del gen CFTR (por ejemplo, terapia génica) o el interactoma de CFTR (algunas mutaciones afectan las interacciones proteína-proteína requeridas para la función de CFTR).

En algunas realizaciones, el ensayo para el cribado de fármacos es para identificar fármacos que se dirigen a los defectos específicos de mutación en canales de iones u otras proteínas implicadas en regular la absorción o secreción de fluido, por ejemplo, defectos específicos de mutación de la propia proteína CFTR. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el ensayo para el cribado de fármacos es para identificar fármacos que inducen i) ultralectura del codón de terminación prematuro, ii) corrección del tráfico de la membrana plasmática de CFTR (correctores), y/o iii) mejora de la apertura de CFTR (potenciadores). En algunas realizaciones, el ensayo para el cribado de fármacos es para identificar combinaciones de correctores y potenciadores, por ejemplo, para el tratamiento del grupo de pacientes dominantes de CFTR-deltaF508.

En algunas realizaciones, el ensayo para el cribado de fármacos comprende la estimulación de uno o más organoides con un fármaco conocido para tratar la enfermedad o afección de interés, o que es probado por su eficacia en tratar la enfermedad o afección de interés, en el que la mejora o reducción de la hinchazón del organoide es indicativa de un fármaco eficaz para el tratamiento de dicha enfermedad o afección.

En algunas realizaciones, el fármaco que se prueba se selecciona de una molécula pequeña sintética, proteína, péptido, anticuerpo (o derivado de los mismos), aptámero y ácido nucleico (tal como un compuesto antisentido).

En una realización adicional, el ensayo para el cribado de fármacos comprende adicionalmente la estimulación de uno o más organoides con un compuesto, tal como forskolina, que es capaz de mejorar la hinchazón de los organoides.

En algunas realizaciones, el ensayo para el cribado de fármacos comprende

- estimulación de uno o más organoides con un compuesto que es capaz de inducir la hinchazón de los organoides;
- estimulación de uno o más organoides con un fármaco conocido por afectar la función de CFTR o con un fármaco que es probado por su eficacia en afectar la función de CFTR; y
- formación de imágenes de la hinchazón de uno o más organoides, y opcionalmente comparar la hinchazón del organoide con la hinchazón de un organoide que se ha estimulado con el compuesto, pero no se ha estimulado con el fármaco;

en el que la hinchazón de uno o más organoides en respuesta a la estimulación por el fármaco indica que el fármaco es eficaz para el tratamiento de restauración funcional de CFTR mutante.

En algunas realizaciones, el ensayo comprende además la etapa de seleccionar el fármaco eficaz y opcionalmente usar dicho fármaco para el tratamiento.

La invención también proporciona el uso de uno o más organoides para el cribado de fármacos, en el que el cribado de fármacos comprende usar un ensayo según la invención.

Uso del ensayo en medicina personalizada

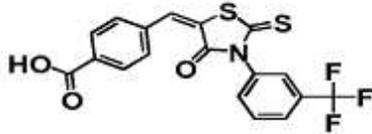
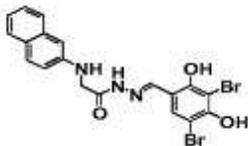
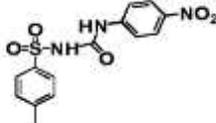
En algunas realizaciones, la invención proporciona un método en el que los organoides son organoides del intestino delgado derivados de pacientes para la evaluación de la capacidad de respuesta individual a ciertas opciones de tratamiento.

En algunas realizaciones, el ensayo comprende la estimulación de uno o más organoides con uno o más fármacos, por ejemplo, para su uso en medicina personalizada.

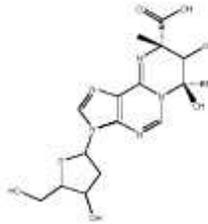
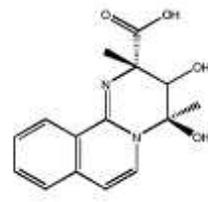
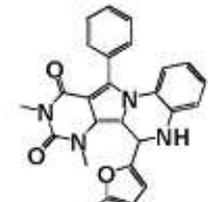
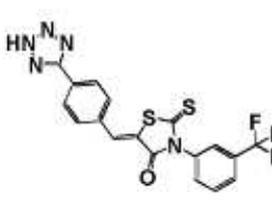
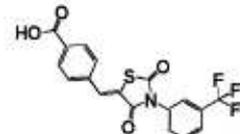
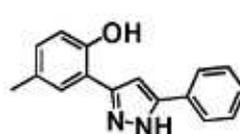
En algunas realizaciones, la invención proporciona un método para su uso en medicina personalizada, por ejemplo, para probar la respuesta de pacientes individuales a fármacos para fibrosis quística, enfermedad renal poliquística o cólera.

En algunas realizaciones, la invención proporciona un método *in vitro* usando organoides para probar la respuesta de pacientes individuales a fármacos tales como correctores o potenciadores u otros fármacos usados para tratar CF, por ejemplo, cualquiera de los fármacos mostrados en la Tabla 3 o Tabla 4.

Tabla 3: Ejemplos de fármacos conocidos para fibrosis quística

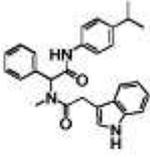
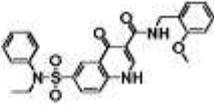
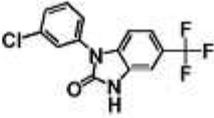
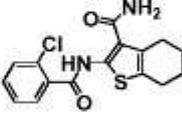
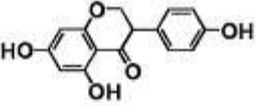
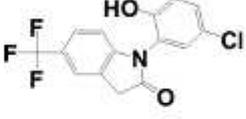
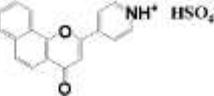
ID	Nombre Químico	Estructura Química	Comentarios
Bloqueador(B); Potenciador(P); Corrector(C);Trato (T)			
B1	4-[4-Oxo-2-tioxo-3-(3-trifluorometil-penil)-tiazolidina-5-metil ilideno]-ácido benzoico		Referencia #** 1 Nombre: CFinh-172 Potencia :Ki= 300 nM Solvente DMSO Consejos para uso: iniciolento de la inhibición en algunos tipos de células(eg.células T84) que requiere la incubación prolongada.M.W.: 409
B2	(Naftaleno-2-ilamino)- ácido acético (3,5-dibromo-2,4,-dihidroxi-bencilideno)- hidrazida		Referencia #** 2 Nombre: GlyH-101 Potencia :Ki= 5 microM Solvente :DMSO Consejos para uso: M.W.: 493
B3	Diarilsulfonilurea		Referencia #** 3 Nombre: DASU-01 Potencia :Ki > 100 microM Solvente: agua o regulador Consejos para uso: Útil para analisis de ruido CFTR M.W. 335.3

(continua)

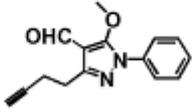
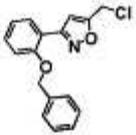
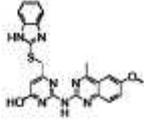
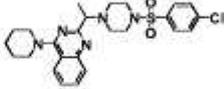
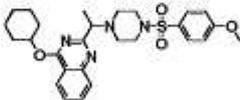
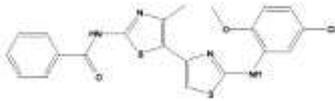
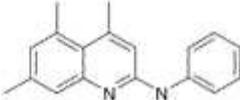
ID	Nombre Químico	Estructura Química	Comentarios
Bloqueador(B); Potenciador(P); Corrector(C);Trato (T)			
5 10	B4 (7R,9S)-7,8-dihidroxi-3-(4-hidróxi-5(hidroximetil)tetrahydrofurano-2-yl)-7,9-dimetil-3,7,8,9-tetrahidropirimido [1,2-i] purina-9-ácido carboxílico		Referencia ***16 Nombre: Blocker Sab Potencia :Ki < 100 pM pero verRef.#17 Solvente : agua o regulador Consejos para uso: M.W.395.37
15 20	B5 (2S,4R)-3,4- dihidroxi-2,4-dimetil-3,4-dihydro-2H-pyrimido[2,1-isoquinolina-2-ácido carboxílico		Referencia *** 16 Nombre: Blocker Bab Potencia :Ki < 20 nM pero ver Ref.# 17 Solvente: agua o regulador Consejos para uso: M.W. 288.3
25 30	B6 7,9- dimetil -11-penil -6-(5-metilfurano-2-yl)-5,6- dihidro-pirimida-[4',5'-3,4]pyrrolo[1,2-a]quinoxalina -8, 10-(7H,9H)-diona		Referencia # 22 Nombre:PPQ-102. Potencia : Ki=90 nM Solvente: DMSO Consejos para uso: M.W. 438.48
35 40	B7 5-[[4-(2h-tetrazol-5-yl) penil]metileno]-2-tioxo-3-[3-(trifluorometil)penil]-4-tiazolidinona		Referencia # 23 Nombre: Tetrazolo-Inh.-172. Potencia :Ki- 1 microM Solvente: DMSO Consejos para uso: Siendo más soluble en agua que en Inh.-172 M.W. 433.43
45 50	B8 4-[[3-[3- trifluorometil)penil]-2,4-dioxo-5-tiazolidinilideno] metil]ácido benzoico		Referencia # 23 Nombre: Oxo-Inh.-172. Potencia : Ki- 1 microM Solvente: DMSO Consejos para uso: Siendo más soluble en agua que en Inh.-172 M.W. 393.34
55 60	P1 4-Metil- 2-(5-phenyl-1H-pyrazol-3-yl)-fenol		Referencia ***12 & 15 Nombre: VRT-532 Potencia :Ks 3 to 5 microM Solvente: DMSO Consejos para uso: M.W.: 250

65

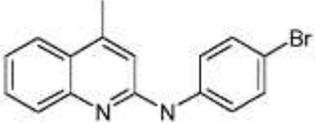
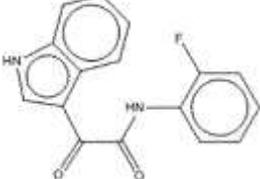
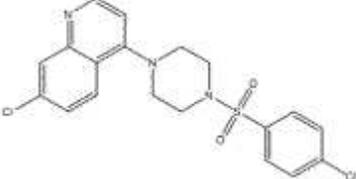
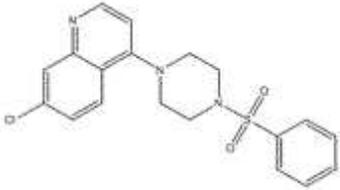
(continua)

ID	Nombre Químico	Estructura Química	Comentarios
Bloqueador(B); Potenciador(P); Corrector(C);Trato (T)			
P2	2-[(2-1H-Indol-3-yl-acetil)-metil-amino]-N-(4-isopropil-fenil)-2-fenil-acetamida		Referencia #** 4 Nombre: PG-01 Potencia :Ks= 300 nM Solvente : DMSO Consejos para uso: M.W.:439.5
P3	6-(Etil-fenil-sulfonil) -4-oxo-1,4-dihidro-quinolina-3-ácido carboxílico 2-metoxi-benzilamida		Referencia #** 4 Nombre: SF-03 Potencia :Ks= 30 nM Solvente : DMSO Consejos para uso: M.W.:491.6
P4	1-(3-Clorofenil)-5-trifluorometil-3-hidrobenzimidazol-2-ona		Referencia #** 5 Nombre: UCCF-853 Potencia : Ks= 3 microM Solvente : DMSO Consejos para uso: M.W.: 312.7
P5	2-(2-Cloro-benzoilamino)-4,5,6,7-tetrahidro-benzo[b]tiofeno-3-amida de ácido carboxílico		Referencia #** 6 Nombre: dF508 _{act} -02 Potencia : Ks= 70 nM Solvente : DMSO Consejos para uso: M.W.: 334.8
P6	5,7-Dihidroxi-3-(4-hidroxi-fenil)-cromo-4-ona		Referencia #** 8 Nombre: Genistein (discontinuo-disponible de Sigma #G6649) Potencia : Ks= 10 to 30 microM Solvente : DMSO Consejos para uso: M.W.:272.3
P7	1-(5-Cloro-2-hidroxi-fenil)-5-trifluorometil-1,3-dihidro-indol-2-ona		Referencia #** 8 Nombre: NSOO4 Potencia : EC50 3 microM Solvente : DMSO Consejos para uso: no funciona en pagches extirpados. M.W.: 327.7
P8	4-(4-Oxo-4H-benzo[h]cromo-2-yl)-piridinio; bisulfato		Referencia #** 9 and 10 Potencia : Ks= 2 microM Solvente : DMSO Consejos para uso: M.W.:371.4

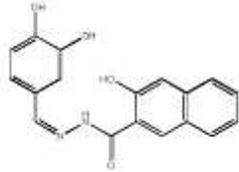
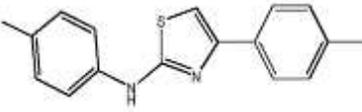
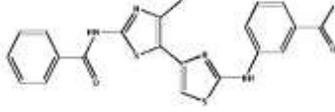
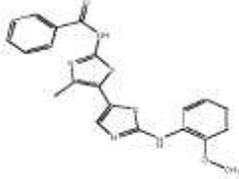
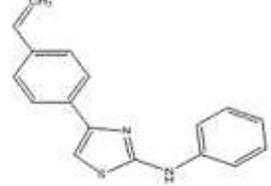
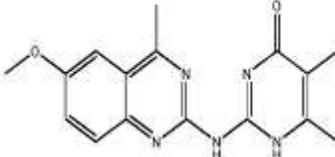
(continua)

ID	Nombre Químico	Estructura Química	Comentarios
Bloqueador(B); Potenciador(P); Corrector(C);Trato (T)			
P9	3-But-3-inil-5-metoxi-1-fenil-1H-pirazol-4-carbaldeido		Referencia #** 10 Potencia : Ks= 10 microM Solvente : DM50 Consejos para uso: M.W.:254.3
P10	3-(2-Benziloxi-fenil)-5-clorometil-isoxazol		Referencia #** 10 Potencia : Ks > 50 microM Solvente : DMSO Consejos para uso: M.W.:299.8
C1	6-(1H-Benzoimidazol-2-ilsulfanilmetil)-2-6-metoxi-4-metil-quinazolin-2-ilamino)-pirimidin-4-ol		Referencia #** 11 Potencia : Ks= 3 microM Solvente : DMSO Consejos para uso: M.W.:445.5
C2	2-{1-[4-(4-Cloro-benzensulfonil)-piperazin-1-yl]-etil}-4-piperidin-1-il-quinazolina		Referencia Presentación de vértice Nombre: VRT-640 Potencia : desconocido Solvente : DM50 Consejos para uso: Probable unión a las proteínas séricas. M.W.:500.1
C3	4-ciclohexiloxi -2-{1-[4-(4- metoxi-benzensulfonil)-piperazin-1-il]-etil}-quinazolina		Referencia #** 12,13, 15 Nombre: VRT-325 Potencia : EC50 2 microM Solvente : dry DMSO Consejos para uso: unión a las proteínas séricas. M.W.:510.65
C4	N-[2-(5-Cloro-2-metoxi-fenilamino)-4'-metil-[4,5'] bitiazolil-2'-il]-benzamida		Referencia #** 11 Nombre: compd 4a Potencia : EC50 2 microM Solvente : DMSO Consejos para uso: M.W.:440.9
C5	4,5,7-trimetil-N-fenilquinolin-2-amina		Referencia #** 11: Nombre: compd 5a Potencia : EC50 13 microM Solvente : DMSO Consejos para uso: M.W.:262.35

(continua)

ID	Nombre Químico	Estructura Química	Comentarios
Bloqueador(B); Potenciador(P); Corrector(C);Trato (T)			
C6	N-(4-bromofenil)-4-metilquinolin-2-amina		Referencia #** 11: Nombre: cmpd 5c Potencia: EC50 8 microM Solvente: DMSO Consejos para uso: M.W.:313.19
C7	2-(4-isopropoxipicolinoil-N-(4-pentilfenil)-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina-3-carboximida		Referencia #** 21: Nombre: Genzima cmpd 48 solo 10mg serán proporcionados Potencia: EC50 300 nM Solvente: DMSO Consejos para uso: M.W.472.6
C8	N-(2-fluorofenil)-2-(1H-indol-3-yl)-2-oxoacetamida		Referencia #** Vertex patent Potencia: EC50 Solvente: DM50 Consejos para uso: M.W.:282.27
C9	7-chloro-4-(4-(4-clorofenilsulfonyl)piperazin-1-il)quinolina		Referencia #**18 Nombre: KM11060 Potencia: EC50 < 1 microM Solvente: DMSO Consejos para uso: M.W.:422.33
C10	7-Cloro-4-(4-(fenilsulfonyl)piperazin-1-il)quinolina		Referencia # 18 Nombre: KM11057 Potencia: EC50 > 100 microM Solvente: DM50 Consejos para uso: Derivado inactivo de C9 (KM11060) M.W.:387.88

(continua)

ID	Nombre Químico	Estructura Química	Comentarios
Bloqueador(B); Potenciador(P); Corrector(C);Trato (T)			
C11	(Z)-N'-(3,4-dihidroxibenzilideno)-3-hidroxi-2-naftohidrazida		Referencia #: 19 Nombre: Dynasore Potencia : EC50 10-20 microM Solvente: DMSO Consejos para uso: Un inhibidor de dinamina, endocitosis de bloques CFTR M.W.:322.31
C12	N-(4-fluorofenil)-4-toliltiazol-2-amina		Referencia #: 11 Nombre: 2i Potencia : EC50 5 microM Solvente: DMSO Consejos para uso: M.W.:284.35
C13	N-(2-(3-acetilfenilamino)4'-metil-4,5'-bitiazol-2-il)benzamida		Referencia #: 11 Nombre:4c Potencia:EC50 2 microM Solvente: DMSO Consejos para uso: M.W.:434.53
C14	N-(2'-(2-metoxifenilamino)-4-metil-5,5'-bitiazol-2-il) benzamida		Referencia #: 11 Nombre:4d Potencia:EC50 7 microM Solvente: DMSO Consejos para uso: M.W.422.52
C15	N-fenil-4-(4-vinilfenil)tiazol-2-amina		Referencia #: 11 Nombre: 2b Potencia : EC50 16 microM Solvente: DMSO Consejos para uso: M.W.278.37
C16	2-(6-metoxi-4-metilquinazolin-2-ilamino)-5,6-dimetilnirimidin-4(1H)-ona		Referencia #: 11 Nombre: 3d Potencia:EC50 15 microM Solvente: DMSO Consejos para uso: M.W.:311.34

65

(continua)

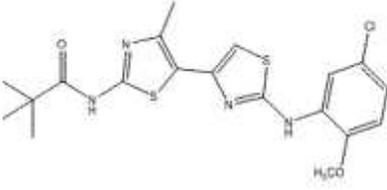
ID	Nombre Químico	Estructura Química	Comentarios
Bloqueador(B); Potenciador(P); Corrector(C);Trato (T)			
C17	N-(2-(5- cloro-2- metoxifenilamino)-4'-metil -4,5'- bitiazol-2'-il)pivalamida		Referencia #: 20 Nombre: 15Jf Potencia: EC50 1-2 microM Solvente: DMSO Consejos para uso: M.W.:436.98
C18	1-(benzo[d][1,3]dioxol-5-yl)-N-(5-((2- clorofenil)(3-hidroxipirrolidin-1- il)metil)tiazol-2- il)ciclopropanocarboxamida		Referencia # 24 Nombre: CF-106951 Potencia : Ks- 0.6 microM Solvente: DMSO Consejos para uso: usar de 3 a 6 microM para máximo efecto. M.W. 497.99

Tabla 4: Compuestos usados para tratar otras enfermedades caracterizadas por afectar la secreción de fluido

Comuesto	Mecanismo	Aplicación humana
estimulación del receptor salbutamol	adrenérgico- b2	broncodilatación para el asma*
estimulación del receptor salmeterol	adrenérgico- b2	broncodilatación para el asma*
Viagra o compuestos relacionados	inhibidor de fosfodiesterasa	facilitación de la erección masculina
Bortezomib u otros inhibidores del Proteasomal	inhibidor del proteasomal	anti-tumoral
Tricostatin A	inhibidor de HDAC	anti-esquizofrenia
loperamida	modulación del fluido de secreción intestinal	anti-diarrea
Subsalicilato de bismuto	modulación del fluido de secreción intestinal	anti-diarrea

*Otros broncodilatadores incluidos: Albuterol (salbutamol), Alupent, Levalbuterol, Pirbuterol, Advair and Symbicort, Serevent (salmeterol), Foradil (formoterol), Perforomist

Ejemplos de fármacos CFTR conocidos que podrían usarse en un ensayo para medicina personalizada incluyen correctores y potenciadores de CFTR, tales como aquellos enumerados en la Tabla 3 y/o Tabla 4 y/o VRT-325, VX809, VX770, C8 (<http://cftrfolding.org>) y/o corr-4a. Por ejemplo, en una realización el ensayo comprende la etapa de preincubación de organoides de fibrosis quísticas con correctores o potenciadores de CFTR, tales como VRT-325, VX809, VX770, C8 (<http://cftrfolding.org>) y corr-4a. Debe entenderse que cuando esta preincubación produce hinchazón aumentada y/o hinchazón aumentada inducida por forskolina de los organoides, esto demuestra que los correctores han restaurado con éxito la función de CFTR. Los fármacos identificados por cribado de fármacos usando el método de la invención también pueden usarse en un ensayo para medicina personalizada. Tales fármacos se describen en la sección de cribado de fármacos anterior.

En algunas realizaciones, la invención proporciona un método de la invención para su uso en comparar la actividad de fármacos entre diferentes pacientes *in vitro* para evaluar respuestas individuales a fármacos que restauran CFTR para fines de medicina personalizada adaptada al paciente.

En algunas realizaciones, el ensayo para su uso en medicina personalizada se usa para probar la respuesta de pacientes individuales a fármacos, en el que la enfermedad de interés es fibrosis quística, y en el que el ensayo

comprende

estimulación de uno o más organoides derivados de un paciente de interés con un compuesto que es capaz de inducir la hinchazón de los organoides;

5 estimulación de uno o más organoides con un fármaco conocido por afectar la función de CFTR o con un fármaco que es probado por su eficacia en afectar la función de CFTR; y
formación de imágenes de uno o más organoides, y opcionalmente comparar la hinchazón del organoide con la hinchazón de un organoide que se ha estimulado con el compuesto, pero no se ha estimulado con el fármaco;

10 en el que un aumento en la hinchazón de uno o más organoides en respuesta a la estimulación por un fármaco indica que el paciente es sensible al tratamiento con el fármaco.

Los Ejemplos 2 y 3 claramente demuestran que la hinchazón inducida por forskolina puede restaurarse por fármacos con capacidad de restauración de CFTR conocida. Curiosamente, se observó que las respuestas a fármacos de los organoides son variables entre pacientes con CF, incluso entre organoides homocigotos F508del-CFTR. Esto plantea la posibilidad de que este ensayo *in vitro* puede predecir la capacidad de respuesta al fármaco *in vivo* de pacientes individuales. Un modelo terapéutico ideal para CF sería cribar la efectividad de fármacos que restauran CFTR disponibles directamente después del diagnóstico de CF para optimizar el tratamiento al nivel personal antes del inicio de la enfermedad. Los enfoques de medicina personalizada también pueden facilitar el desarrollo y la aprobación de fármacos a los que solo responden subgrupos de pacientes, y limitar los riesgos económicos asociados a la investigación de fármacos. Además, el método de la invención puede usarse para la aprobación de fármacos en pacientes que son genotípicamente incorrectamente apareados con fármacos que han sido validados para un genotipo de CFTR específico. Los resultados de fase II provisional de un ensayo actual publicado en sitios web de la Fundación de Fibrosis Quística de Norte América (www.cff.org) y Vertex (www.vrtx.com) indican que las respuestas del fármaco a monoterapia con VX-809 y VX770, o VX-770¹⁴, en sujetos F508del CFTR, son altamente variables entre pacientes.

Así, la invención también proporciona el uso de uno o más organoides para la evaluación de la capacidad de respuesta a una opción de tratamiento particular, en la que la evaluación comprende el uso de un ensayo según la invención y en la que la hinchazón del organoide es indicativa de tratamiento satisfactorio.

La divulgación también describe un método de tratamiento de una enfermedad o afección, que comprende el uso del método de la invención para identificar un fármaco para la enfermedad o una afección a la que es sensible un paciente, y tratar el paciente con dicho fármaco. En algunas realizaciones, el fármaco es cualquier fármaco conocido o supuesto para tratar una enfermedad o afección asociada a la absorción o secreción de fluido (véase la sección sobre enfermedades o afección que enumera enfermedades o problemas que aplican igualmente a esta sección). En algunas realizaciones, el fármaco es un fármaco conocido o supuesto para fibrosis quística, diarrea inducida por bacterias (por ejemplo, *E. coli* enterohemorrágica o causada por toxinas del cólera u otras toxinas bacterianas); infección por rotavirus; adrenoleucodistrofia; asma, enfermedad de Tangier, resistencia multi-fármaco (muchos cánceres, así como algunas bacterias resistentes a los antibióticos); colestasis obstétrica, COPD, fumar, sinusitis, insuficiencia pancreática, pancreatitis, infertilidad, desnutrición, enfermedades inflamatorias, enfermedad renal que incluye enfermedad renal poliquística, enfermedad alérgica, osteoporosis, diabéticos, hipertensión, hipotensión, diarrea inducida por patógenos (cólera, *E. coli*), 'deseccación', cirrosis hepática, insuficiencia del hígado, tumorigénesis. En algunas realizaciones, el fármaco es cualquier fármaco enumerado en la Tabla 3 y/o Tabla 4.

En algunas realizaciones se emplean métodos de cultivo y de recogida de datos asistidos por ordenador o robot para aumentar el rendimiento del cribado.

En algunas realizaciones, el organoide se obtiene de una biopsia del paciente. En algunas realizaciones, la molécula candidata que causa un efecto deseado en el organoide se administra a dicho paciente.

FIGURAS

55 **Figura 1.** La expansión volumétrica rápida y el regreso a la morfología de valor de referencia se observó cuando los organoides se estimularon con forskolina durante 30 min y tras la eliminación de la forskolina lavando (dos ejemplos representativos). Esto indica que la expansión volumétrica rápida o disminución puede medirse por secreción o absorción de fluido (o electrólito), respectivamente, por medio de la membrana apical. La forskolina se usó como activador de CFTR, sugestivo de un papel para este canal en la secreción de fluido.

60 **Figura 2.** Se preparó ARN de organoides humanos y se evaluó la expresión de CFTR por RT-PCR cuantitativa. Un umbral de ciclo para CFTR de 23 indica expresión alta de CFTR. b2m y GAPDH fueron controles positivos para el procedimiento.

65 **Figura 3:** La expansión volumétrica en organoides murinos es dependiente de CFTR. El crecimiento volumétrico de organoides se mide por medición del área superficial total de los organoides tras la incubación con forskolina para los momentos de tiempo indicados. La preincubación de organoides con los inhibidores de CFTR CFTRinh172, GlyH-101 o combinados se realizó durante 1 hora.

Figura 4: La expansión volumétrica en organoides es dependiente de CFTR. A) Crecimiento volumétrico de

organoides humanos tras la incubación con forskolina para los momentos de tiempo indicados. Se muestran el contraste de interferencia diferencial e imágenes fluorescentes de Calcein-Green de un ejemplo representativo. B) El aumento relativo de la expansión volumétrica tras la incubación con forskolina se inhibe por la preincubación de organoides con los inhibidores de CFTR CFTR^{inh}172, GlyH-101 o combinados. La expansión volumétrica se monitoriza por medición del área superficial del organoide en tiempo por microscopía confocal de célula viva.

Figura 5. A) La expansión inducida por forskolina del área superficial del organoide está ausente en un paciente con fibrosis quística (CF), pero presente en un control sano (HC). B) 24 horas de la preincubación de correctores de CFTR que ayudan a plegar la proteína CFTR (VRT-325 + corr-4a) aumenta la hinchazón inducida por forskolina de organoides de un paciente con CF.

Figura 6. A) Los organoides murinos de ratones CFTR-F508del muestran alguna hinchazón inducida por forskolina (FIS) dependiente de CFTR que puede aumentarse con compuestos que restauran CFTR (VRT-325). La inhibición de CFTR como se describió previamente reduce FIS en CFTR-F508del murino antes o después de la restauración de CFTR. B) Aumento de FIS en organoides de F508del CFTR murino por compuestos VRT-325, Corr 4a o su combinación. C) Aumento de FIS en organoides de F508del CFTR murino por incubación de células a baja temperatura (27 °C, 24 horas). D) La fuerte hinchazón inducida por forskolina en organoides no mutantes murinos está ausente en organoides murinos deficientes para CFTR.

Figura 7. Se añadió genisteína a cultivo de organoide y se obtuvieron imágenes de la rápida expansión para momentos de tiempo indicados (min).

Figura 8. Se estimularon organoides humanos con forskolina o toxina del cólera para estimular la secreción de fluido. Ambos estímulos inducen la rápida expansión volumétrica de organoide indicada por mediciones del área superficial.

Figura 9. Imagen confocal fluorescente de un organoide marcado con Calcein-Green con reconocimiento de objeto (línea verde) por el software de análisis de imagen Volocity al inicio o después de 30 minutos de estimulación con forskolina.

Figura 10. Cuantificación de la hinchazón del organoide murino inducida por forskolina. **(a)** Análisis de microscopía óptica de organoides estimulados con forskolina o DMSO. Se muestran ejemplos representativos de los momentos de tiempo indicados después del inicio de la estimulación. **(b)** Imagen confocal fluorescente de un organoide marcado con Calcein-Green con reconocimiento de objeto (línea verde) por software de análisis de imagen. **(c)** Ejemplo representativo de un organoide marcado con Calcein-Green estimulado con forskolina. Se obtuvieron imágenes del contraste de interferencia diferencial (DIC) y la fluorescencia usando microscopía confocal de célula viva. El área superficial en relación con t=0 se indica en la esquina superior izquierda. **(d)** El área superficial en relación con t=0 (área normalizada) de todos organoides individuales de respuesta de un único pocillo. **(e)** El área superficial total de los organoides normalizada a T=0 de tres pocillos independientes. La respuesta promedio de los pocillos individuales se indica en negro (media ± e.e.m.). **(f)** El aumento dependiente de la dosis del área superficial por forskolina. Cada línea representa la respuesta promedio de tres pocillos individuales como se ilustra en **(e)** (media + e.e.m.). Las barras de escala (a-c) 30 µm. Todos los resultados son representativos de al menos tres experimentos independientes.

Figura 11. La hinchazón inducida por forskolina de organoides murinos es dependiente de CFTR. **(a)** Las curvas de hinchazón normalizadas de organoide marcado con Calcein-Green estimulado con forskolina preincubado con DMSO, CFTR^{inh}172, GlyH-101 o ambos CFTR^{inh}172 y GlyH-101 (media + e.e.m.). **(b,c)** Las imágenes de microscopía confocal representativas de organoides deficientes para CFTR marcados con Calcein-Green **(b)** o de F508del-CFTR **(c)** y sus no mutantes correspondientes en respuesta a forskolina. Barras de escala 50 µm. **(d,e)** Cuantificación de la hinchazón inducida por forskolina en organoides deficientes para CFTR **(d)** o de F508del-CFTR **(e)** y sus no mutantes correspondientes (media ± e.e.m.) **(f)** Hinchazón inducida por forskolina de organoides de F508del-CFTR marcados con Calcein-Green cultivados durante 24 horas a 37 °C o 27 °C con o sin inhibición de CFTR (media ± e.e.m.). Obsérvese que la escala de tiempo en **(f)** es más grande. **(g)** Hinchazón inducida por forskolina normalizada de organoides de F508del-CFTR pretratados durante 24 horas con DMSO, VRT-325, Corr-4a o ambos correctores con o sin inhibición de CFTR (media ± e.e.m.). Todos los resultados son representativos de al menos tres experimentos independientes.

Figura 12. La hinchazón inducida por forskolina en organoides humanos es dependiente de CFTR. **(a)** El análisis de transferencia Western de la expresión de CFTR y E-cadherina (control de carga) en HC rectal humano (n=2), E60X/4015delATTT (n=1), u organoides de F508del-CFTR homocigotos (n=2; panel superior) y la expresión de CFTR y ezrina (control de carga) en lisados de células completas de organoides rectales humanos que fueron tanto no tratados (control) como tratados con las enzimas de desglucosilación Endo H o PNGasa F (panel inferior). **(b)** Detección de CFTR por M3A7 en un HC rectal u organoide de F508del-CFTR, co-teñido con faloidina-FITC (actina) y DAPI (núcleo). Se obtuvieron imágenes del contraste de interferencia diferencial (DIC) y la fluorescencia usando microscopía confocal de célula viva. Barras de escala: 20 µm. **(c)** Cuantificación de la hinchazón de organoide de control sano inducida por forskolina preincubado con DMSO, CFTR^{inh}172, GlyH-101 o tanto CFTR^{inh}172 como GlyH-101 (media ± e.e.m.). **(d)** Hinchazón inducida por forskolina de organoides rectales derivados de 3 controles sanos individuales, 2 pacientes con un genotipo de CF leve (F508del/A455E) y 9 pacientes con un genotipo de CF grave (1x E60X/4015del; 1x F508del/G542X; 1x F508del/L927P; 6x F508del/F508del). La hinchazón promedio de los diferentes grupos se indica en negro (media ± e.e.m.). **(e)** Respuestas de FIS de organoides con HC o CF expresadas como área absoluta bajo la curva (ABC) calculada de lapsos de tiempo como se ilustra en **(d)** (valor de referencia = 100 %, T=60 min). Cada barra representa valores de ABC promediados de al menos tres experimentos independientes

por individuo (media \pm e.e.m.). **(f)** Comparación de la actividad de CFTR medida por FIS de organoides con HC o CF o por mediciones de corriente intestinal (ICM) de las biopsias rectales correspondientes. Las barras de ICM de los diferentes grupos indicados representan secreción de cloruro acumulativa dependiente de CFTR inducida por forskolina ($\mu\text{Amp}/\text{cm}^2$) en relación con la respuesta de HC promedio (establecida en 100 %) y las barras de FIS representan la hinchazón inducida por forskolina expresada como el área bajo la curva (ABC) promediada de al menos tres experimentos independientes por individuo como se ilustra en (f) en relación con la respuesta de HC promedio (100 %). (HC n=3; CF leve n=2; CF grave (F508del/F508del) n=5; CF grave (Otros; E60X/4015ATTTdel y F508del/G542X) n=2; media \pm d.e.). Todos los resultados son representativos de al menos tres experimentos independientes. Las ICM se realizaron en 4 biopsias rectales.

Figura 13. Corrección de CFTR química en organoides de CF rectales humanos. **(a)** Hinchazón normalizada de organoides de F508del-CFTR marcados con Calcein-Green inducida por forskolina cultivados durante 24 horas a 37 °C o 27 °C con o sin inhibición de CFTR (media \pm e.e.m.). **(b)** CE50 de organoides de F508del para VX-809 o VX-770. Las líneas representan FIS expresada como el área bajo la curva (ABC; valor de referencia 100 %, T=60 min) calculada de lapsos de tiempo como se presenta en (f) en relación con organoides tratados con DMSO (0 %) y organoides tratados con VX-809 log(0,5) μM o VX-770 log(1,5) μM (100 %). (n=6 organoides homocigotos de F508del; media \pm e.e.m.) **(c)** Imágenes de microscopía confocal representativas de organoides de control sano (HC) marcados con Calcein-Green o de F508del-CFTR en respuesta a forskolina tras la restauración farmacológica de CFTR. Barras de escala 100 μm . **(d-f)** Lapsos de tiempo de hinchazón inducida por forskolina normalizada de organoides de F508del-CFTR pre-tratados durante 24 horas con DMSO, VRT-325 (10 μM), Corr-4a (10 μM), o ambos correctores con o sin inhibición de CFTR (d), con DMSO, C8 (10 μM), Corr-4a (10 μM), o ambos correctores con o sin inhibición de CFTR (f) o estimulada con el corrector VX-809 (24 h pre-tratamiento, 3 μM), el potenciador VX-770 (simultáneo con forskolina, 3 μM) o tratamiento con compuesto combinado con o sin inhibición de CFTR (f) (media \pm e.e.m.).

Figura 14. FIS diferencial de organoides de CF tras la restauración de CFTR química. **(a-c)** Cuantificación de FIS en organoides derivados de 9 pacientes con CF individuales pre-tratados durante 24 horas con VRT-325 (10 μM), Corr-4a (10 μM), o ambos correctores (a), con C8 (10 μM), Corr-4a (10 μM), o ambos correctores (b) o estimulados con VX-809 (24 h pre-tratamiento, 3 μM), VX-770 (simultáneo con forskolina, 3 μM) o ambos compuestos (c). Las barras se corresponden con las barras representadas en la Fig. 12e del panel 'CF grave'. Cada barra representa FIS expresada como el área absoluta bajo la curva (ABC) calculada de lapsos de tiempo como se presenta en la Fig. 13d-f (valor de referencia = 100 %, T=60 min) corregida por FIS de organoides tratados con DMSO y promediados de al menos tres experimentos independientes realizados con intervalos semanales (media \pm e.e.m.). **(d)** Promedio de respuestas de FIS de organoides de F508del/F508del tratados con compuesto (n=6 de a-c) y organoides de F508del/A455E tratados con DMSO (n=2) en relación con la FIS promedio de organoides de HC tratados con DMSO (n=3) expresada en ABC calculada de lapsos de tiempo como se ilustra en la Fig. 13d-f (valor de referencia = 100 %, T=60 min; media \pm e.e.m.).

Figura 15. Análisis de microscopía óptica de organoides murinos no mutantes estimulados con forskolina o DMSO. Se muestran ejemplos representativos de los momentos de tiempo indicados después de iniciar la estimulación. La hinchazón inducida por forskolina (FIS) de organoides se invirtió después de la eliminación de forskolina lavando. Barra de escala 30 μm .

Figura 16. Hinchazón del organoide en respuesta a forskolina.

(a) Ejemplos de cuantificación del área superficial total de los organoides usando el software de formación de imagen Volocity. Se muestra una imagen confocal representativa de organoides de F508del-CFTR rectales marcados con Calcein-Green pre-tratados durante 24 h con VX-809 en un pocillo de una placa de 96 pocillos en los momentos de tiempo indicados de tratamiento con forskolina. Barra de escala 520 μm .

(b) Porcentajes de objetos que responden y no responden a forskolina de diferente origen con o sin tratamiento con fármaco calculado de tres experimentos independientes. **(c)** Imágenes confocales representativas de organoides de forma irregular (que no responden) o forma normal (que responden) en los momentos de tiempo indicados de simulación de forskolina. **(d)** Cuantificación de FIS expresada en área absoluta bajo la curva (ABC) calculada de lapsos de tiempo como se ilustra en la Fig. 13d-f (valor de referencia = 100 %, T=60 min) con o sin pre-selección de estructuras que responden. NS = no significativo.

Figura 17. Lapsos de tiempo de hinchazón inducida por forskolina en organoides murinos y humanos. El aumento de área superficial normalizada de organoides de HC estimulados por forskolina individuales **(a)** no mutantes, **(b)** F508del-CFTR (rescatado de temperatura) y **(c)** intestino delgado humano. La hinchazón inducida por forskolina promediada de diferentes tipos de organoide se analizó para diferentes momentos de tiempo para evitar la medición de organoides de colapso (líneas discontinuas).

Figura 18. Expresión de ARNm de *CFTR* en organoides murinos y humanos. Las barras muestran valores de umbral de ciclo (CT) de PCR en tiempo real que representan niveles de ARNm de *CFTR*, $\beta 2\text{m}$ o GAPDH aislado de organoides de F508del-CFTR del intestino delgado (gráfica izquierda) o *Cftr*^{-/-} (gráfica central) y no mutantes correspondientes, u organoides de intestino delgado de HC humanos.

Figura 19. Hinchazón inducida por forskolina en organoides de HC y CF **(a)** Hinchazón estimulada por forskolina de organoides intestinales derivados de 7 controles sanos individuales (2x duodeno, 1x íleon, 1x colon, 3x recto), 2 pacientes con un genotipo de CF leve (F508del/A455E; recto) y 12 pacientes con un genotipo de CF grave (duodeno: F508del/F508del y F508del/Exon17del; íleon: F508del/F508del; recto: 1x

E60X/4015delATTT; 1x F508del/G542X; 1x F508del/L92 7P; 6x F508del/F508del). (b+c) Hinchazón inducida por forskolina expresada en ABC calculada de lapsos de tiempo de aumento del área de organoides (valor de referencia = 100 %, T=60) de organoides rectales con un genotipo de CF leve o grave con o sin inhibición de CFTR. (CF grave: F508del/G542X, F508del/L927P y F508del/F508del (6x); CF leve: F508del/A455E n=2); media \pm e.e.m.).

Figura 20. Medición por parejas de la función de CFTR por FIS o ICM. **(a)** Seguimiento de la medición de corriente intestinal (ICM) representativa de biopsias rectales de F508del-CFTR. **(b)** Visión general de respuestas de FIS y ICM emparejadas de diferentes individuos. FIS se expresa como el área absoluta bajo la curva (ABC) calculada de lapsos de tiempo como se ilustra en la Fig. 13d-f (valor de referencia = 100 %, T=60 min) y se promedia de al menos tres experimentos independientes realizados con intervalo semanal. Los valores de ICM representan respuestas actuales inducidas por forskolina promedio de 4 biopsias rectales del mismo individuo. **(c)** Gráfico de correlación de valores de FIS y de ICM de (b). Se calcularon R (=coeficiente de correlación) y el valor de p por SPSS usando una prueba de correlación ordinal de Spearman.

Figura 21. Corrección de CFTR química de organoides de CF intestinales no rectales. **(a,b)** Lapsos de tiempo de hinchazón inducida por forskolina normalizada de organoides de intestino delgado pre-tratados durante 24 horas con DMSO, VRT-325, Corr-4a, o ambos correctores **(a)** o estimulados con VX-809 (24 h pre-tratamiento), VX-770 (simultáneo con forskolina) o su tratamiento combinado **(b)** (media \pm e.e.m.).

Figura 22. Comparación de respuestas medidas (barras totales) y respuestas aditivas (barras internas) en organoides rectales tras el tratamiento de fármaco simple o combinado como se indica en la Fig. 14.

Figura 23. Corrección química de organoides de F508del/A455E rectales. Hinchazón inducida por forskolina normalizada de organoides de F508del/A455E rectales estimulados con VX-809 (24 h pre-tratamiento) o VX-770 (simultáneo con forskolina) (media \pm e.e.m.).

Figura 24. La hinchazón de organoide inducida por toxina del cólera en organoides rectales humanos es dependiente de CFTR. La forskolina y la toxina del cólera inducen la hinchazón de organoides derivados de HC. La respuesta de la toxina del cólera se retrasa en comparación con forskolina (media \pm e.e.m.). Los resultados son representativos de tres experimentos diferentes.

Figura 25. Cuantificación de la hinchazón de organoide murino inducida por forskolina. **(a)** Análisis de microscopía óptica de organoides estimulados con forskolina o DMSO. Se muestran ejemplos representativos de los momentos de tiempo indicados después del inicio de la estimulación. La línea roja indica la luz de organoide interna. **(b)** Imagen confocal fluorescente de un organoide marcado con Calcein-Green con reconocimiento de objeto (línea verde) por software de análisis de imagen. **(c)** Ejemplo representativo de un organoide marcado con Calcein-Green estimulado con forskolina. Se obtuvieron imágenes del contraste de interferencia diferencial (DIC) y la fluorescencia usando microscopía confocal de célula viva. El área superficial en relación con t=0 se indica en la esquina superior izquierda. **(d)** Aumento del área superficial normalizada de 11 organoides de individuo en un único pocillo. El promedio se indica en negro (media \pm e.e.m.). **(e)** Aumento dependiente de la dosis del área superficial por forskolina ($5 \mu\text{M}$ (n=4 número de organoides analizados), $5 \times 10^{-2} \mu\text{M}$ (n=11), $5 \times 10^{-4} \mu\text{M}$ (n=10), DMSO (n=9). Barras de escala (a-c) $30 \mu\text{m}$. Todos los datos son representativos de al menos tres experimentos independientes.

Figura 26. La hinchazón inducida por forskolina de organoides murinos es dependiente de CFTR. **(a)** Curvas de hinchazón normalizadas de organoides marcados con Calcein-Green estimulados con forskolina pre-incubados con DMSO (n=8), CFTR-inh172 (n=7), GlyH-101 (n=9) o ambos CFTR- inh172 y GlyH-101 (n=11) (media \pm e.e.m.). **(b)** Imágenes de microscopía confocal representativas de organoides no mutantes marcados con Calcein-Green o deficientes para CFTR en respuesta a forskolina. Barras de escala $50 \mu\text{m}$. **(c)** Cuantificación de la hinchazón inducida por forskolina en organoides no mutantes (n=6) o deficientes para CFTR (n=11) (media \pm e.e.m.) **(d)** Tamaño absoluto de organoides no mutantes o deficientes para CFTR cuantificados en (c) a t=0 (media \pm e.e.m.). **(e-g)** Similar a b-d, pero para organoides no mutantes (n=8) y de CFTR-delF508 (n=12). Barras de escala $30 \mu\text{m}$. **(h)** Hinchazón estimulada por forskolina de organoides de CFTR-delF508 marcados con Calcein-Green cultivados a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ con (n=20) o sin (n=15) inhibición de CFTR o cultivados a $27 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 24 horas con (n=31) o sin (n=27) inhibición de CFTR (media \pm e.e.m.). Todos los datos son representativos de al menos tres experimentos independientes.

Figura 27. La hinchazón inducida por forskolina de organoides humanos es dependiente de CFTR. **(a)** Imágenes de microscopía óptica de organoides humanos cultivados a concentraciones de medio acondicionado con Wnt3a (WCM) normales (50 %, panel izquierdo) o reducidas (5 %, panel derecho). Barras de escala $400 \mu\text{m}$. **(b)** Ejemplos representativos de hinchazón inducida por forskolina en condiciones de Wnt3a normales o reducidas. Se indican las áreas superficiales en relación con t=0. Barras de escala $50 \mu\text{m}$. La línea discontinua representa la luz interna **(c+d)** Cuantificación de la hinchazón de organoide inducida por forskolina a niveles de Wnt3a normales **(c)** o reducidos **(d)** pre-incubados con DMSO, CFTR-inh172, GlyH-101 o tanto CFTR-inh172 como GlyH-101 (wnt3a normal: n=29, n=41, n=26, n=15; Wnt3a reducido: n=5, n=7, n=8, n=10) (media \pm e.e.m.). Todos los datos son representativos de al menos tres experimentos independientes.

Figura 28. La ausencia de hinchazón inducida por forskolina en organoides de un paciente con CF puede rescatarse por fármacos de corrección de CFTR. **(a)** La hinchazón inducida por forskolina en organoides de un paciente con CF que contiene CFTR-F508del homocigoto está ausente. HC es control sano. **(b)** FIS aumenta en organoides de CF tras la incubación durante 24 h con correctores VRT-325 y corr 4a.

Figura 29. Análisis de microscopía óptica de organoides murinos no mutantes estimulados con forskolina o DMSO. Se muestran ejemplos representativos de los momentos de tiempo indicados después de iniciar la

estimulación. La hinchazón inducida por forskolina (FIS) de organoides se invirtió después de la eliminación de forskolina lavando.

Figura 30. Se expresa ARNm de CFTR en organoides de ratón y humanos. Las barras muestran valores de CT de PCR en tiempo real que representan niveles de ARNm de CFTR, β 2m o GAPDH aislado de organoides de CFTR-delF508 (gráfica izquierda) o CFTR-/- (gráfica central) y sus organoides no mutantes, o humanos correspondientes.

Figura 31. La hinchazón gradual inducida por forskolina evita la colisión de organoides. Aumento del área superficial normalizada de organoides estimulados con forskolina individuales **(a)** no mutantes, **(b)** CFTR-delF508 (rescatado de temperatura) y **(c)** humanos (5 % de medio condicionado con Wnt3a, WCM). Se analizó la hinchazón inducida por forskolina promediada por tipo de organoide hasta diferentes momentos de tiempo (línea discontinua).

Figura 32. La hinchazón tipo forskolina también ocurre en respuesta a dopamina, ritodrina, epinefrina y salbutamol. La figura muestra el ABC relativo para cada uno de estos compuestos en relación con forskolina.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

Los presentes inventores demuestran aquí un ensayo cuantitativo rápido para la función de CFTR en un método de cultivo basado en criptas intestinales primarias humanas y murinas. Este método de cultivo permite expandir células madre intestinales dentro de organoides cerrados que imitan la estructura del intestino *in vivo* incluyendo una luz cerrada sobre la membrana apical de las células. CFTR intestinal se expresa predominantemente en la membrana apical de las células de las criptas en las que su activación conduce la secreción de electrolitos y fluidos. Los presentes inventores han mostrado que la forskolina, que aumenta AMPc intracelular y de tal modo activa CFTR, podría mediar en el transporte de fluido dentro de la luz del organoide. Usando microscopía de célula viva, los presentes inventores observan una expansión rápida de la luz, y área superficial total de los organoides cuando se añadió forskolina, mientras que los organoides murinos tratados con DMSO no se afectaron (Figura 1). La hinchazón inducida por forskolina de organoides se invirtió después de la eliminación de forskolina lavando (Figura 1). Se expresa ARNm de CFTR en organoides murinos y humanos (Figura 2) y se encontró que la hinchazón inducida por forskolina era dependiente de CFTR por el uso de inhibidores químicos (ratón Figura 3; humano Figura 4).

La parte anterior de la invención de los presentes inventores describe el uso de organoides intestinales (intestino delgado y colon) para medir la absorción y secreción de fluido que produce un aumento o disminución del tamaño del organoide. Este cambio en el tamaño se mide por la formación de imágenes del organoide y la medición manual o automatizada del área superficial, diámetro, o contenido. La cuantificación del cambio en el tamaño puede usarse para demostrar la enfermedad y su gravedad. Esto se ejemplifica por comparación de la hinchazón inducida por forskolina en organoides crecidos a partir de un control sano o un paciente con CF que lleva mutaciones de F508del homocigóticas (Figura 5a). Esto mantiene importantes implicaciones para el uso de este ensayo como prueba de diagnóstico para demostrar fibrosis quística.

El ensayo de los presentes inventores también puede usarse para medir el efecto de tratamientos existentes o novedosos, ya que los presentes inventores observaron la hinchazón inducida por forskolina en organoides de CF tras la adición de fármacos que son conocidos por corregir la función de CFTR *in vitro* (Figura 5b). Esto sugiere que el ensayo de los presentes inventores puede usarse para comparar la actividad de fármacos entre diferentes pacientes *in vitro* para evaluar respuestas individuales a fármacos que restauran CFTR para fines de medicina personalizada adaptada al paciente.

Los organoides de CFTR-delF508 de ratón tienen actividad de CFTR residual mayor que los homólogos humanos (pero está ausente en ratones deficientes para CFTR) (Figura 6), y responden a corrección de CFTR por temperatura y compuestos por elevada hinchazón inducida por forskolina. Esto muestra que el ensayo de los presentes inventores también puede aplicarse a fármacos de restauración de CFTR-F508del en organoides derivados de especies no humanas.

Los presentes inventores también observaron que la genisteína, un potenciador de CFTR conocido, puede inducir hinchazón de organoide rápida, indicando además que los compuestos con actividad de potenciador de CFTR pueden identificarse usando este ensayo (Figura 7).

El método puede usarse para cribar las bibliotecas de compuestos para compuestos novedosos que afectan la absorción y/o secreción de fluido de células epiteliales.

El método descrito anteriormente también puede usarse para otros órganos tales como epitelio del estómago o del pulmón.

El método también puede usarse para estudiar el efecto de otras enfermedades que afectan la absorción o secreción de fluido de epitelio del intestino delgado, colon, estómago o pulmón. Un ejemplo de esto es el efecto de la toxina del cólera (Figura 8).

Posibles aplicaciones:

La aplicación de la tecnología descrita se ejemplifica, pero no se limita a:

- 5 1) El uso de organoides derivados de tejido de intestino delgado para el cribado de fármacos. El efecto de los fármacos para tratamiento de CF se mide por cambio de tamaño de los organoides en respuesta a forskolina o cualquier otro agente que produzca un cambio de tamaño de los organoides debido a absorción o secreción de fluido.
- 10 2) Medicina personalizada. El uso de organoides de intestino delgado derivados de pacientes para la evaluación de la capacidad de respuesta individual a ciertas opciones de tratamiento.
- 3) Diagnóstico de CF. Puede establecerse diagnóstico de CF por la medición del cambio de tamaño de los organoides en respuesta a forskolina o cualquier otro agente.
- 15 4) El método que usa los organoides puede usarse para estudiar la gravedad o efecto de la mutación que produce CF. La respuesta de organoides específicos del paciente a correctores que ayudan al plegamiento de CFTR mutante o potenciadores que ayudan a la apertura de CFTR y/o probabilidad de apertura u otros fármacos usados para tratar CF.
- 5) El método que usa los organoides puede usarse para probar la respuesta del paciente individual a fármacos tales como correctores o potenciadores u otros fármacos usados para tratar CF.
- 20 6) El método que usa los organoides puede usarse para probar el efecto de fármacos novedosos para tratar deficiencia de CFTR a través de la corrección de la función de CFTR.
- 7) El método que usa los organoides puede usarse para probar el efecto de fármacos novedosos para tratar deficiencia de CFTR por formas que no incluyen directamente en la función de CFTR.
- 8) El método que usa los organoides puede usarse midiendo un aumento rápido en el volumen medido después de algunos minutos a 48 horas (por ejemplo, 10 min).
- 25 9) El método que usa los organoides puede usarse midiendo un aumento lento en el volumen medido después de algunos días a algunas semanas.
- 10) El método que usa los organoides puede usarse para otras enfermedades o afecciones que producen absorción o secreción alterada de fluido y electrólito de epitelio del intestino delgado.
- 30 11) Las aplicaciones descritas en 1-10 también pueden usarse en combinación con epitelio de colon o de pulmón, o células de otros tejidos humanos.
- 12) Las aplicaciones descritas en 1-10 también pueden usarse en combinación con organoides derivados de especies no humanas.

NOVEDAD

El método descrito hace uso de organoides como se describieron previamente (Sato 2009, Sato 2011) que contienen células primarias derivadas de pacientes. El hallazgo novedoso es el aumento rápido en la luz y el área superficial total de los organoides del intestino delgado en respuesta a fármacos que se dirigen a CFTR. Este aumento en el tamaño está afectado por mutación del gen CFTR y fármacos para CF que controlan CFTR. Esto condujo a los presentes inventores a desarrollar una técnica novedosa para la medición de la expansión de los organoides como una medida del efecto de la mutación de CFTR y tratamiento de fármacos. Esto permite el uso de este método para cribar eficazmente el tratamiento de fármacos y o pacientes para el efecto en la absorción y secreción de fluido, cuyo control se efectúa en diversas enfermedades tales como CF y cólera.

PROCEDIMIENTO**Aislamiento de criptas y cultivo de organoides**

50 Se generaron organoides murinos y humanos a partir de criptas del intestino delgado o colónicas aisladas y se mantuvieron en cultivo por métodos descritos previamente por Sato et al en 2009 y 2011.

Marcado de organoides

55 Para experimentos de formación de imágenes confocales de célula viva, los organoides se marcaron con diferentes colorantes permeables a la célula que ganan fluorescencia tras la conversión metabólica por células vivas, incluyendo Cell tracker-Orange, Cell tracker-Green y Calcein-Green (todos de Invitrogen). Mientras que la incubación con Cell tracker-Orange y Cell tracker-Green produjo una mala tinción de las células, alta tinción del fondo y acumulación del colorante en la luz del organoide, los presentes inventores encontraron excelentes organoides marcando con bajos niveles de fondo usando Calcein-Green. Los presentes inventores probaron diferentes condiciones de marcado, y se encontró tinción celular óptima tras incubación de Calcein-Green 10 μ M durante 60 minutos.

Formación de imágenes de célula viva

65 Los presentes inventores probaron diferentes configuraciones de ensayo, y encontraron que los organoides fueron

más adecuados para el análisis de hinchazón inducida por forskolina uno a dos días después de someterse a pasar, sembrarse en una placa de 96 pocillos en 5 μ l de Matrigel. Para mejorar la penetración de compuestos dentro de Matrigel, los presentes inventores usaron diluciones de Matrigel hasta el 50 %. Los organoides murinos se preincubaron con inhibidores de CFTR (50 μ M) durante 60 minutos, simultáneamente con Calcein-Green. Para efectos de inhibición de CFTR óptimos en organoides humanos, los presentes inventores prolongaron el tiempo de incubación a 3 horas con tinción de Calcein-Green simultánea durante la última hora. Los compuestos químicos (10 μ M) se preincubaron durante 24 horas en tanto organoides humanos como de ratón. Los organoides marcados con Calcein-Green se estimularon con forskolina 5 μ M y analizaron directamente por formación de imágenes confocales de célula viva usando el microscopio LSM Zeiss.

Quantificación de la hinchazón de organoide

Los presentes inventores usaron el software de cuantificación Volocity para analizar organoides durante la estimulación con forskolina. Los presentes inventores empezaron analizando la expansión de la luz junto con la disminución en la altura celular de la monocapa epitelial. Bajo las condiciones de marcado de los presentes inventores, el software no fue capaz de discriminar entre capa celular y luz debido a la falta de contraste. Por lo tanto, el aumento del área de los organoides total y normalizada se analizó durante la hinchazón inducida por forskolina, medida fácilmente por el software (Figura 9).

Referencias para el Ejemplo 1

Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. Sato T, Vries RG, Snippert HJ, van de Wetering M, Barker N, Stange DE, van Es JH, Abo A, Kujala P, Peters PJ, Clevers H. Nature. 2009 May 14;459(7244):262-5

Long-term expansion of epithelial organoids from human colon, adenoma, adenocarcinoma, and Barrett's epithelium. Sato T, Stange DE, Ferrante M, Vries RG, Van Es JH, Van den Brink S, Van Houdt WJ, Pronk A, Van Gorp J, Siersema PD, Clevers H. Gastroenterology. 2011 Nov;141(5):1762-72.

Ejemplo 2

Los presentes inventores establecieron recientemente condiciones que permitían la expansión a largo plazo de organoides epiteliales de intestino humano, dando lugar a rasgos esenciales de la arquitectura de tejido *in vivo*. Aquí, los presentes inventores aplican esta tecnología para estudiar organoides intestinales primarios de pacientes que padecen fibrosis quística (CF), una enfermedad causada por mutaciones de genes del regulador de la conductancia transmembranaria de la fibrosis quística (CFTR). La forskolina induce la hinchazón rápida de organoides derivados de controles sanos (HC) o ratones no mutantes, que se reduce fuertemente en pacientes con CF o ratones mutantes F508del y está ausente en organoides nulos Cfr. Este fenómeno es fenocopiado por inhibidores específicos de CFTR. La hinchazón inducida por forskolina de organoides de HC y CF rectales expandidos *in vitro* se corresponde cuantitativamente con corrientes de aniones inducidas por forskolina en biopsias rectales recién extirpadas *ex vivo*. La función de F508del-CFTR se restaura tras la incubación a baja temperatura, así como por compuestos que restauran CFTR. Este ensayo relativamente simple y robusto facilitará el diagnóstico, estudios funcionales, desarrollo de fármacos y enfoques de medicina personalizada en CF.

Introducción

La proteína reguladora de la conductancia transmembranaria de la fibrosis quística (CFTR) funciona como un canal de aniones, y es esencial para la homeostasis de fluidos y de electrolitos en superficies epiteliales de muchos órganos, incluyendo pulmón e intestino. La fibrosis quística de trastorno recesivo autosómico (CF) se causa por mutaciones en el gen *CFTR*¹⁻³. La enfermedad de CF es altamente variable, y los pacientes tienen una esperanza de vida media de aproximadamente 40 años. Las mutaciones de pérdida de función causan transporte alterado de iones y de fluidos, que producen la acumulación de moco viscoso en el tracto pulmonar y gastrointestinal. Esto está asociado a infecciones bacterianas, inflamación aberrante y desnutrición⁴. Se han identificado más de 1900 mutaciones, pero la mutación más dominante (~67 % de alelos mutantes totales en todo el mundo) es una delección de fenilalanina en la posición 508 (F508del-CFTR) (www.genet.sickkids.on.ca). Esto causa plegamiento incorrecto, retención de ER y degradación temprana de la proteína CFTR que impide su función en la membrana plasmática⁵. Otras mutaciones en el gen *CFTR* que se han encontrado en pacientes con CF también alteran el plegamiento de las proteínas o la producción, apertura, conductancia, corte y empalme y/o interacciones con otras proteínas⁶.

Las terapias actuales para CF son principalmente sintomáticas y se centran en la reducción de la presión bacteriana, inflamación y normalización de la absorción de nutrientes y crecimiento físico. En los últimos años se han identificado múltiples compuestos que se dirigen a los defectos específicos de mutación de la propia proteína CFTR^{6,7}. Actualmente se realizan ensayos clínicos que usan compuestos que inducen (i) ultralectura del codón de terminación prematuro, (ii) corrección del tráfico de la membrana plasmática de CFTR (correctores), y (iii) mejora de la apertura de CFTR (potenciadores). Recientemente se ha completado con éxito un ensayo clínico de fase III para el potenciador VX-770 (Ivacaftor, Kalydeco) en pacientes con CF con una mutación G551D-CFTR, demostrando que

el objetivo del fármaco específico de mutación es factible en CF⁸. La terapia de combinación de un corrector (VX-809) y potenciador (VX-770) se evalúa actualmente en un ensayo clínico de fase II para el grupo de pacientes dominantes que alberga la mutación F508del-CFTR.

5 Aunque estos desarrollos recientes son muy prometedores, el nivel de restauración funcional de CFTR por estos fármacos todavía está limitado⁹⁻¹¹. Además, los pacientes muestran respuestas variables a estas terapias debido a mecanismos todavía no definidos^{8,12-14}. La incapacidad para predecir una capacidad de respuesta del paciente a un compuesto corrector limita la eficacia clínica y el registro de fármacos. Juntos, esto indica que se necesita con urgencia el desarrollo de nuevos compuestos y el cribado de la eficacia de fármacos al nivel de pacientes individuales. Hasta el momento, solo está disponible un número limitado de modelos de célula primaria para cribar compuestos que restauran la función de CFTR mutante. Cuando tal modelo *in vitro* pueda además expandirse para permitir el análisis de respuestas al fármaco de pacientes individuales, puede mejorar la eficacia de fármaco seleccionando subgrupos de pacientes que respondieron.

15 Aquí, los presentes inventores demuestran un ensayo cuantitativo rápido y simple para la función de CFTR en un método de cultivo basado en criptas intestinales primarias humanas y murinas que se desarrolló recientemente¹⁵⁻¹⁷. Este método de cultivo permite a las células madre intestinales expandirse dentro de organoides cerrados que contienen estructuras tipo cripta y una luz interna revestida por células diferenciadas, que da lugar a la arquitectura de tejido *in vivo*. El CFTR intestinal se expresa predominantemente en la membrana apical de las células de las criptas en las que su activación conduce a la secreción de electrólitos y fluidos¹⁸⁻²⁰. Los presentes inventores encontraron que la forskolina²¹ induce la hinchazón rápida de tanto organoides de control (HC) sanos humanos como de no mutantes murinos que dependen completamente de CFTR, como se demuestra por la estimulación de organoides intestinales derivados de ratones deficientes para CFTR o pacientes con CF, o tras la inhibición química de CFTR no mutante. Los niveles de hinchazón inducida por forskolina por organoides rectales ampliados *in vitro* son comparables a las corrientes de aniones inducidas por forskolina medidas en biopsias rectales humanas *ex vivo*. La temperatura y corrección química de la función de F508del-CFTR se detectó fácilmente por mediciones del transporte de fluido basadas en organoides, y las respuestas a un panel de fármacos que restauran CFTR fueron variables entre organoides rectales derivados de diferentes pacientes homocigotos F508del. Este ensayo robusto es la primera lectura funcional desarrollada en organoides humanos, y facilitará el diagnóstico, estudios funcionales, desarrollo de fármacos y medicina personalizada para CF.

Resultados

Cuantificación de la hinchazón de organoide inducida por forskolina

35 Los presentes inventores evaluaron primero si la forskolina, que aumenta AMPc intracelular y de tal modo activa CFTR, podía mediar en la secreción de fluido dentro de la luz de organoides del intestino delgado derivados de ratones no mutantes. Usando microscopía de célula viva, los presentes inventores observaron una expansión rápida de la luz y el área superficial total de los organoides cuando se añadió forskolina, mientras que organoides tratados con DMSO no se afectaron (**Fig. 10a**). Esta hinchazón inducida por forskolina (FIS) de organoides se invirtió después de la eliminación de forskolina lavando (**Fig. 15**).

45 A continuación, los presentes inventores cuantificaron estas respuestas por análisis de imagen imparcial. Los presentes inventores encontraron un excelente marcado celular mientras que los niveles de fondo del Matrigel circundante permanecían negativos usando Calcein-Green, un colorante permeable a la célula que gana fluorescencia y se retiene dentro de la célula tras la conversión metabólica por células vivas. La intensidad fluorescente de objetos marcados con Calcein-Green fue en promedio >100 veces mayor en comparación con niveles de fondo. Los presentes inventores cuantificaron FIS de organoides usando microscopía confocal de célula viva y software de formación de imagen que calcula el aumento relativo en el área total de todos los objetos fluorescentes para cada momento de tiempo tras la adición de forskolina por pocillo (ejemplos representativos de reconocimiento de objetos, y FIS para organoides individuales se indican en **Fig. 10b,c; Fig. 16a**). La mayoría de los organoides responde a estimulación de forskolina (**Fig. 10d**). Aproximadamente el 5-10 % de estructuras que son organoides tanto muy pequeños, como no viables en forma irregular, no responden a forskolina (**Fig. 16b,c**). Como solo representan una fracción menor del área superficial total de los organoides en un pocillo, la cuantificación de FIS no fue diferente con o sin preselección de estructuras que responden (**Fig. 16d**). Las mediciones de tres pocillos independientes muestran variación limitada (**Fig. 10e**). Los presentes inventores observaron una relación dependiente de la dosis entre la forskolina y el aumento del área superficial con el tiempo (**Fig. 10f**). Se muestra FIS de organoides murinos para los primeros 10 minutos, ya que algunos organoides no mutantes explotan y colapsan cuando se realizaron estimulaciones más largas de 10 minutos (**Fig. 17a**). Juntos, estos resultados muestran que la hinchazón de organoide inducida por forskolina puede cuantificarse por análisis de imagen fluorescente imparcial.

La hinchazón inducida por forskolina de organoides murinos es dependiente de CFTR

65 Altos niveles de ARNm de Cftr en estos organoides apoyan un posible papel para CFTR en la hinchazón inducida por forskolina (**Fig. 18**). Para demostrar que FIS es dependiente de CFTR, los presentes inventores usaron inhibidores químicos de CFTR^{22,23}, y Cftr^{-/-24}, así como ratones mutantes F508del-CFTR^{25,26}. La pre-incubación (2

horas) con los inhibidores de CFTR CFTR_{inh}-172²² y GlyH-101²³ redujo independientemente la FIS respectivamente ~90 % y ~75 % en comparación con tratamiento con vehículo (**Fig. 11a**). Su acción combinada impidió completamente FIS en los momentos de tiempo analizados. Los presentes inventores confirmaron además FIS dependiente de CFTR usando organoides aislados de ratones deficientes para *Cftr*. FIS estaba ausente cuando se ensayaron los organoides de ratones deficientes para *Cftr* (**Fig. 11b,d**). El marcado con Calcein-Green fue comparable entre organoides no mutantes y mutantes, indicando que las células deficientes para *Cftr* fueron viables. Los organoides de ratones que expresan F508del-CFTR presentaron FIS baja, pero detectable, que sugiere actividad de CFTR residual, consistente con observaciones tempranas en este modelo de ratón^{25,26} (**Fig. 11c,e**). En apoyo de esto, la FIS atenuada de organoides de F508del-CFTR fue sensible a CFTR_{inh}-172 (**Fig. 11f**). Juntos, estos datos demuestran que FIS en organoides murinos es completamente dependiente de CFTR.

Temperatura y corrección química de F508del-CFTR de murino

Para indicar además que el ensayo es sensible a la corrección de la función de CFTR, los presentes inventores realizaron experimentos de rescate de temperatura, un método ampliamente aceptado para aumentar la función de F508del-CFTR²⁷. El plegamiento incorrecto de F508del-CFTR se reduce en 27 °C conduciendo a niveles mejorados de CFTR funcional en la membrana plasmática. Los presentes inventores observaron niveles elevados de FIS tras la incubación durante la noche a 27 °C (**Fig. 11f**). La inhibición química de la actividad de CFTR redujo fuertemente FIS en organoides cultivados a temperatura reducida y normal (**Fig. 11f**). Los presentes inventores usaron después los correctores químicos VRT-325²⁸ y Corr-4a²⁹ para restaurar la función de F508del-CFTR. La pre-incubación (24 horas) con VRT-325 mejoró FIS, mientras que Corr-4a solo mejoró ligeramente FIS, y fue aditivo a la corrección por VRT-325 (**Fig. 11g**). La inhibición química de CFTR indicó que la FIS inducida por VRT-325 y Corr-4a fue completamente dependiente de CFTR. Raramente se observó el colapso de organoides de F508del-CFTR rescatados (**Fig. 17b**). En conjunto, estos resultados demostraron que FIS de organoides murinos puede revelar la restauración funcional de F508del-CFTR por enfoques de corrección.

La hinchazón inducida por forskolina de organoides humanos es dependiente de CFTR

Los presentes inventores aplicaron a continuación las condiciones de ensayo a cultivos de organoides intestinales humanos. Mientras que tanto CFTR maduro (banda C, 170 kDa) como CFTR inmaduro (banda B, 130 kDa) se detectó por análisis de transferencia Western en organoides de HC humanos, solo CFTR inmaduro se detectó en organoides de CF. No se observó ninguna banda B o C de CFTR en organoides que llevaban E60X³⁰ y un alelo no informado que induce un desplazamiento de marco en NBD2 en el residuo 1250 (4015delATTT). E60X y la mutación 4015delATTT recientemente identificada producen lo más probablemente la producción de una proteína truncada, no funcional. La especificidad de la banda B y la banda C de CFTR se indicó además por tratamiento con Endo H y PNGasa F⁵, respectivamente (**Fig. 12a**). La expresión de CFTR en la membrana apical se demostró en organoides de control sanos por inmunocitoquímica, pero no en organoides de CF, como se indica por co-localización con actina apical (**Fig. 12b**). De acuerdo con los experimentos murinos, los presentes inventores observaron hinchazón estimulada por forskolina rápida de organoides de control sanos que se redujo tras 3 horas de pre-incubación con CFTR_{inh}-172 o GlyH-101, y se inhibió completamente por el tratamiento combinado con estos inhibidores (**Fig. 12c**). Los organoides humanos muestran cinética algo más lenta cuando se comparan con organoides murinos y raramente colapsan durante el tratamiento de forskolina a largo plazo (**Fig. 12c; Fig. 17c**).

Los presentes inventores analizaron FIS en un número grande de organoides intestinales principalmente derivados del recto, pero también de duodeno, íleon y colon. Los presentes inventores observaron FIS fuerte en organoides derivados de sujetos con HC (organoides rectales de pacientes con HC o CF se muestran en la **Fig. 11d**, todos los organoides se presentan en la **Fig. 19a**). Los organoides rectales derivados de pacientes que son heterocigotos compuestos para F508del y A455E³¹, un genotipo que está asociada a CF³² leve, presentaron niveles de FIS claramente reducidos en comparación con organoides de control sanos. Los pacientes con genotipos de CF graves (homocigotos para F508del; heterocigotos compuestos para F508del y L927P³³, o G542X³¹) presentaron FIS mucho más bajo, pero todavía detectable, que fue variable entre pacientes individuales (**Fig. 12e**). No se midió FIS se midió en organoides de E60X/4015delATTT. La inhibición química de CFTR suprimió todas las respuestas de FIS de organoides de CF (**Fig. 19b+c**).

Las mediciones de FIS de organoides de HC rectales expandidos *in vitro* u organoides de CF subdivididos en genotipos grave y leve se correlacionaron fuertemente con mediciones de corriente intestinal inducidas por forskolina (ICM) realizadas en biopsias de succión rectales^{34,35} de las cuales se originaron estos organoides (**Fig. 12f**). La mayoría de los trazados de ICM de biopsias de pacientes individuales mostraron corrientes residuales de aniones inducidas por forskolina que se correspondieron con una respuesta de forskolina dependiente de CFTR cuantitativamente similar en el ensayo de FIS (un trazado de ICM representativo, un análisis de pares de FIS y ICM para pacientes individuales y análisis de correlación ordinal de Spearman (R=0,84, p=0,001) se proporcionan en la **Fig. 20a-c**, respectivamente). Juntos, estos datos indican que FIS en organoides humanos puede medir con precisión la función de CFTR, y muestra que la función de CFTR residual en organoides rectales intestinales puede diferir entre individuos homocigotos para la mutación F508del-CFTR.

Corrección de CFTR química en organoides de CF rectales humanos

Los presentes inventores evaluaron a continuación si la función de F508del-CFTR podría aumentarse en organoides humanos por incubación a temperatura baja, o por los correctores químicos conocidos VRT-325, Corr-4a, C8 (<http://cftrfolding.org>), VX-809³⁶ y el potenciador VX-770⁹. La incubación de organoides homocigotos F508del a baja temperatura aumentó la FIS como era de esperar, y se inhibió por inhibidores de CFTR químicos (**Fig. 13a**). Los presentes inventores establecieron a continuación las curvas de respuesta a dosis para el tratamiento simple de VX-809 (tras pre-incubación de 24 h) o VX-770 (añadido simultáneamente con forskolina) en organoides de 6 pacientes F508del homocigóticos (**Fig. 13b**), y los valores CE50 medidos de 135 ± 40 nM y 161 ± 39 nM, respectivamente. Estas curvas de respuesta a dosis están dentro de los intervalos previamente informados en células epiteliales bronquiales humanas^{9,36}. La combinación de niveles de FIS elevados inducidos por VX809 y VX770, que se suprimió por inhibición de CFTR química (ejemplos representativos se muestran en la **Fig. 13c**). A continuación se analizó la capacidad de diversos correctores para restaurar FIS tras 24 h de pre-incubación en organoides homocigotos de F508del. Todos los correctores aumentaron FIS, aunque con una eficacia diferente (**Fig. 13d-f**; véase la **Fig. 21** para respuestas en organoides no rectales). El aumento de las respuestas de FIS por terapias de combinación se inhibió completamente por la presencia de inhibidores de CFTR. Se observó que VRT-325/Corr-4a o C8/Corr-4a aumentaron sinérgicamente FIS (véase también la **Fig. 22**), que fue en claro contraste con el efecto aditivo de tratamiento con VRT-325/Corr-4a observado en organoides murinos (**Fig. 11g**). Estos datos indican que FIS puede medir de forma segura la corrección o potenciación de F508del-CFTR.

Respuestas diferenciales a fármacos que restauran CFTR en organoides rectales

Los presentes inventores estudiaron a continuación respuestas de FIS a un panel de fármacos que restauran CFTR en organoides rectales derivados de 9 individuos que albergan diversas mutaciones de *CFTR* graves, incluyendo 6 pacientes homocigotos F508del. De entre los organoides homocigotos de F508del, los presentes inventores observaron diferencias en FIS inducida por fármaco (**Fig. 14a-c**). En general, FIS fue variable entre organoides tras la incubación con fármacos simples, y la distribución de respondedores altos y bajos fue única para un enfoque de restauración (**Fig. 14a-c**; el orden de pacientes es similar a la Fig. 12e en el panel 'CF grave'). CF5 parece ser un respondedor bajo general a cualquier corrector o VX-770, pero mostró una respuesta excepcionalmente pequeña a VRT-325. Los organoides de CF3 y CF5 tienen respuestas similares a VX-809, pero difieren en su respuesta a C8. Los presentes inventores observaron que las combinaciones de VRT-325 y Corr-4a en general sinergizaron más fuertemente para inducir FIS que C8 y Corr-4a. La FIS medida con respecto a la FIS esperada (valores aditivos de tratamiento simple; ilustrado en la **Fig. 22**) es bastante constante entre la mayoría de los pacientes. Todos los organoides heterocigotos compuestos de F508del también responden a la corrección (véase la **Fig. 23** para organoides de F508del/A455E), pero no se observó corrección o potenciación en organoides de E60X/4015delATTT (**Fig. 14a-c**). En este caso se espera el fallo para corregir CFTR ya que ninguna banda B o C de CFTR se detectó en estos organoides por transferencia Western (Fig. 12a). Los presentes inventores compararon a continuación las respuestas a fármacos de organoides de F508del a niveles de FIS de organoides de CF o HC leves tratados con vector vacío (**Fig. 14d**). Esta comparación indicó que VX-809 es el corrector más potente, y ese tratamiento combinado con VX-809 y VX-770 induce FIS más allá de los niveles observados en organoides de F508del/A455E, alcanzando ~60 % de niveles HC. Juntos, estos resultados demuestran que la potencia de compuestos que se dirigen a CFTR para restaurar la función de CFTR varía ampliamente entre organoides de pacientes con CF individuales, incluyendo homocigotos para F508del-CFTR.

Discusión

En conjunto, los resultados de los presentes inventores indican que la hinchazón inducida por forskolina de tanto organoides intestinales de ratón como humanos es dependiente de CFTR. El aumento rápido en el área superficial inducida por forskolina resulta probablemente de las características casi fisiológicas de organoides intestinales. Los datos previos indican que la forskolina puede aumentar la expansión luminal en estructuras tipo organoide cultivadas a partir de líneas celulares MDCK renales, LIM1863 colónicas o esferoides intestinales murinos^{20,37,38}, pero la amplitud más grande y velocidad de la respuesta de FIS probablemente resulta de niveles de expresión CFTR superiores en el modelo de cultivo de tejido primario usado aquí.

El transporte de fluido medido por FIS en organoides rectales se correlacionó con la ICM realizada en las biopsias de succión rectales correspondientes. Este ensayo de transporte de fluido puede, por lo tanto, ser un complemento valioso a las mediciones eléctricas de función de CFTR actualmente llevadas a cabo en los centros de CF y puede servir para complementar datos obtenidos por ICM. Usando ICM y FIS, los presentes inventores encontraron que la mayoría de los pacientes F508del-CFTR mostraron alguna función de CFTR residual, sugiriendo que F508del-CFTR se expresa en la superficie apical a niveles bajos^{39,41}. Esto también se soporta por la inducción de FIS por el potenciador VX-770 en ausencia de correctores, un efecto que fue previamente informado para células epiteliales bronquiales humanas⁹. Los datos clínicos también apoyan el concepto de que F508del-CFTR se expresa a niveles bajos en la membrana apical de epitelios de pacientes con CF homocigotos F508del^{42,43}.

FIS y ICM emparejadas permiten la comparación de velocidades de secreción de fluido y flujos de iones como se mide por ICM. Basándose en la geometría de los organoides durante la FIS, y las suposiciones de que la luz de

organoide promedio es una esfera y que la hinchazón promedio es similar en las tres dimensiones y lineal durante el transcurso de tiempo de un experimento, los presentes inventores calcularon una velocidad de secreción de fluido inicial de $26 \pm 23 \mu\text{l h}^{-1} \text{cm}^{-2}$ en organoides de HC (que se corresponde con una estimación de $1,0 \times 10^2 \mu\text{Amp/cm}^{-2}$ basándose en la secreción de cloruro isotónico). Cuando los presentes inventores asumen la secreción de cloruro isotónico durante ICM, estiman que las corrientes medidas se corresponderían con una tasa de secreción de fluido aproximada de $12 \mu\text{l h}^{-1} \text{cm}^{-2}$. Esta tasa supera en gran medida los valores informados previamente para quistes de células MDCK⁴⁴, y para epitelio de las vías respiratorias⁴⁵.

Este estudio demuestra claramente que FIS puede restaurarse por fármacos con capacidad de restauración de CFTR conocida. Curiosamente, los presentes inventores observaron que respuestas al fármaco de organoides son variables entre pacientes con CF, incluso entre organoides homocigotos de F508del-CFTR. Esto plantea la posibilidad de que este ensayo *in vitro* pueda predecir la capacidad de respuesta al fármaco *in vivo* de pacientes individuales. Un modelo terapéutico ideal para CF sería cribar la efectividad de fármacos que restauran CFTR disponibles directamente después del diagnóstico de CF para optimizar el tratamiento al nivel personal antes del inicio de la enfermedad. El enfoque de medicina personalizada también puede facilitar el desarrollo y la aprobación de fármacos a los cuales solo responden subgrupos de pacientes, y limitar los riesgos económicos asociados a la investigación de fármacos. Además, puede usarse para la aprobación de fármacos en pacientes que están genotípicamente incorrectamente apareados con fármacos que han sido validados por un genotipo de CFTR específico. Los resultados de fase II provisional de un ensayo actual publicado en sitios web de la Fundación de Fibrosis Quística de Norte América (www.cff.org) y Vertex (www.vrtx.com) indican que las respuestas del fármaco a monoterapia con VX-809 y VX770, o VX-770¹⁴, en sujetos F508del CFTR, son altamente variables entre pacientes. Sin embargo, queda por establecer el potencial predictivo de mediciones de la función de CFTR basada en organoide para sensibilidad al fármaco *in vivo*.

Actualmente, las respuestas de fármacos específicas del paciente pueden predecirse usando biopsias rectales *ex vivo*⁴⁶ o modelos de cultivo de tejido de las vías respiratorias primarias⁴⁷. En comparación con estas técnicas, los cultivos de organoide parecen superiores en permitir la generación de conjuntos de datos grandes y robustos de pacientes individuales. El análisis de la función de CFTR en cultivos de organoide es relativamente fácil, rápido y robusto. Los organoides se auto-diferencian en estructuras que dan lugar a tejido en placas de 96 pocillos que permite la medición de hasta 80 organoides por pocillo y hasta 96 condiciones por experimento. En este formato, las curvas de respuesta a dosis medidas por triplicado para múltiples fármacos por paciente individual pueden generarse fácilmente en múltiples momentos de tiempo del cultivo como se demuestra en este estudio.

Usando el enfoque de análisis de imagen descrito aquí, pueden desarrollarse enfoques de rendimiento superior para identificar compuestos novedosos que restauran la función de CFTR cuando es factible la siembra en placas automatizada y la estimulación de organoides. Cuando los presentes inventores compararon las respuestas de fármacos en organoides con los datos clínicos limitados que se han publicado en pacientes homocigotos F508del-CFTR^{13,14} (www.cff.org), solo se ha informado que el tratamiento de combinación de VX-809 y VX-770 mejora la función del pulmón en aproximadamente el 50 % de pacientes homocigotos F508del. Esta combinación induce niveles de FIS aproximadamente 1,5 veces superiores en organoides homocigotos F508del-CFTR en comparación con organoides F508del/A455E no tratados, y hasta el 60 % de niveles de FIS de organoides de HC. No es poco común que los efectos del tratamiento en modelos *in vitro* sean superiores a los efectos medidos *in vivo*, pero la corrección de pliegue en el ensayo de FIS también supera la corrección en epitelio bronquial humano cultivado aproximadamente 2 veces^{9,36}. Esto puede indicar que los factores específicos de tejido pueden controlar la eficacia del corrector. Es también probablemente que las tasas de FIS estén subestimadas en HC cuando la expresión de CFTR ya no es limitante de la velocidad para FIS más allá de un umbral particular, por ejemplo, por el transporte de ion basolateral. Estos datos pueden sugerir que los novedosos fármacos que restauran CFTR pueden tener impacto clínico cuando FIS alcanza niveles de hasta ~60 % de FIS no mutante.

Dos aspectos importantes de los cultivos de organoides hacen a esta tecnología altamente adecuada para estudios de seguimiento. Primeramente, los organoides pueden expandirse en gran medida mientras que mantienen intactos los compartimientos de células madre durante el cultivo a largo plazo (durante 40 pases)¹⁶. La generación de grandes números de células ayudará a estudios biológicos y bioquímicos celulares de alteraciones celulares dependientes de CFTR, y es un requisito previo para cribados de alto rendimiento. En segundo lugar, los organoides pueden almacenarse en nitrógeno líquido, permitiendo la generación de bancos de células primarias de pacientes con CF. Éstos pueden usarse para identificar y estudiar factores celulares asociados con fenotipos clínicos en pacientes con CF, y permitiría el análisis específico del paciente de fármacos recientemente desarrollados usando materiales que han sido previamente adquiridos.

Además de las posibles aplicaciones en la investigación de CF, este ensayo puede ser adecuado para el desarrollo de fármacos para tratar diarrea secretora, una afección potencialmente mortal que resulta de la hiper-activación de CFTR por toxinas patógenas tales como la toxina del cólera⁴⁸ (**Fig. 24**), y para estudios de homeostasis de electrolitos en general.

En resumen, los presentes inventores describieron un ensayo rápido y robusto para la cuantificación de la función de CFTR usando el modelo de cultivo intestinal primario que da lugar a rasgos esenciales de la arquitectura de tejido *in*

vivo. Este ensayo relativamente simple facilitará el diagnóstico, estudios funcionales, desarrollo de fármacos, así como enfoques de medicina personalizada en CF.

Métodos

5

Ratones

Los ratones con genes inactivados $Cftr^{tm1Cam}$ ($Cftr^{-/-}$)²⁴ se retrocruzaron con ratones FVB y $Cftr^{tm1eur}$ (F508del-CFTR)^{25,26} se retrocruzaron con ratones C57B1/6 (F12). Los ratones FVB $Cftr^{-/-}$ congénitos o ratones C57B1/6 F508del-CFTR se usaron con sus compañeros de camada no mutantes. Los ratones se mantuvieron en una instalación de ambiente controlado en el Centro Médico Erasmus de Rotterdam y aprobado por el Comité Ético local.

10

Material humano

La aprobación para este estudio se obtuvo por el Comité Ético del Centro Médico Universitario de Utrecht y el Centro Médico Erasmus de Rotterdam. Se generaron organoides de HC y CF rectales de cuatro biopsias de succión rectales después de las mediciones de corriente intestinal (ICM) obtenidas (i) durante el cuidado de CF estándar (E60X/4015ATTTdel; F508delG542X; F508del/L927P; 5x F508del/F508del), (ii) para fines de diagnóstico (1x HC) o (iii) durante la participación voluntaria en estudios de CF aprobados por el Comité Ético local (2x HC, 1x F508del/F508del). El material de un paciente con CF homocigótico F508del-CFTR y un control sano se derivó de secciones restantes de íleon proximal tras la cirugía debido a íleon meconial (el material fue amablemente proporcionado por el Dr K. Tenbrock, Departamento de Pediatría, Universidad RWTH de Aquisgrán). Se obtuvieron cuatro biopsias duodenales de 2 pacientes con CF por gastroduodenoscopia flexible para generar organoides de F508del/F508del y F508del/Exon17del. Se usó el mismo procedimiento para obtener 4 biopsias de 2 pacientes con sospecha de celiaquía. Las biopsias fueron macroscópicamente y patológicamente normales y se usaron para generar organoides de HC.

15

20

25

Aislamiento de criptas y cultivo de organoides de intestino de murino

Se generaron organoides murinos a partir de criptas del intestino delgado (SI) aisladas y se mantuvieron en cultivo como se ha descrito previamente¹⁵. Se usó medio condicionado con Rspo1 (las células Rspo-1 HEK293T establemente transfectadas fueron amablemente proporcionadas por Dr. C. J. Kuo, Departamento de Medicina, Stanford, CA) en lugar de Rspo-1 recombinante y se añadieron al medio de cultivo en una dilución 1:10. Se obtuvieron organoides de $Cftr^{-/-}$ y de F508del-CFTR de segmentos proximal y distal de SI, respectivamente. Se usaron organoides del pase 1-10 para la formación de imagen confocal.

30

35

Aislamiento de criptas y cultivo de organoides de biopsias humanas

El aislamiento y cultivo de criptas de células intestinales humanas se ha descrito previamente¹⁶. En resumen, se lavaron biopsias con disolución de quelación completa fría y se incubaron con EDTA 10 mM durante 30 (intestino delgado) o 60 (recto) minutos a 4 °C. Se recogió el sobrenadante y se lavó el EDTA. Las criptas se aislaron por centrifugación y se incorporaron en Matrigel (factor de crecimiento reducido, libre de fenol, BD bioscience) y se sembraron (50-200 criptas por 50 µl de Matrigel por pocillo) en placas de 24 pocillos. El Matrigel se polimerizó durante 10 minutos a 37 °C y se sumergió en medio de cultivo completo: Advanced DMEM/F12 complementado con penicilina/estreptomina, HEPES 10 mM, Glutamax, N2, B27 (todos de Invitrogen), *N*-acetilcisteína 1 µM (Sigma) y factores de crecimiento: 50 ng/ml de mEGF, 50 % de medio acondicionado con Wnt3a (WCM) y 10 % de medio condicionado con Noggin (NCM), 20 % de medio acondicionado con Rspo1, nicotinamida 10 µM (Sigma), gastrina 10 nM (Sigma), A83-01 500 nM (Tocris) y SB202190 10 µM (Sigma). El medio se recargó cada 2-3 días y los organoides se sometieron a pases 1:4 cada 7-10 días. Los organoides del pase 1-10 se usaron para la formación de imágenes confocales de célula viva. Para la producción de WCM y NCM, células L que producen Wnt3a (ATCC, nº: CRL-264) se seleccionaron para sub-clones de expresión alta y Noggin de longitud completa humana se transfectó establemente en células HEK293T, respectivamente (ambos fueron amablemente proporcionados por Clevers Laboratory). Las cantidades y actividad de los factores expresados en cada lote se evaluaron usando transferencias puntuales y plásmidos indicadores de luciferasa (TOPflash and FOPflash; Millipore) como se describió previamente^{49,50}.

40

45

50

55

Ensayos de estimulación

Se sembraron organoides humanos o de ratón de un cultivo de 7 días de edad en una placa de cultivo de 96 pocillos de fondo plano (Nunc) en 5 µl de Matrigel que contenía comúnmente 20-80 organoides y 100 µl de medio de cultivo. Un día después de la siembra, los organoides se incubaron durante 60 minutos con 100 µl de medio de cultivo estándar que contenía Calcein-Green 10 µM (Invitrogen). Para la óptima inhibición de CFTR, los organoides se pre-incubaron durante 2 h (ratón) o 3 h (humanos) con CFTR_{inh}-17250 µM, GlyH-101 50 µM o su tratamiento combinado (ambos de Cystic Fibrosis Foundation Therapeutics, Inc). Después del tratamiento con Calcein-Green (con o sin inhibición de CFTR), se añadió forskolina 5 µM y los organoides se analizaron directamente por microscopía

60

65

confocal de célula viva (LSM710, Zeiss, objetivo 5x). Se usaron tres pocillos para estudiar una condición y se analizaron hasta 60 pocillos por experimento. Para la corrección de CFTR, los organoides se pre-incubaron durante 24 horas con VRT-32510 μM , Corr-4a 10 μM , C8 10 μM (todos de Cystic Fibrosis Foundation Therapeutics, Inc), VX-809 3 μM (Selleck Chemicals LLC, Houston, EE.UU.) o combinaciones como se indica. Para la potenciación de CFTR se añadió VX-770 3 μM (Selleck Chemicals LLC) simultáneamente con forskolina. Las diluciones de VX-809 y VX-770 se usaron como se indica en la **Fig. 13b**.

Cuantificación del área superficial de los organoides

La hinchazón de organoides estimulada por forskolina se cuantificó automáticamente usando el software de formación de imagen Volocity (Improvision). Se calculó el aumento del área total de organoides (plano XY) en relación con T=0 de tratamiento de forskolina y se promedió de tres pocillos individuales por condición. El área bajo la curva (ABC) se calculó usando Graphpad Prism.

15 Análisis estadístico

Se usó una prueba de Kolmogorov-Smirnov para probar si los datos de ICM y FIS se distribuyeron normalmente. Se usó una prueba de la t de Student para datos emparejados para comparar FIS con o sin pre-selección de organoides de respuesta (**Fig. 16d**). Se usó una prueba de correlación ordinal de Spearman para correlacionar las mediciones ICM con la hinchazón de organoide (**Fig. 20c**). Un valor de $p < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo. Todos los datos se analizaron en SPSS statistics versión 20.0 para Windows.

Aislamiento de ARN y qPCR

A partir de organoides duodenales humanos que se cultivaron durante >12 semanas, el ARN se aisló con el minikit RNeasy (Qiagen) y se cuantificó por densidad óptica. Se sintetizó el ADNc a partir de 1 μg de ARN realizando una PCR de transcripción inversa (Invitrogen). A partir de organoides murinos del intestino delgado que se cultivaron durante > 6 semanas, el ARN se aisló usando Trizol (Invitrogen) y se cuantificó por densidad óptica. El ADNc se generó a partir de 500 ng por el kit de síntesis de ADNc iScriptTM (Bio Rad). Los niveles de ARN mensajero (ARNm) de *CFTR* humano y *Cftr* de ratón se determinaron por RT-PCR cuantitativa en tiempo real con el método SYBR Green (Bio-Rad). Se usó la abundancia de ARNm de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GADPH) o de β2M para medir la entrada de ADNc.

35 Análisis de transferencia Western

Para la detección de proteína CFTR, se lisaron los organoides de HC o CF en tampón de Laemmli complementado con comprimidos de inhibidor de proteasa completa (Roche). Los lisados se analizaron por SDS-PAGE y se transfirieron electroforéticamente a una membrana de poli(difluoruro de vinilideno) (Millipore). La membrana se bloqueó con 5 % de proteína de la leche en TBST (0,3 % de Tween, Tris 10 mM a pH 8 y NaCl 150 mM en H₂O) y se sondó durante la noche a 4 °C con una combinación de los anticuerpos monoclonales de ratón anti-CFTR 450, 769 y 596 (1:5000, Cystic Fibrosis Folding consortium), seguido por incubación con anticuerpos secundarios conjugados con HRP y desarrollo de ECL. Para la desglucosilación de CFTR, los organoides de HC se lisaron en tampón RIPA (Tris 50 mM a pH 8,0, NaCl 150 mM, 0,1 % de SDS, 0,5 % de desoxicolato sódico y 1 % de Triton) complementado con comprimidos de inhibidor de proteasa completa y se incubaron con PNGasa F y Endo H durante 3 h a 33 °C (ambos de New England BioLabs).

Inmunocitoquímica

Se incubaron los organoides completos de un cultivo de 5 días con metanol (sigma) durante 10 minutos a -20 °C. Los organoides se sondaron con el anticuerpo monoclonal de ratón anti-CFTR M3A7 (1:25; de Abcam) durante 16 horas a 4 °C, seguido por incubación simultánea de anticuerpos secundarios conjugados con Alexa Fluor 649 (1:500; de Sigma) y faloidina-FITC durante 1 hora a 4 °C (1:200; de Sigma). Los organoides se incorporaron en Mowiol que contenía DAPI (1:10000) y se analizaron por microscopía confocal como se ha descrito previamente⁵¹.

55 Medición de corriente intestinal (ICM)

Se midió la secreción de cloruro transepitelial en biopsias de succión rectales humanas (4 por sujeto) como se ha descrito previamente³⁵ usando una modificación reciente (prelavado repetitivo)³⁶ que acentúa mejor las respuestas de corrientes de aniones inducidas por forskolina reduciendo los niveles de AMPc basal. En resumen, las biopsias se recogieron en solución salina amortiguada con fosfato en hielo y se montaron directamente en cámaras micro-Ussing adaptadas (abertura 1,13 o 1,77 mm²). Después del equilibrio, los siguientes compuestos se añadieron en un orden normalizado al lado mucoso (M) o seroso (S) del tejido: amilorida (0,01 mM, M), para inhibir la absorción de Na⁺ electrogénica sensible a amilorida; carbacol (0,1 mM, S), para iniciar la secreción colinérgica de Ca²⁺ y de Cl⁻ asociada a la proteína cinasa C; DIDS (0,2 mM, M), para inhibir los canales de Cl⁻ no de CFTR sensibles a DIDS como los canales de Cl⁻ dependientes de Ca²⁺ (CaCCs); histamina (0,5 mM, S), para reactivar la ruta secretora

dependiente de Ca^{2+} y para medir el componente insensible a DIDS de la secreción Cl^- dependiente de Ca^{2+} ; forskolina (0,01 mM, S), para activar completamente la secreción de aniones mediada por CFTR. Los valores de I_{sc} sin procesar (pA) se convirtieron en $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ basándose en el área superficial de la abertura.

5 Referencias para el Ejemplo 2

1. Riordan, J. R. et al. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 245, 1066-1073 (1989).
2. Rommens, J. M. et al. Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science* 245, 1059-1065 (1989).
3. Kerem, B. et al. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science* 245, 1073-1080 (1989).
4. Ratjen, F. & Döring, G. Cystic fibrosis. *Lancet* 361, 681-689 (2003).
5. Cheng, S. H. et al. Defective intracellular transport and processing of CFTR is the molecular basis of most cystic fibrosis. *Cell* 63, 827-834 (1990).
6. Riordan, J. R. CFTR function and prospects for therapy. *Annu. Rev. Biochem.* 77, 701-726 (2008).
7. Clancy, J. P. & Jain, M. Personalized medicine in cystic fibrosis: dawning of a new era. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 186, 593-597 (2012).
8. Ramsey, B. W. et al. A CFTR potentiator in patients with cystic fibrosis and the G551 D mutation. *N. Engl. J. Med.* 365, 1663-1672 (2011).
9. Van Goor, F. et al. Rescue of CF airway epithelial cell function in vitro by a CFTR potentiator, VX-770. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 18825-18830 (2009).
10. Rabeh, W. M. et al. Correction of both NBD1 energetics and domain interface is required to restore ΔF508 CFTR folding and function. *Cell* 148, 150-163 (2012).
11. Welch, E. M. et al. PTC124 targets genetic disorders caused by nonsense mutations. *Nature* 447, 87-91 (2007).
12. Sermet-Gaudelus, I. et al. Ataluren (PTC124) induces cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein expression and activity in children with nonsense mutation cystic fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 182, 1262-1272 (2010).
13. Clancy, J. P. et al. Results of a phase IIa study of VX-809, an investigational CFTR corrector compound, in subjects with cystic fibrosis homozygous for the F508del-CFTR mutation. *Thorax* 67, 12-18 (2011).
14. Flume, P. A. et al. Ivacaftor in subjects with cystic fibrosis who are homozygous for the F508del-CFTR mutation. *Chest* 142, 718-724 (2012).
15. Sato, T. et al. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature* 459, 262-265 (2009).
16. Sato, T. et al. Long-term expansion of epithelial organoids from human colon, adenoma, adenocarcinoma, and Barrett's epithelium. *Gastroenterology* 141, 1762-1772 (2011).
17. Sato, T. et al. Paneth cells constitute the niche for Lgr5 stem cells in intestinal crypts. *Nature* 469, 415-418 (2011).
18. Field, M. Intestinal ion transport and the pathophysiology of diarrhea. *J. Clin. Invest.* 111, 931-943 (2003).
19. Venkatasubramanian, J., Ao, M. & Rao, M. C. Ion transport in the small intestine. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 26, 123-128 (2010).
20. Currid, A., Ortega, B. & Valverde, M. A. Chloride secretion in a morphologically differentiated human colonic cell line that expresses the epithelial Na^+ channel. *J. Physiol. (Lond.)* 555, 241-250 (2004).
21. Cunningham, S. A., Worrell, R. T., Benos, D. J. & Frizzell, R. A. AMPc-stimulated ion currents in *Xenopus* oocytes expressing CFTR cRNA. *Am. J. Physiol.* 262, C783-788 (1992).
22. Thiagarajah, J. R., Song, Y., Haggie, P. M. & Verkman, A. S. A small molecule CFTR inhibitor produces cystic fibrosis-like submucosal gland fluid secretions in normal airways. *FASEB J.* 18, 875-877 (2004).
23. Muanprasat, C. et al. Discovery of glycine hydrazide pore-occluding CFTR inhibitors: mechanism, structure-activity analysis, and in vivo efficacy. *J. Gen. Physiol.* 124, 125-137 (2004).
24. Ratcliff, R. et al. Production of a severe cystic fibrosis mutation in mice by gene targeting. *Nat. Genet.* 4, 35-41 (1993).
25. French, P. J. et al. A delta F508 mutation in mouse cystic fibrosis transmembrane conductance regulator results in a temperature-sensitive processing defect in vivo. *J. Clin. Invest.* 98, 1304-1312 (1996).
26. Wilke, M. et al. Mouse models of cystic fibrosis: phenotypic analysis and research applications. *J. Cyst. Fibros.* 10 Suppl 2, S152-71 (2011).
27. Denning, G. M. et al. Processing of mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is temperature-sensitive. *Nature* 358, 761-764 (1992).
28. Loo, T. W., Bartlett, M. C. & Clarke, D. M. Rescue of ΔF508 and other misprocessed CFTR mutants by a novel quinazoline compound. *Mol. Pharm.* 2, 407-413 (2005).
29. Pedemonte, N. et al. Small-molecule correctors of defective ΔF508 -CFTR cellular processing identified by high-throughput screening. *J. Clin. Invest.* 115, 2564-2571 (2005).
30. Strandvik, B. et al. Spectrum of mutations in the CFTR gene of patients with classical and atypical forms of cystic fibrosis from southwestern Sweden: identification of 12 novel mutations. *Genet. Test.* 5, 235-242 (2001).
31. Kerem, B. S. et al. Identification of mutations in regions corresponding to the two putative nucleotide (ATP)-binding folds of the cystic fibrosis gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 8447-8451 (1990).
32. Zielenski, J. Genotype and phenotype in cystic fibrosis. *Respiration* 67, 117-133 (2000).

33. Hermans, C. J., Veeze, H. J., Drexhage, V. R., Halley, D. J. & van den Ouweland, A. M. Identification of the L927P and delta L1260 mutations in the CFTR gene. *Hum. Mol. Genet.* 3, 1199-1200 (1994).
34. de Jonge, H. R. et al. Ex vivo CF diagnosis by intestinal current measurements (ICM) in small aperture, circulating Ussing chambers. *J. Cyst. Fibros.* 3 Suppl 2, 159-163 (2004).
- 5 35. De Boeck, K. et al. New clinical diagnostic procedures for cystic fibrosis in Europe. *J. Cyst. Fibros.* 10 Suppl 2, S53-66 (2011).
36. Van Goor, F. et al. Correction of the F508del-CFTR protein processing defect in vitro by the investigational drug VX-809. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 18843-18848 (2011).
37. Liu, J., Walker, N. M., Cook, M. T., Ootani, A. & Clarke, L. L. Functional Cftr in crypt epithelium of organotypic enteroid cultures from murine small Intestine. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* 302, C1492-1503 (2012)
- 10 38. Li, H., Yang, W., Mendes, F., Amaral, M. D. & Sheppard, D. N. Impact of the cystic fibrosis mutation F508del-CFTR on renal cyst formation and growth. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 303, F1176-1186 (2012).
39. Gee, H. Y., Noh, S. H., Tang, B. L., Kim, K. H. & Lee, M. G. Rescue of ΔF508-CFTR trafficking via a GRASP-dependent unconventional secretion pathway. *Cell* 146, 746-760 (2011).
- 15 40. Luo, Y., McDonald, K. & Hanrahan, J. W. Trafficking of immature DeltaF508-CFTR to the plasma membrane and its detection by biotinylation. *Biochem. J.* 419, 211-9- 2 p following 219 (2009).
41. Rennolds, J., Boyaka, P. N., Bellis, S. L. & Cormet-Boyaka, E. Low temperature induces the delivery of mature and immature CFTR to the plasma membrane. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 366, 1025-1029 (2008).
- 20 42. Chen, E. Y. T., Yang, N., Quinton, P. M. & Chin, W.-C. A new role for bicarbonate in mucus formation. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 299, L542-549 (2010).
43. Geborek, A. & Hjelte, L. Association between genotype and pulmonary phenotype in cystic fibrosis patients with severe mutations. *J. Cyst. Fibros.* 10, 187-192 (2011).
44. Sullivan, L. P., Wallace, D. P. & Grantham, J. J. Coupling of cell volume and membrane potential changes to fluid secretion in a model of renal cysts. *Kidney Int.* 45, 1369-1380 (1994).
- 25 45. Smith, J. J. & Welsh, M. J. Fluid and electrolyte transport by cultured human airway epithelia. *J. Clin. Invest.* 91, 1590-1597 (1993).
46. Roth, E. K. et al. The K⁺ channel opener 1-EBIO potentiates residual function of mutant CFTR in rectal biopsies from cystic fibrosis patients. *PLoS ONE* 6, e24445 (2011).
- 30 47. Wong, A. P. et al. Directed differentiation of human pluripotent stem cells into mature airway epithelia expressing functional CFTRTR protein. *Nat. Biotechnol.* 30, 876-882 (2012).
48. Thiagarajah, J. R. & Verkman, A. S. CFTR inhibitors for treating diarrheal disease. *Clin. Pharmacol. Ther.* 92, 287-290 (2012).
49. de Lau, W. et al. Lgr5 homologues associate with Wnt receptors and mediate R-spondin signalling. *Nature* 476, 293-297 (2011).
- 35 50. Korinek, V. et al. Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC^{-/-} colon carcinoma. *Science* 275, 1784-1787 (1997).
51. Beekman, J. M. et al. Syntenin-mediated regulation of Sox4 proteasomal degradation modulates transcriptional output. *Oncogene* 31, 2668-2679 (2012)

Observaciones adicionales

- 45 **Observación adicional 1.** Los organoides no mutantes murinos muestran hinchazón rápida tras el tratamiento con forskolina.
- Observación adicional 2.** La hinchazón inducida por forskolina está ausente en organoides derivados de ratones deficientes para CFTR.
- 50 **Observación adicional 3.** Los organoides de ratones que expresan F508del-CFTR presentan FIS baja, pero detectable, sugiriendo actividad de CFTR residual.
- Observación adicional 4.** Los organoides de control sanos humanos muestran hinchazón rápida tras el tratamiento con forskolina.
- 55 **Observación adicional 5.** La hinchazón inducida por forskolina en organoides derivados de un paciente con CF con un genotipo leve (F508del/A455E).
- Observación adicional 6.** Se observa FIS baja en organoides derivados de un paciente homocigoto F508del.
- 60 **Observación adicional 7.** No se detecta FIS en organoides rectales derivados de un paciente E60X/4015ATTTdel.
- Observaciones adicionales 8-16.** La restauración de FIS en organoides homocigotos de F508del rectales por VRT-325 (8), Corr-4a (9), C8 (10), VX-809 (11), VX-770 (12), VRT-325+Corr-4a (13), C8+Corr-4a (14), VX-809+VX-770 (15) o VX-809+VX-770 e inhibición CFTR (16).

Ejemplo 3

El regulador de la conductancia transmembranaria de la fibrosis quística (CFTR) funciona como canal de aniones, y es esencial para la homeostasis de fluidos y de electrolitos en superficies epiteliales de muchos órganos, incluyendo pulmón e intestino. La fibrosis quística (CF) de trastorno recesivo autosómico se causa por mutaciones del gen CFTR. La enfermedad de CF es altamente variable, y los pacientes tienen una esperanza de vida media de aproximadamente 40 años. Las mutaciones de pérdida de función causan transporte alterado de iones y de fluidos que producen la acumulación de moco viscoso en el tracto pulmonar y gastrointestinal. Esto está asociado a infecciones bacterianas, inflamación aberrante y desnutrición. Se han descrito más de 1500 mutaciones, pero la mutación más dominante (~67 % de alelos mutantes totales en todo el mundo) es una delección de fenilalanina en la posición 508 (CFTR-delF508). Esto causa plegamiento incorrecto, retención de ER y degradación temprana de la proteína CFTR que impide la función en la membrana plasmática. Otras mutaciones en el gen CFTR que se han encontrado en pacientes con CF también alteran el plegamiento de las proteínas o afectan la producción de proteína, apertura, conductancia, corte y empalme y/o interacciones con otras proteínas {Riordan:2008dp}.

La terapia actual para CF es principalmente sintomática y se centra en la reducción de la presión bacteriana, inflamación y normalización de la absorción de nutrientes y el crecimiento físico. Recientemente se han identificado múltiples compuestos que se dirigen a los defectos específicos de mutación de la propia proteína CFTR {Accurso:2010jx, Clancy:2011ic}. Actualmente se realizan ensayos clínicos que usan compuestos que inducen i) ultralectura del codón de terminación prematuro, ii) corrección del tráfico de la membrana plasmática de CFTR (correctores), y iii) mejora de la apertura de CFTR (potenciadores) {Rogan:2011es}. Recientemente se ha completado con éxito un ensayo clínico de fase III para un potenciador en pacientes con CF con una mutación CFTR-G551D, demostrando que el objetivo del fármaco específico de mutación es factible en CF {Shah:2011gu}. Las combinaciones de correctores y potenciadores se evalúan actualmente en un ensayo de fase II para el grupo de pacientes dominantes que alberga la mutación CFTR-delF508.

Aunque estos desarrollos recientes son muy prometedores, el nivel de restauración funcional de CFTR por estos fármacos en sistemas de modelo *in vitro* todavía está limitado. Además, los pacientes muestran respuestas variables a estas terapias debido a mecanismos todavía no definidos. La incapacidad para seleccionar estos subgrupos que no responden limita la eficacia clínica y el registro de fármaco. Juntos, esto indica que se necesita con urgencia el desarrollo de nuevos compuestos y cribado de la eficacia de fármaco al nivel de pacientes individuales. Hasta el momento, solo están disponibles modelos de células primarias limitados para cribar compuestos que restauran la función de CFTR mutante. Cuando tal modelo *in vitro* pueda además expandirse para permitir el análisis de respuestas al fármaco de pacientes individuales, puede mejorar la eficacia del fármaco seleccionando subgrupos de pacientes que respondieron.

Aquí, los presentes inventores demuestran un ensayo cuantitativo rápido para la función de CFTR en un método de cultivo basado en criptas intestinales primarias humanas y murinas. Este método de cultivo permite a las células madre intestinales expandirse dentro organoides cerrados que contienen estructuras tipo cripta y una luz interna {Sato:2011fy, Sato:2009jg}. El CFTR intestinal se expresa predominantemente en la membrana apical de las células de las criptas en las que su activación conduce a la secreción de electrolitos y fluidos {Venkatasubramanian:2010jc, Currid:2004ck}. En este estudio los presentes inventores evaluaron si la forskolina, que aumenta AMPc intracelular y de tal modo activa CFTR, podría mediar en el transporte de fluido dentro de la luz del organoide. Usando microscopía de célula viva, los presentes inventores observaron una expansión rápida de la luz, y área superficial total de los organoides cuando se añadió forskolina, mientras que los organoides tratados con DMSO no se afectaron (**Fig. 25a**). Esta hinchazón inducida por forskolina (FIS) de organoides se invirtió después de la eliminación de forskolina lavando (**Fig. 29**). Altos niveles de ARNm de CFTR en estos organoides apoyaron además un posible papel para CFTR en FIS de organoides (**Fig. 30**).

A continuación, los presentes inventores cuantificaron estas respuestas por análisis de imagen imparcial. Los presentes inventores encontraron un excelente marcado celular mientras que los niveles de fondo del Matrigel circundante permanecían negativos usando Calcein-Green, un colorante permeable a la célula que tras la conversión metabólica por células vivas gana fluorescencia y se retiene dentro de la célula. Los presentes inventores cuantificaron FIS de organoides individuales usando microscopía confocal de célula viva y software de formación de imagen que calcula el área superficial del objeto fluorescente para cada momento de tiempo tras la adición de forskolina (**Fig. 25b,c**). Se estimularon simultáneamente múltiples organoides en un pocillo simple y se analizaron (**Fig. 25d**). Los presentes inventores observaron una relación dependiente de la dosis entre la forskolina y el aumento del área superficial en el tiempo (**Fig. 25d**). Se muestra FIS de organoides murinos para los 10 primeros minutos, ya que algunos organoides no mutantes colapsaron cuando se realizaron estimulaciones de hasta 30 minutos (**Fig. 31a**). Juntos, estos resultados muestran que la expansión de organoide inducida por forskolina puede cuantificarse por el análisis de imagen fluorescente imparcial.

Para demostrar un papel para CFTR en la hinchazón inducida por forskolina, los presentes inventores usaron inhibidores químicos de CFTR, y ratones mutantes CFTR-delF508, así como inactivados en CFTR {French:1996hb, Ratcliff:1993ik}. La preincubación con los inhibidores de CFTR CFTRinh-172 {Thiagarajah:2004ck} y GlyH-101 {Muanprasat:2004fx} redujo independientemente la FIS ~80 % en comparación con el tratamiento con vehículo

(Fig. 26a). Su acción combinada impidió completamente FIS en los momentos de tiempo analizados. Los presentes inventores confirmaron adicionalmente FIS dependiente de CFTR usando organoides aislados de ratones deficientes para CFTR. FIS estuvo completamente ausente cuando se ensayaron los organoides de ratones deficientes para CFTR (Fig. 26b,c). El marcado con Calcein-Green fue similar, indicando que las células deficientes para CFTR fueron viables. Los tamaños absolutos de los organoides seleccionados al inicio de los experimentos no fueron diferentes (Fig. 26d,g). Los organoides de ratones que expresan CFTR-delf508 presentaron FIS bajo, pero detectable, sugiriendo actividad de CFTR residual, consistente con observaciones tempranas en este modelo de ratón (French, 1996, Wilke 2011) y en una subcategoría de pacientes F508del CFTR (Bronsveld/Veeze) (Fig. 26e,f). En apoyo de esto, la FIS en ratones CFTR-delf508 es parcialmente sensible a CFTRinh-172 (Fig. 26h).

Para indicar además que el ensayo de los presentes inventores es sensible a la corrección de la función de CFTR, los presentes inventores realizaron experimentos de rescate de temperatura, un método ampliamente aceptado para aumentar la función de CFTR-delf508 (Denning:1992hs). El plegamiento incorrecto de CFTR-delf508 se reduce a 27 °C, conduciendo a niveles mejorados de CFTR funcional en la membrana plasmática. Los presentes inventores observaron niveles elevados de FIS tras la incubación durante la noche a 27 °C (Fig. 26h). Aunque FIS de organoides de CFTR-delf508 bajo estas condiciones alcanza niveles comparables a organoides no mutantes, raramente se produce el colapso del organoide en el plazo de 30 minutos (Fig.31b). La inhibición química de la actividad de CFTR redujo gravemente FIS en organoides cultivados a temperatura reducida y normal (Fig. 26h). En conjunto, estos resultados demostraron que FIS en organoides murinos es completamente dependiente de CFTR, y es sensible para detectar función elevada de CFTR-delf508 por un enfoque de corrección estándar descrito en la bibliografía.

Los presentes inventores aplicaron a continuación sus condiciones de ensayo a cultivos de organoides humanos. Las condiciones de cultivo para organoides humanos y de ratón difieren significativamente, conduciendo a un fenotipo tipo quiste de organoides humanos cuando se comparan con organoides de ratón (Fig. 27a, panel izquierdo). Este fenotipo tipo quiste resulta de grandes cantidades de Wnt3a en el medio de cultivo estándar (Barker:2010cp, Sato:2011fy). Los presentes inventores observaron que los organoides se remodelan a un fenotipo incipiente cuando se cultivan bajo concentraciones de Wnt3a bajas (Fig. 27a, panel derecho), una condición que impide la expansión a largo plazo del cultivo de organoides, pero no afecta inmediatamente la viabilidad celular. Los presentes inventores estimularon organoides cultivados a concentraciones de Wnt3a altas (Fig. 27b,c) y bajas (Fig. 27b,d) con forskolina, y observaron FIS más grande en condiciones de Wnt3a bajas, alcanzando niveles comparables a organoides murinos. A diferencia de los organoides murinos, el organoide humano difícilmente hace colisión durante FIS en el plazo de 40 minutos (Fig.31c). En tanto condiciones de Wnt3a altas como bajas, la FIS se inhibió completamente por inhibidores de CFTR. Estos datos indican que la FIS en organoides humanos está mediada por CFTR.

A continuación, los presentes inventores ensayaron organoides humanos derivados de un paciente CFTR F508del homocigoto. No se observó hinchazón inducida por forskolina en organoides de CF (Fig. 28a). Sin embargo, la FIS se indujo en organoides de CF tras el tratamiento con correctores de CFTR VRT-325 y corr-4a (Fig. 28b). Esto además indicó que FIS en organoides humanos es dependiente de CFTR, y que el ensayo de los presentes inventores puede usarse para medir fármacos que afectan la función de F508del CFTR.

En conjunto, los resultados de los presentes inventores indican que la hinchazón inducida por forskolina de estructuras de organoide de intestino delgado tanto de ratón como de humano es dependiente de CFTR. El ensayo desarrollado recientemente de los presentes inventores para medir la actividad de CFTR podría además desarrollarse para el diagnóstico de CF y para realizar cribados de alto rendimiento para identificar compuestos novedosos que restauran la función de CFTR. Además, este ensayo puede ser adecuado para el desarrollo de fármacos para tratar diarrea secretora, una afección potencialmente mortal que resulta de hiper-activación de CFTR por toxinas patógenas, y para estudios de homeostasis de electrolitos en general. Los organoides hinchados invierten al fenotipo normal tras lavar con forskolina (Fig. 29) y, por lo tanto, podrían posiblemente usarse como modelo para (re)absorción intestinal.

Dos aspectos importantes de cultivos de organoide los hacen altamente adecuados para estudios de seguimiento. Primeramente, los organoides pueden expandirse en gran medida mientras mantienen la gravedad durante el cultivo a largo plazo (durante >30 pases). Se requiere la generación de grandes números de células para generar percepción en alteraciones celulares dependientes de CFTR al nivel de la biología de sistemas, y un requisito previo para cribados de alto rendimiento. En segundo lugar, los organoides pueden almacenarse en nitrógeno líquido, permitiendo la generación de bancos de células primarias de pacientes con CF. Esto puede usarse para identificar y estudiar factores celulares asociados a fenotipos clínicos en pacientes con CF. Otra posibilidad excitante sería usar el ensayo *in vitro* de los presentes inventores para predecir la capacidad de respuesta al fármaco *in vivo* al nivel de pacientes individuales, y puede ser especialmente adecuado para fármacos que se dirigen a CFTR mutante directamente. Esto puede facilitar el desarrollo de fármacos y la aprobación de fármacos a los cuales responden solo subgrupos de pacientes.

Métodos

Ratones

5 Los ratones con genes inactivados $Cftr^{tm1Cam}$ ($Cftr^{-/-}$) {Ratcliff: 1993ik} se retrocruzaron con ratones FVB y $Cftr^{tm1eur}$ (CFTR-delF508) {French:1996hb} se retrocruzaron con ratones C57B1/6 (F12). Los ratones FVB $Cftr^{-/-}$ congénitos o ratones C57B1/6 CFTR-delF508 se usaron con sus compañeros de camada no mutantes. Los ratones se mantuvieron en instalaciones de ambiente controlado en el Centro Médico Erasmus de Rotterdam y aprobado por el Comité Ético local.

10

Material del paciente

Se obtuvieron dos biopsias de 3-5 mm de diámetro del bulbo y los pares horizontales del duodeno de un paciente con sospecha de celiaquía usando gastroduodenoscopia flexible. Las biopsias fueron macroscópicamente y patológicamente normales. La aprobación para este estudio se obtuvo por el Comité Ético local.

15

Aislamiento de criptas y cultivo de organoides de intestino de murino

20 Se generaron organoides murinos a partir de criptas del intestino delgado (SI) aisladas y se mantuvieron en cultivo como se ha descrito previamente {Sato:2009jg}. Se usó medio condicionado con Rspo1 (las células fueron amablemente proporcionadas por A. Ootani) en lugar de Rspo-1 recombinante y se añadieron al medio de cultivo en una dilución 1:10. Se obtuvieron organoides de $Cftr^{-/-}$ y de CFTR-delF508 se segmentos proximal y distal de SI, respectivamente. Se usaron organoides del pase 1-9 para la formación de imagen confocal.

Aislamiento de criptas y cultivo de organoides de biopsias humanas

El aislamiento y cultivo de criptas de células intestinales humanas se ha descrito previamente {Sato, gastro 2011}. En resumen, se lavaron biopsias con disolución de quelación completa fría y se incubaron con EDTA 10 mM durante 5-15 min a 4 °C. Se recogió el sobrenadante y se lavó el EDTA. Las criptas se aislaron por centrifugación y se incorporaron en Matrigel (factor de crecimiento reducido, libre de fenol, BD bioscience) y se sembraron (500 criptas por 50 μ l de Matrigel por pocillo) en placas de 24 pocillos. El Matrigel se polimerizó durante 10 minutos a 37 °C y se sumergió en medio de cultivo completo: Advanced DMEM/F12 complementado con penicilina/estreptomicina, HEPES 10 mM, Glutamax, N2, B27 (todos de Invitrogen), *N*-acetilcisteína 1 μ M (Sigma) y factores de crecimiento: 50 ng/ml de mEGF, 50 % de medio acondicionado con Wnt3a y 10 % de medio acondicionado con Noggin (ambos amablemente proporcionados por el lab de Dr. H. Clevers), 20 % de medio acondicionado con Rspo1, nicotinamida 10 μ M (Sigma), gastrina 10 nM (Sigma), A83-01 500 nM (Tocris) y SB202190 10 μ M (Sigma). El medio se recargó cada 2-3 días y los organoides se sometieron a pases 1:4 cada 7-10 días. Desde el paso 6 en adelante, los organoides se cultivaron con cantidades normales (50 %) o reducidas (5 %) de medio acondicionado con Wnt3a durante 5 días. Los organoides del pase 6 y 7 se usaron para la formación de imágenes confocales de célula viva.

40

Ensayos de estimulación

Se sembraron organoides humanos o de ratón de un cultivo de 7 días de edad en una placa de cultivo de 96 pocillos de fondo plano (Nunc) en 5 μ l de Matrigel que contenía 10-40 organoides y 100 μ l de medio de cultivo normal. Uno o dos días después de la siembra, los organoides se incubaron durante 60 minutos con 100 μ l de medio de tinción (Advanced DMEM/F12 complementado con penicilina/estreptomicina, HEPES 10 μ M y Glutamax) que contenía Calcein-Green 10 μ M (Invitrogen). Para la inhibición de CFTR, los organoides se incubaron simultáneamente durante 60 minutos con Calcein-Green 10 μ M y CFTRinh-172 50 μ M (Sigma), GlyH-101 50 μ M (Calbiochem) o tratamiento combinado de CFTRinh-172 50 μ M y GlyH-101 50 μ M. Después de 60 minutos de tratamiento con Calcein-Green (con o sin inhibición de CFTR), se añadieron 5 μ M de forskolina y los organoides se analizaron directamente por microscopía confocal de célula viva (LSM710, Zeiss, objetivo 5x). El área superficial de organoides se calculó por el software de formación de imagen Volocity.

50

Aislamiento de ARN y qPCR

55 De los organoides duodenales humanos que se cultivaron durante >12 semanas, se aisló ARN con el minikit RNeasy (Qiagen) y se cuantificó por densidad óptica. El ADNc se sintetizó a partir de 1 μ g de ARN realizando una PCR con transcripción inversa (Invitrogen). De los organoides murinos intestinales pequeños que se cultivaron durante > 6 semanas, se aisló ARN usando Trizol (Invitrogen) y se cuantificó por densidad óptica. El ADNc se generó a partir de 60 500 μ g por el kit de síntesis de ADNc iScript™ (Bio Rad). Los niveles de ARN mensajero (ARNm) de CFTR humano y ratón se determinaron por RT-PCR cuantitativa en tiempo real con el método SYBR Green (Bio-Rad). Se usó la abundancia de ARNm de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GADPH) o de β 2M para medir la entrada de ADNc.

65

Referencias para la Tabla 3:

- 1 Ma, T., J. R. Thiagarajah, H. Yang, N. D. Sonawane, C. Folli, L. J. V. Galiotta and A. S. Verkman. 2002. Thiazolidinone CFTR inhibitor identified by high-throughput screening blocks cholera toxin-induced intestinal fluid secretion. *J. Clin. Invest.* 110(11):1651-1658.
- 2 Muanprasat, C., N. D. Sonawane, D. Salinas, A. Taddei, L. J. V. Galiotta and A. S. Verkman. 2004. Discovery of glycine hydrazide pore-occluding CFTR inhibitors: Mechanism, structure-activity analysis, and in vivo efficacy. *J. Gen. Physiol.* 124:125-137.
- 3 Singh, A. K., B. D. Schultz, W. van Driessche and R. J. Bridges. 2004. Transepithelial fluctuation analysis of chloride secretion. *J. Cyst. Fibros.* 3 Suppl 2:127-132.
- 4 Pedemonte, N., N. D. Sonawane, A. Taddei, J. Hu, O. Zegarra-Moran, Y. F. Suen, L. I. Robins, C. W. Dicus, D. Willenbring, M. H. Nantz, M. J. Kurth, L. J. Galiotta and A. S. Verkman. 2005. Phenylglycine and sulfonamide correctors of defective delta F508 and G551 D cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride-channel gating. *Mol. Pharmacol.* 67(5):1797-1807.
- 5 Caci, E., C. Folli, O. Zegarra-Moran, T. Ma, M. F. Springsteel, R. E. Sammelson, M. H. Nantz, M. J. Kurth, A. S. Verkman and L. J. V. Galiotta. 2003. CFTR activation in human bronchial epithelial cells by novel benzoflavone and benzimidazolone compounds. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 285:L180-L188.
- 6 Yang, H., A. A. Shelat, R. K. Guy, V. S. Gopinath, T. Ma, K. Du, G. L. Lukacs, A. Taddei, C. Folli, N. Pedemonte Y, L. J. V. Galiotta and A. S. Verkman. 2003. Nanomolar affinity small molecule correctors of defective DF508-CFTR chloride channel gating. *J. Biol. Chem.* 278(37):35079-35085.
- 7 Ma, T., L. Vetrivel, H. Yang, N. Pedemonte, O. Zegarra-Moran, L. J. V. Galiotta and A. S. Verkman. 2002. High-affinity activators of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) chloride conductance identified by high-throughput screening. *J. Biol. Chem.* 277(40):37235-37241.
- 8 Devor, D. C., R. J. Bridges and J. M. Pilewski. 2000. Pharmacological modulation of ion transport across wild-type and DeltaF508 CFTR-expressing human bronchial epithelia. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 279(2):C461-C479
- 9 Springsteel, M. F., L. J. V. Galiotta, T. Ma, K. By, G. O. Berger, H. Yang, C. W. Dicus, W. Choung, C. Quan, A. Shelat, R. K. Guy, A. S. Verkman, M. J. Kurth and M. H. Nantz. 2003. Benzoflavone activators of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator: Towards a pharmacophore model for the nucleotide-binding domain. *Bioorg. Med. Chem.* 11:4113-4120.
- 10 Sammelson, R. E., T. Ma, L. J. V. Galiotta, A. S. Verkman and M. J. Kurth. 2003. 3-(2-Benzyloxyphenyl)isoxazoles and isoxazolines: Synthesis and evaluation as CFTR activators. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 13:2509-2512
- 11 Pedemonte, N., G. L. Lukacs, K. Du, E. Caci, O. Zegarra-Moran, L. J. V. Galiotta and A. S. Verkman. 2005. Small-molecule correctors of defective DF508-CFTR cellular processing identified by high-throughput screening. *J. Clin. Invest.* 115(9):2564-2571.
- 12 Van Goor, F., K. S. Straley, D. Cao, J. Gonzalez, S. Hadida, A. Hazlewood, J. Joubran, T. Knapp, L. R. V. Makings, M. Miller, T. Neuberger, E. Olson, V. Panchenko, J. Rader, A. Singh, J. H. Stack, R. Tung, P. D. Grootenhuis and P. Negulescu. 2006. Rescue of {Delta}F508 CFTR trafficking and gating in human cystic fibrosis airway primary cultures by small molecules. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* Epub
- 13 Loo, T. W., M. C. Bartlett, Y. Wang and D.M. Clarke. 2006. The chemical chaperone CFcor-325 repairs folding defects in the transmembrane domains of CFTR processing mutants. *Biochem. J.* Epub.
- 14 Makings, Lewis R.; Singh, Ashvani K.; Miller, Mark T.; Hadida Ruah, Sarah S.; Grootenhuis, Peter; Hamilton, Matthew; Hazelwood, Anna R.; Huang, Liming. Preparation of pyrimidine derivatives as modulators of ATP-binding cassette transporters. *PCT Int. Appl.* (2004), WO 20041111014 A1
- 15 Vangoor, Frederick F.; Hadida Ruah, Sarah S.; Singh, Ashvani K.; Olson, Eric R.; Makings, Lewis R.; Gonzalez, Jesus E., III; Rader, James A.; Chambers, Fred, III; Miller, Mark T.; Grootenhuis, Peter; Liu, Yahua. Preparation of substituted pyrazoles as modulators of ATP-binding cassette transporters. *PCT Int. Appl.* (2004) WO 2004080972 A1
- 16 Routaboul, Christel; Norez, Caroline; Melin, Patricia; Molina, Marie-Carmen; Boucherle, Benjamin; Bossard, Florian; Noel, Sabrina; Robert, Renaud; Gauthier, Chantal; Becq, Frederic; Décout, Jean-Luc. 2007. Discovery

of α -Aminoazaheterocycle-Methylglyoxal adducts as a new class of high-affinity inhibitors of Cystic Fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channels. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 322(3):1023-1035.

5 17 Sonawane, N.D., Zegarra-Moran, O., Namkung, W., Galiotta, L., and Verkman, A.S. 2008. α -Aminoazahetero-cyclic- methylglyoxal adducts do not inhibit CFTR chloride channel activity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* Epub.

10 18 Robert, R., Carlile, G.W., Pavel, C., Liu, N., Anjos, S.M., Liao, J., Luo, Y., Zhang, D., Thomas, D.Y., and Hanrahan, J.W. 2008. Structural analog of sildenafil identified as a novel corrector of the F508del-CFTR trafficking defect. *Mol. Pharmacol.* 73(2):478-489.

19 Macia, E., Ehrlich, M., Massol, R., Boucrot, E., Brunner, C., and Kirchhausen, T. 2006. Dynasore, a cell-permeable inhibitor of dynamin. *Dev. Cell.* 10(6):839-850.

15 20 Yoo, C.L., Yu, G.J., Yang, B., Robins, L.I., Verkman, A.S., and Kurth, M.J. 2008. 4'-Methyl-4,5'-bithiazole-based correctors of defective delta F508-CFTR cellular processing. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 18(8):2610-2614.

20 21 Hirth, B.H., Qiao, S., Cuff, L.M., Cochran, B.M., Pregel, M.J., Gregory, J.S., Sneddon, S.F., and Kane, J.L. Jr. 2005. Discovery of 1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline-3-carboxylic acid diamides that increase CFTR mediated chloride transport. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 15(8):2087-2091.

25 22 Tradtrantip, L., N.D. Sonawane, W. Namkung, A.S.,Verkman 2009. Nanomolar potency Pyrimido-pyrrolo-quinoxalinedione CFTR inhibitor reduces cyst size in a polycystic kidney disease model. *J. Med. Chem.* 52(20):6447-55.

23 Sonawane, N.D., A.S.,Verkman 2008. Thiazolidinone CFTR inhibitors reduces with improved water solubility identified by structure-activity analysis. *Bioorg. Med. Chem.* 16(17):8175-95

30 24 Patente de Vertex WO 2007/021982 A2; Compuesto N° 12, página 15.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método *in vitro* para estudiar la eficacia de uno o más fármacos para tratar fibrosis quística, enfermedad renal poliquística o cólera, en el que el método comprende estimulación de uno o más organoides de fibrosis quística, enfermedad renal poliquística o cólera generados a partir de células primarias con uno o más fármacos y medir la hinchazón de uno o más organoides, en el que la hinchazón significa un cambio en el tamaño de uno o más organoides debido a la absorción o secreción de fluido.
- 10 2. Un método *in vitro* para diagnosticar fibrosis quística, enfermedad renal poliquística o cólera, en el que el método comprende medir la hinchazón de uno o más organoides generados a partir de células primarias, en el que la hinchazón significa un cambio en el tamaño de uno o más organoides debido a la absorción o secreción de fluido.
- 15 3. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el método comprende además la estimulación de uno o más organoides con un compuesto que es capaz de inducir un cambio en el tamaño de los organoides.
- 20 4. El método según la reivindicación 2 o la reivindicación 3 cuando dependen de la reivindicación 2, en el que el método comprende la estimulación de uno o más organoides con uno o más fármacos.
- 25 5. El método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que los organoides se generan a partir de células humanas primarias.
- 30 6. El método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que los organoides son organoides epiteliales.
- 35 7. El método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el cambio en el tamaño se compara con un organoide de control sano.
- 40 8. El método según la reivindicación 1 o la reivindicación 4, en el que el cambio en el tamaño es el cambio en el tamaño comparado con un organoide que no se ha estimulado con uno o más fármacos.
- 45 9. El método según la reivindicación 3 o una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 8 cuando dependen de la reivindicación 3, que comprende la estimulación de uno o más organoides con un compuesto que se dirige al receptor transmembranario de la fibrosis quística (CFTR) y medir dicho uno o más organoides, por el que la hinchazón inducida por el compuesto de uno o más organoides es dependiente de CFTR.
- 50 10. El método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la hinchazón de uno o más organoides es una medida del efecto de la mutación de CFTR y/o tratamiento con fármaco.
- 55 11. El método según la reivindicación 3, o una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 11 cuando dependen de la reivindicación 3, en el que el compuesto es forskolina.
- 60 12. El método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que uno o más organoides son organoides intestinales o de pulmón.
- 65 13. El método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende generar uno o más organoides intestinales expandiendo células madre intestinales dentro de organoides cerrados que incluyen una luz cerrada sobre la membrana apical de las células.
14. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la enfermedad es fibrosis quística o cólera.
15. El método de la reivindicación 14, en el que la enfermedad es fibrosis quística.
16. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende medir el cambio en el tamaño en uno o más organoides de un paciente que se diagnostica, por ejemplo, con fibrosis quística o cólera, y comparar esto con el cambio en el tamaño en uno o más organoides de un control sano.
17. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende probar la respuesta del paciente individual a un fármaco para fibrosis quística, enfermedad renal poliquística o cólera.
18. El método de la reivindicación 17, en el que el método comprende
 estimulación de uno o más organoides generados a partir de células primarias derivados de un paciente de interés con un compuesto que es capaz de inducir la hinchazón de los organoides, en el que la hinchazón significa un cambio en el tamaño de uno o más organoides debido a la absorción o secreción de fluido;
 estimulación de uno o más organoides con un fármaco conocido por afectar la función de CFTR o con un

fármaco que es probado por su eficacia en afectar la función de CFTR; y medir uno o más organoides, y opcionalmente comparar la hinchazón del organoide con la hinchazón de un organoide que se ha estimulado con el compuesto, pero no se ha estimulado con el fármaco; en el que un aumento en la hinchazón de uno o más organoides en respuesta a la estimulación por un fármaco indica que el paciente es sensible al tratamiento con el fármaco.

5
19. El método de la reivindicación 1 o una cualquiera de las reivindicaciones 3, 5-15, 17 o 18 cuando dependen de la reivindicación 1, en el que uno o más fármacos son una biblioteca de posibles fármacos.

10
20. El método de la reivindicación 1 o una cualquiera de las reivindicaciones 3, 5-15 o 17-19 cuando dependen de la reivindicación 1, en el que el método comprende probar el efecto de fármacos novedosos en la restauración funcional de la proteína CFTR mutante, o la restauración funcional de la traducción de CFTR, transcripción, loci de genes CFTR o interactores biológicos de CFTR, por ejemplo, para el tratamiento de fibrosis quística.

15
21. El método de la reivindicación 1 o una cualquiera de las reivindicaciones 3, 5-15 o 17-20 cuando dependen de la reivindicación 1, en el que el método comprende

20
estimulación de uno o más organoides generados a partir de células primarias con un compuesto que es capaz de inducir hinchazón de los organoides, en el que la hinchazón significa un cambio en el tamaño de uno o más organoides debido a la absorción o secreción de fluido;
estimulación de uno o más organoides con un fármaco conocido por afectar la función de CFTR o con un fármaco que es probado por su eficacia en afectar la función de CFTR; y
medir la hinchazón de uno o más organoides, y opcionalmente comparar la hinchazón del organoide con la hinchazón de un organoide que se ha estimulado con el compuesto, pero no se ha estimulado con el fármaco;
25
en el que la hinchazón de uno o más organoides en respuesta a la estimulación por el fármaco indica que el fármaco es eficaz para el tratamiento de la restauración funcional de CFTR mutante.

30
22. Un método *in vitro* para cribar una biblioteca de compuestos para identificar compuestos que afectan la absorción y/o secreción de fluido, en el que el método comprende:

estimulación de organoides generados a partir de células primarias con la biblioteca de compuestos;
medir la hinchazón de dicho uno o más organoides, en el que la hinchazón significa un cambio en el tamaño de uno o más organoides debido a la absorción o secreción de fluido; e
35
identificar un compuesto que es capaz de inducir la hinchazón de los organoides.

40
23. Uso *in vitro* de uno o más organoides en un método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes.

45

50

55

60

65

FIG. 1

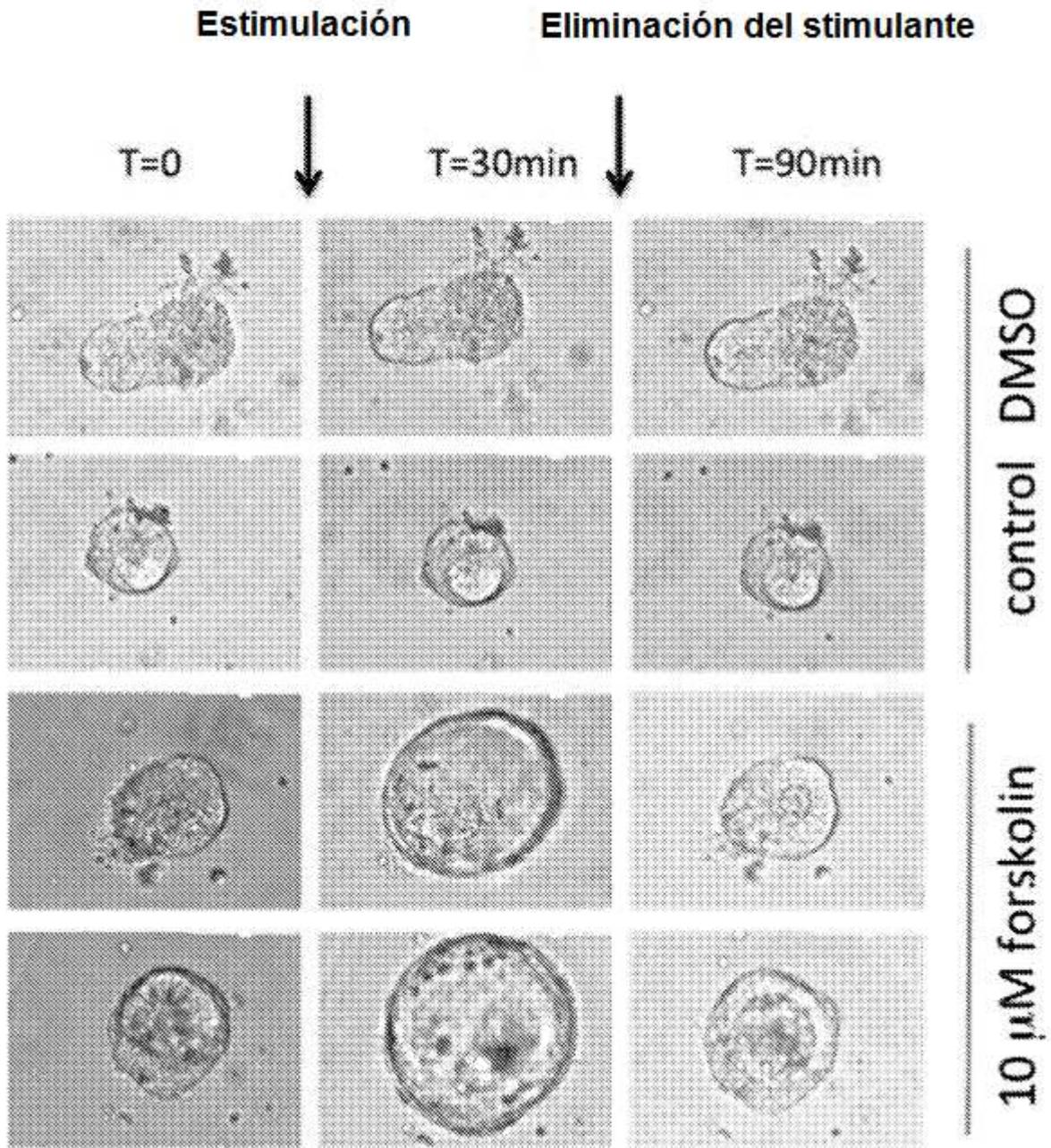


FIG. 2

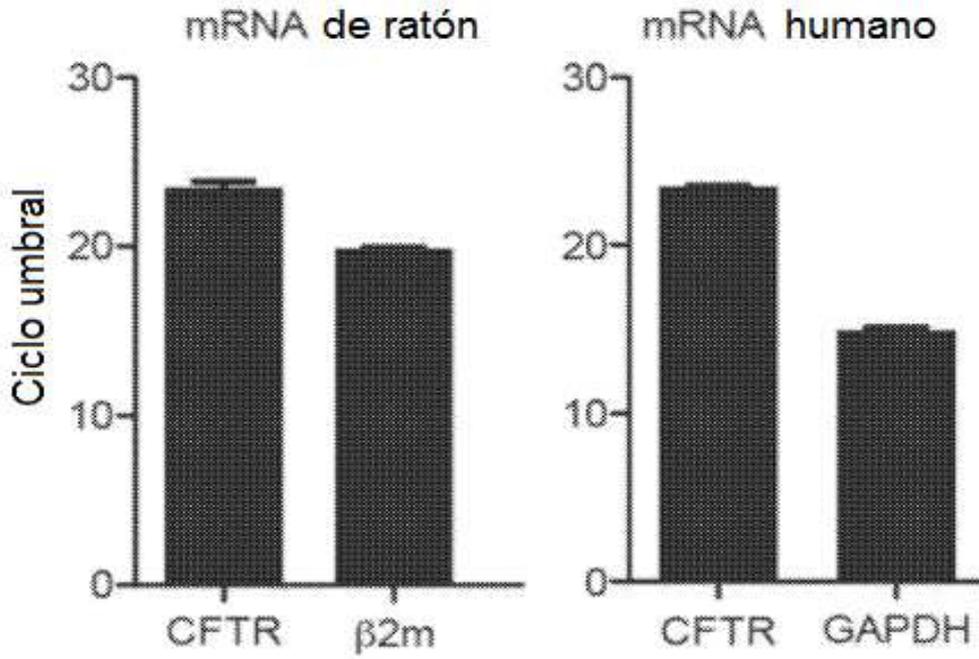
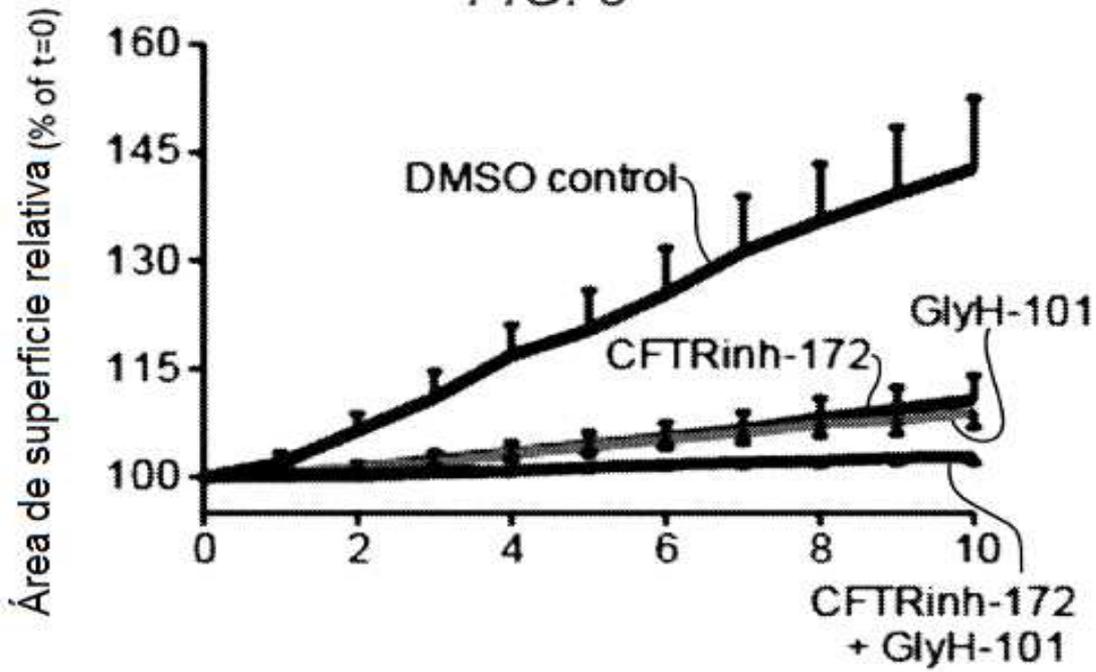


FIG. 3



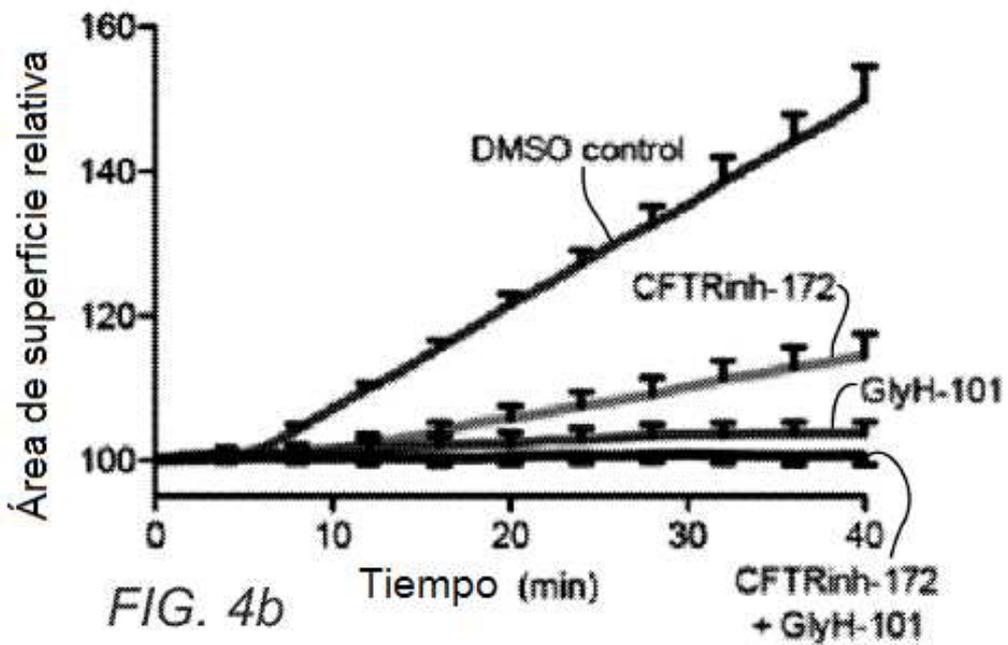
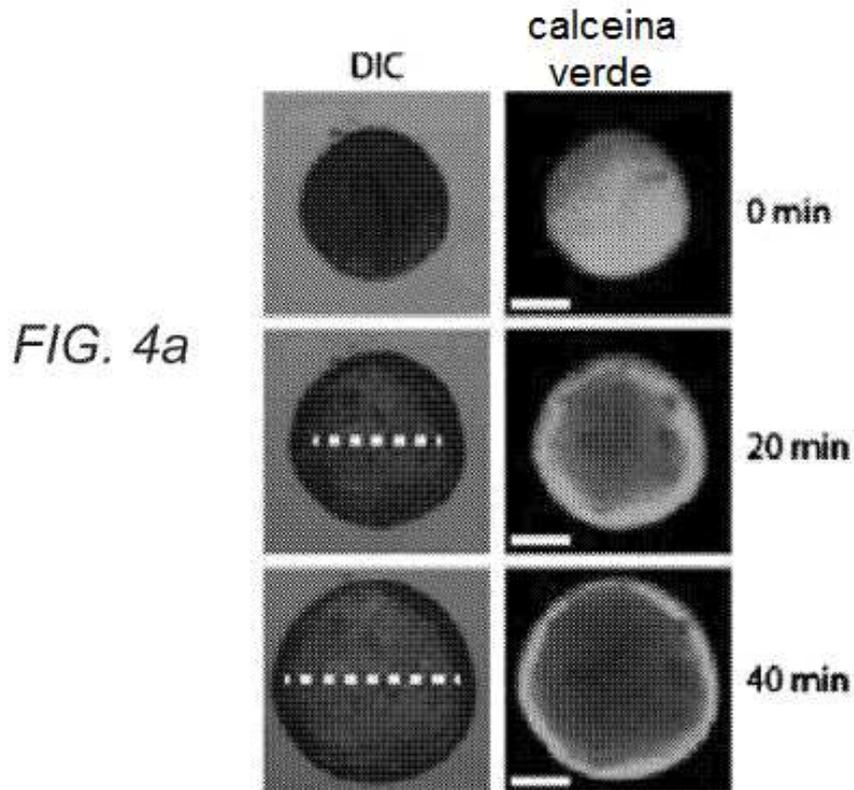


FIG. 5b

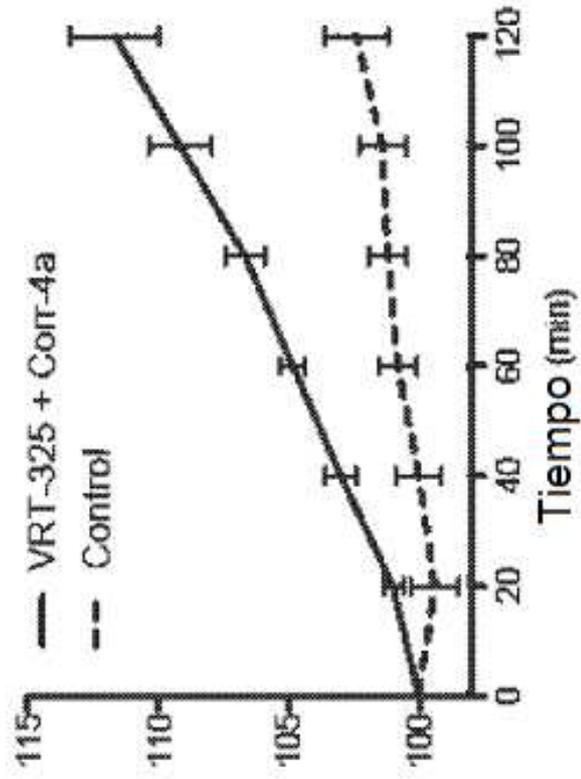


FIG. 5a

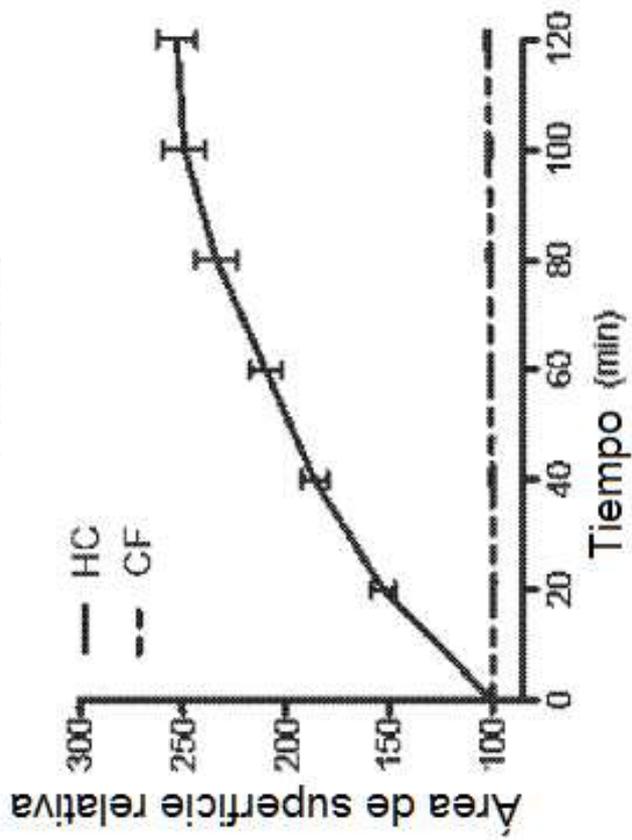


FIG. 6b

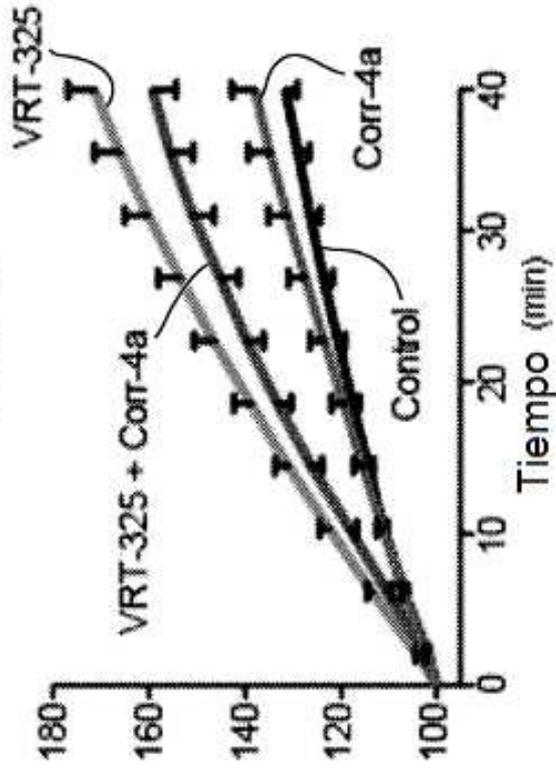


FIG. 6a

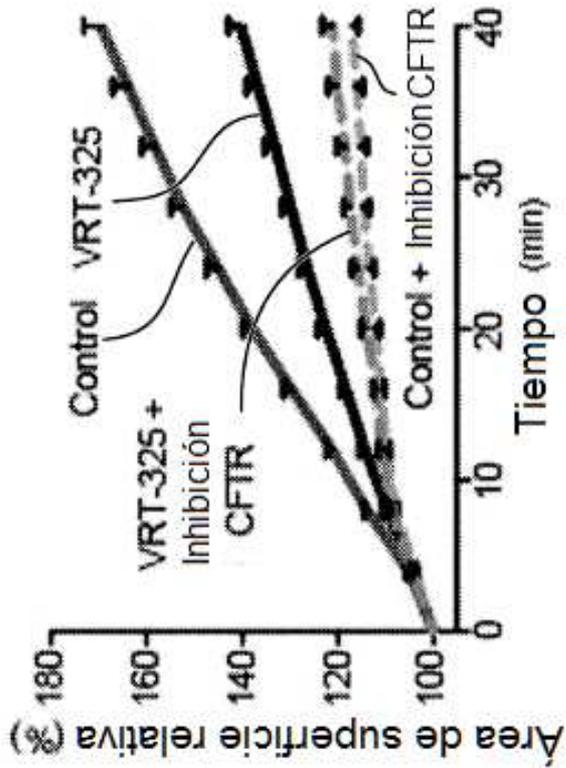


FIG. 6d

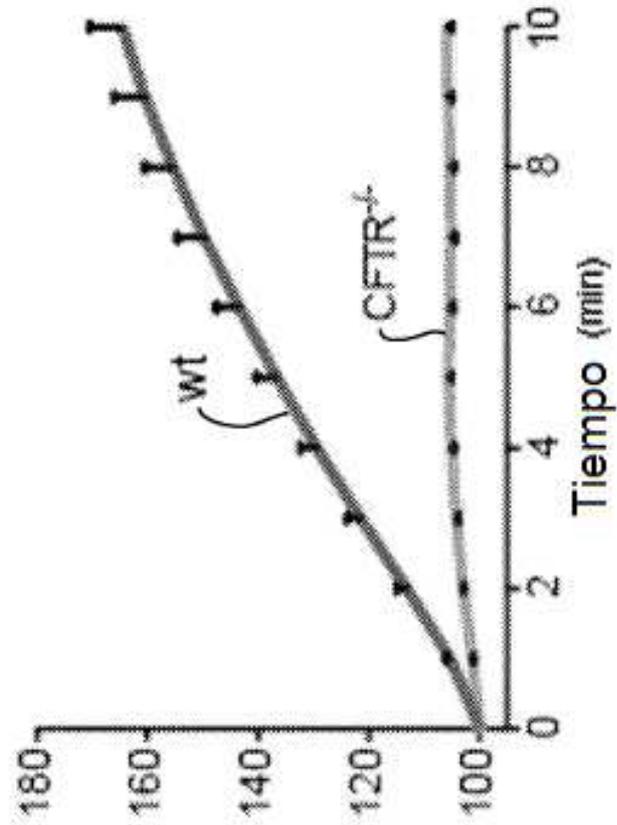
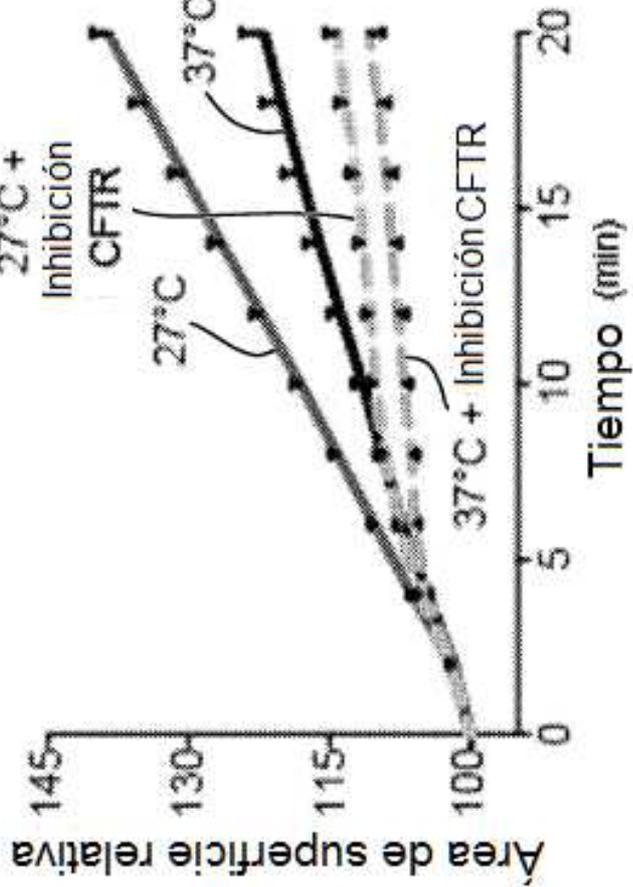


FIG. 6c



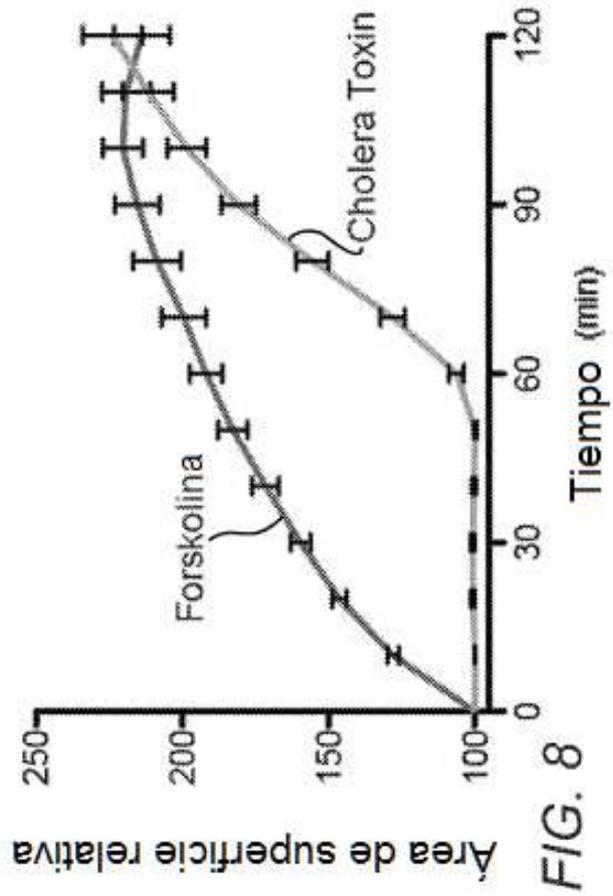
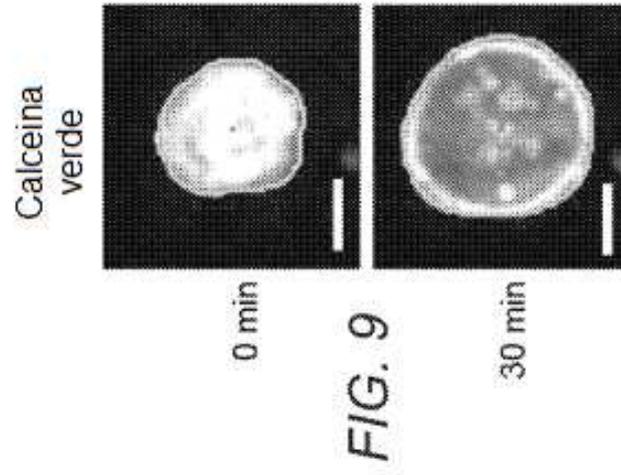
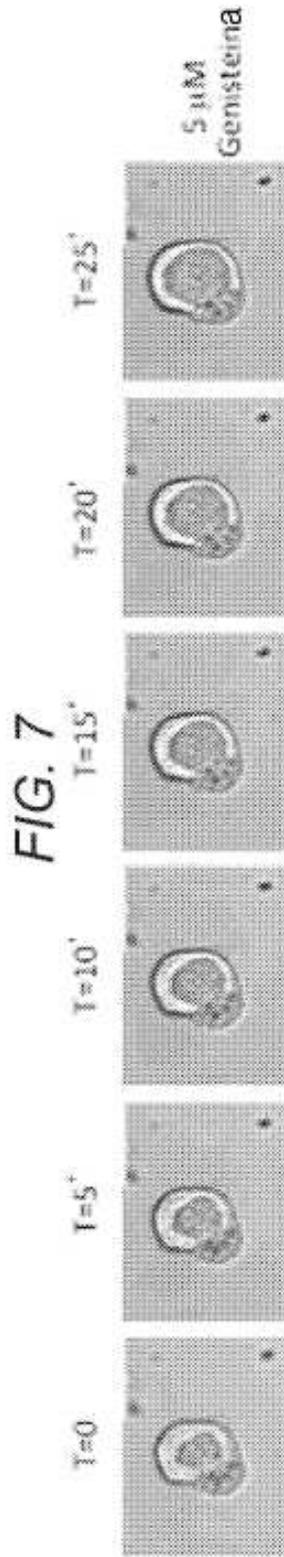
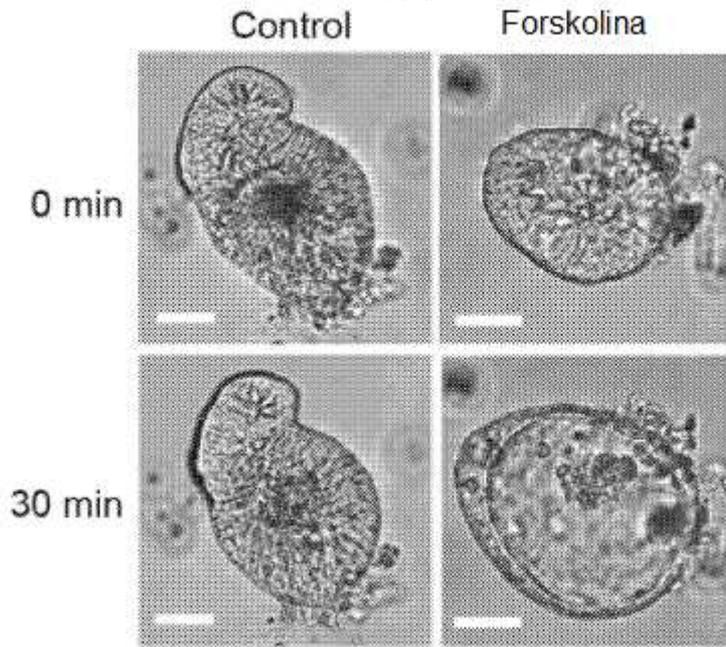
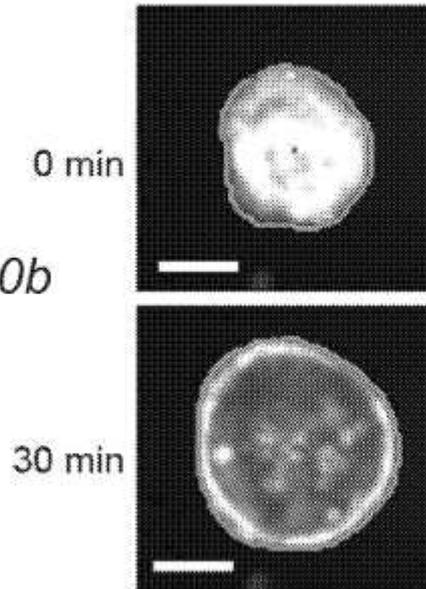


FIG. 10a



Calceina
verde

FIG. 10b



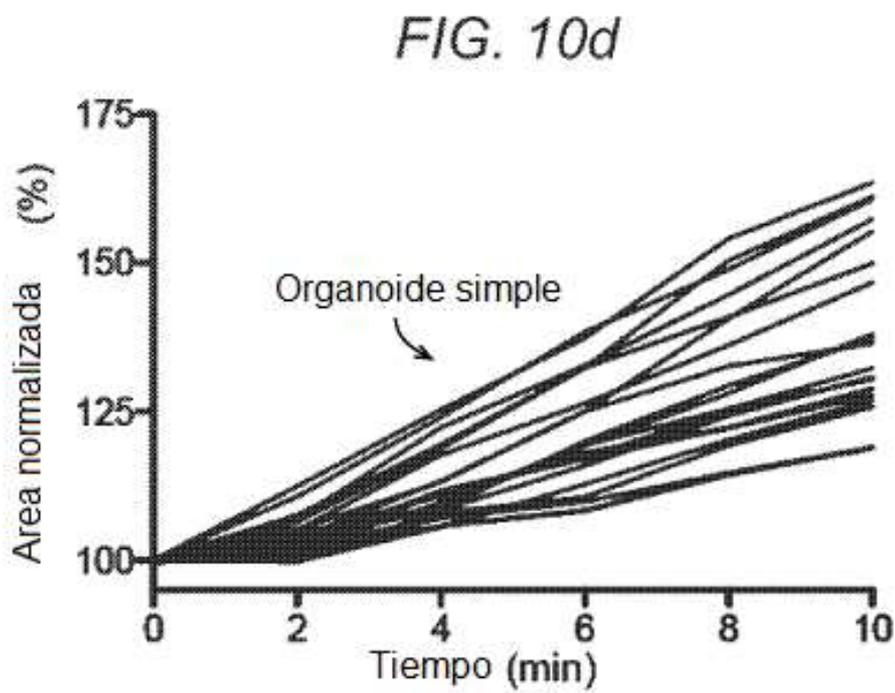
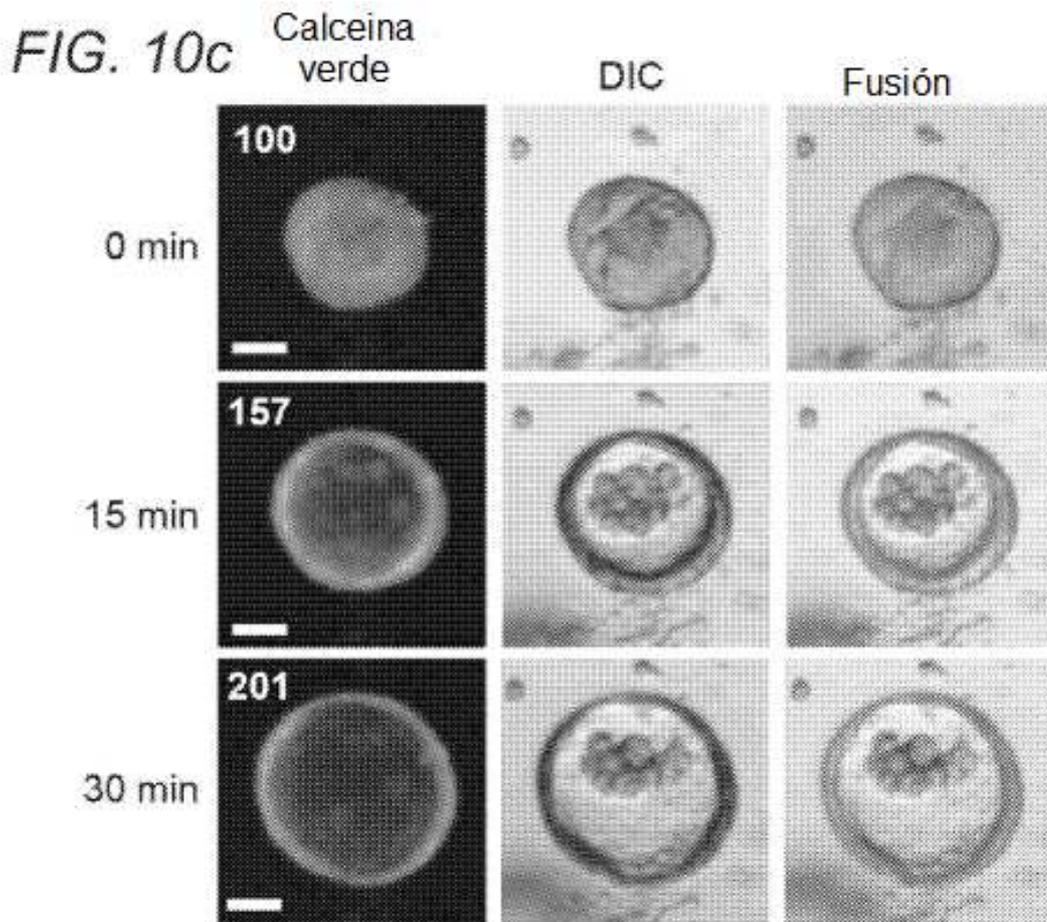


FIG. 10e

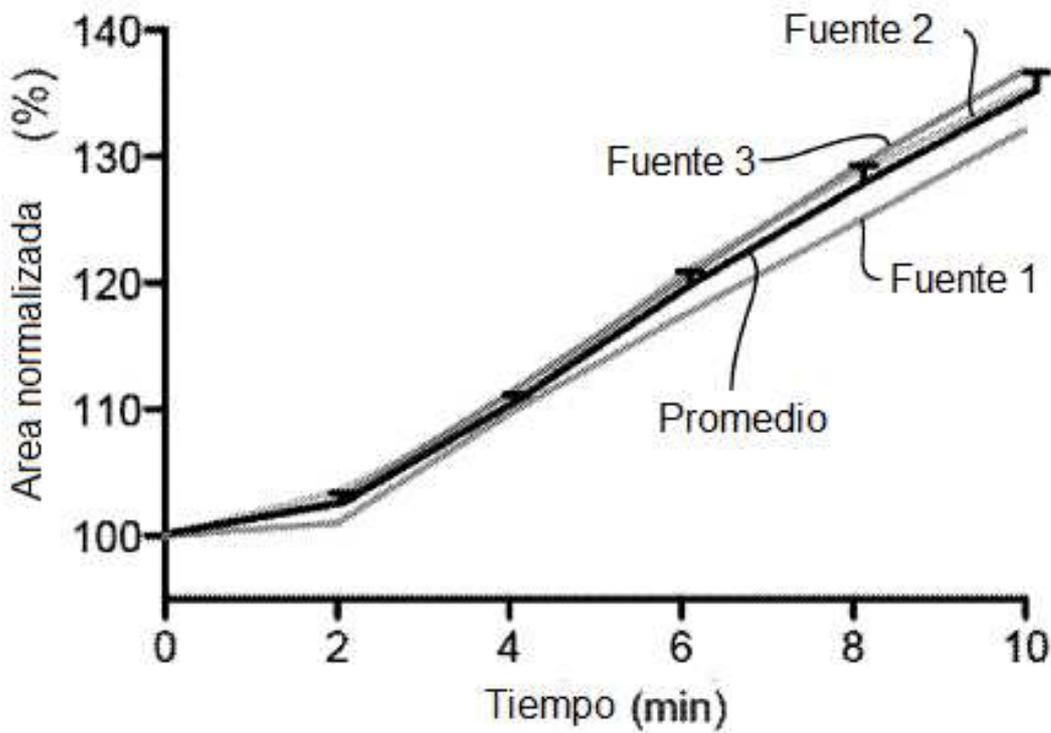
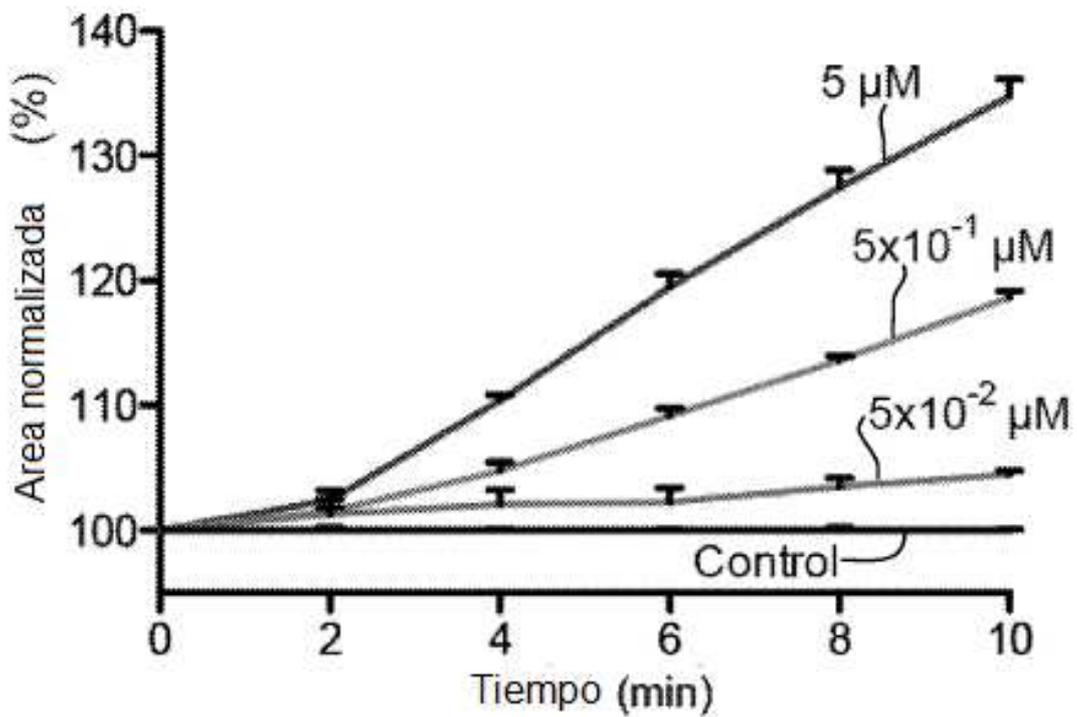
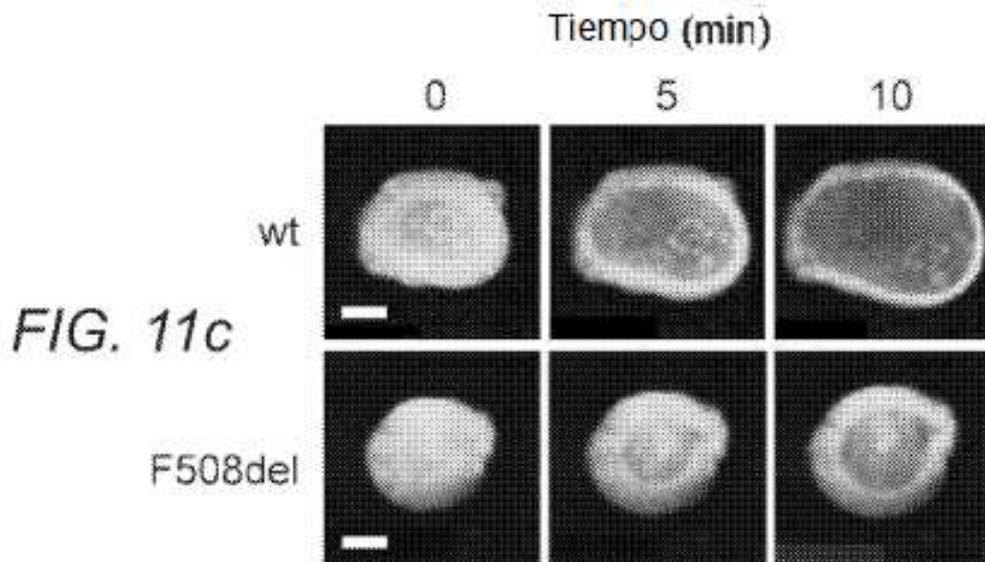
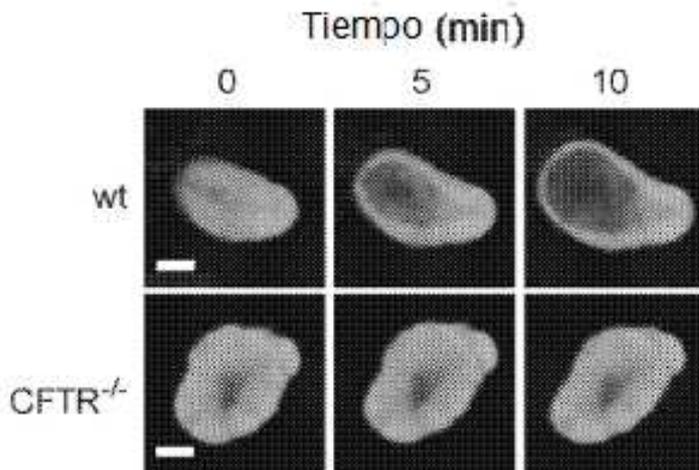
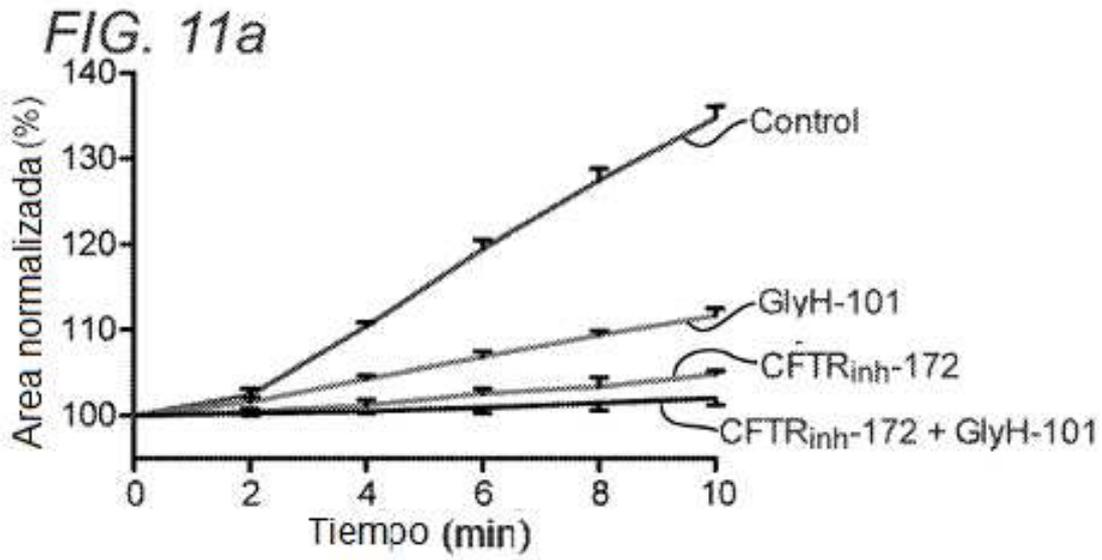


FIG. 10f

[Forskolina]:





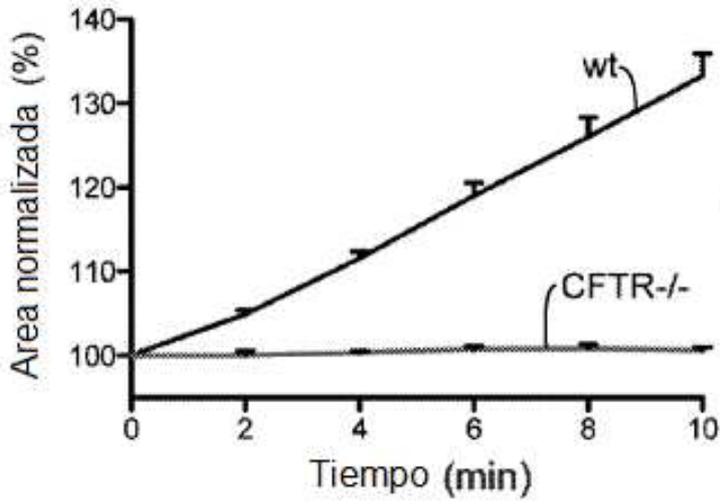


FIG. 11d

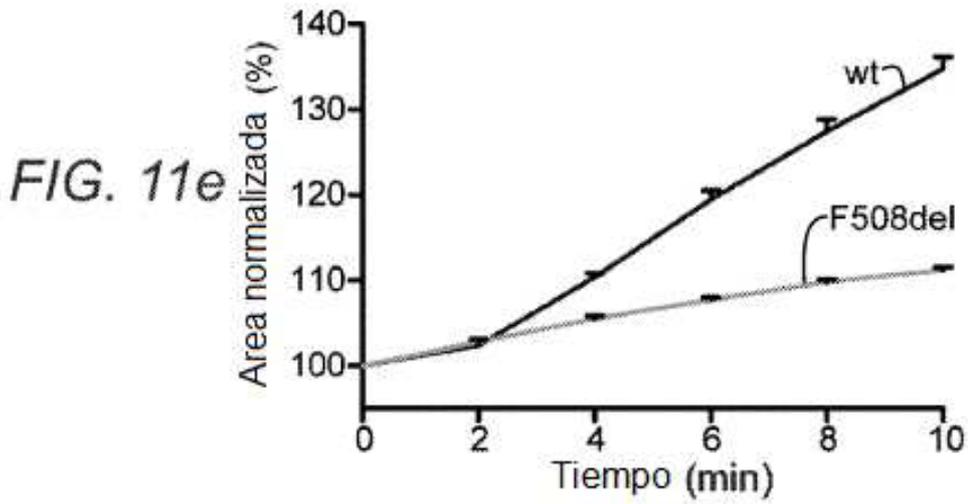


FIG. 11e

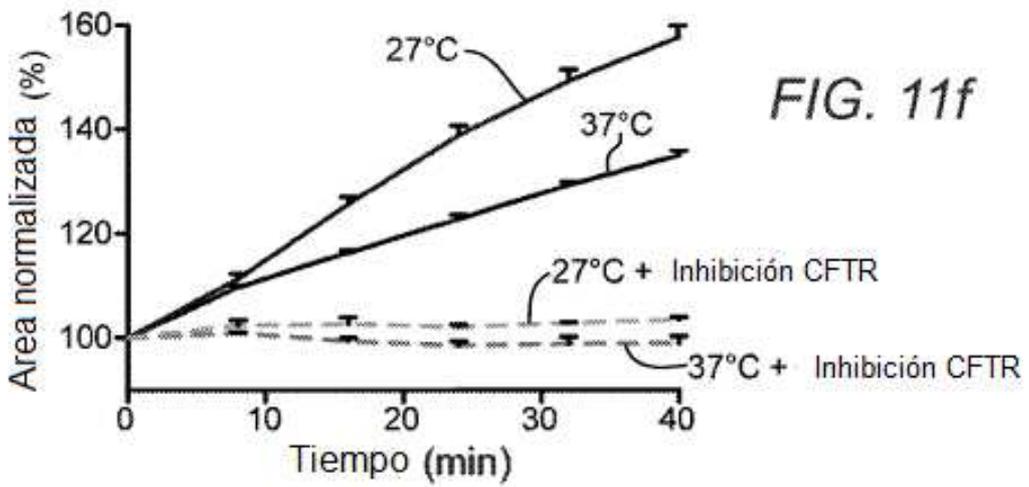


FIG. 11f

FIG. 11g

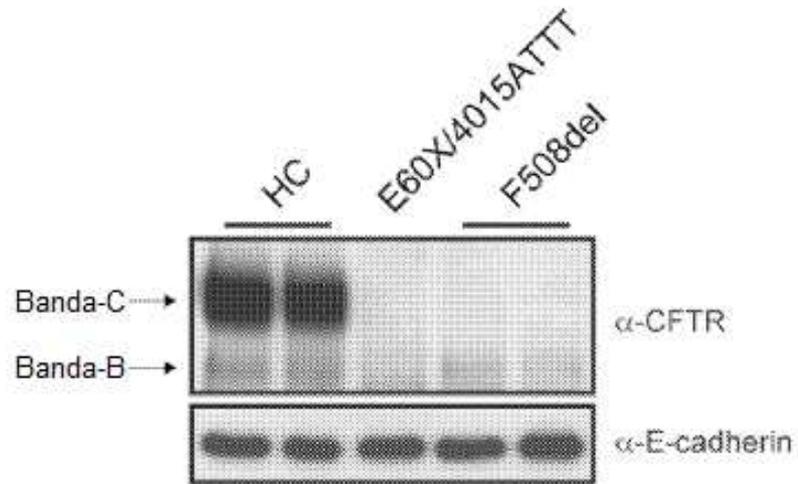
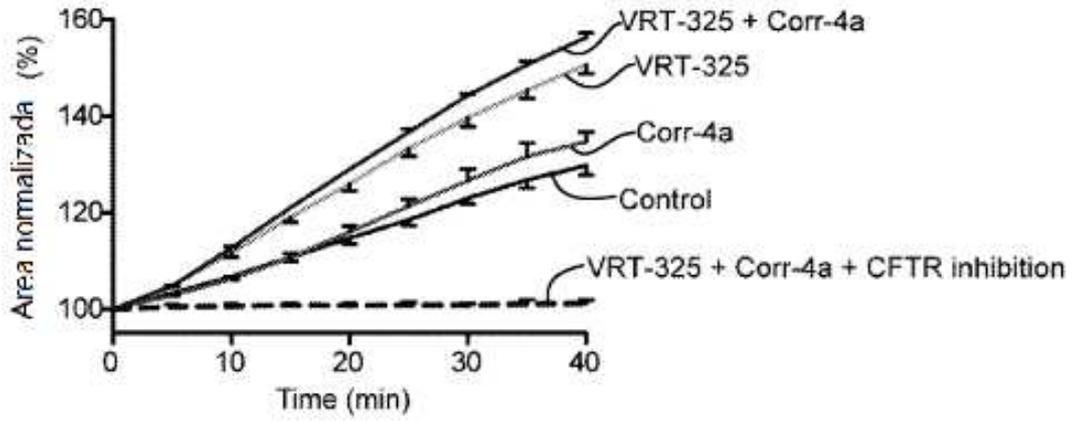
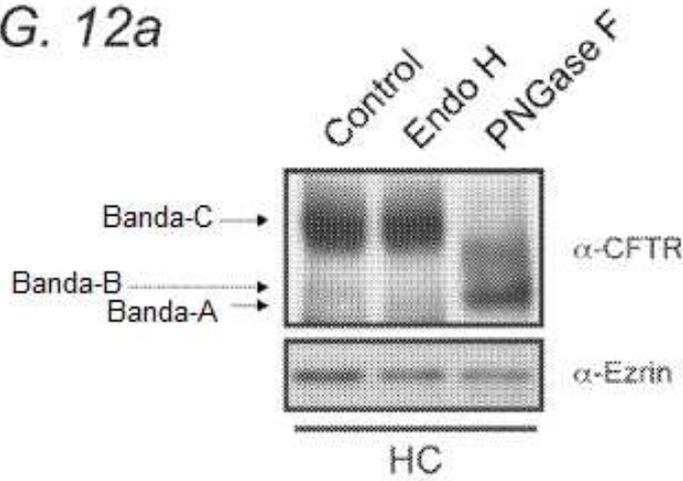


FIG. 12a



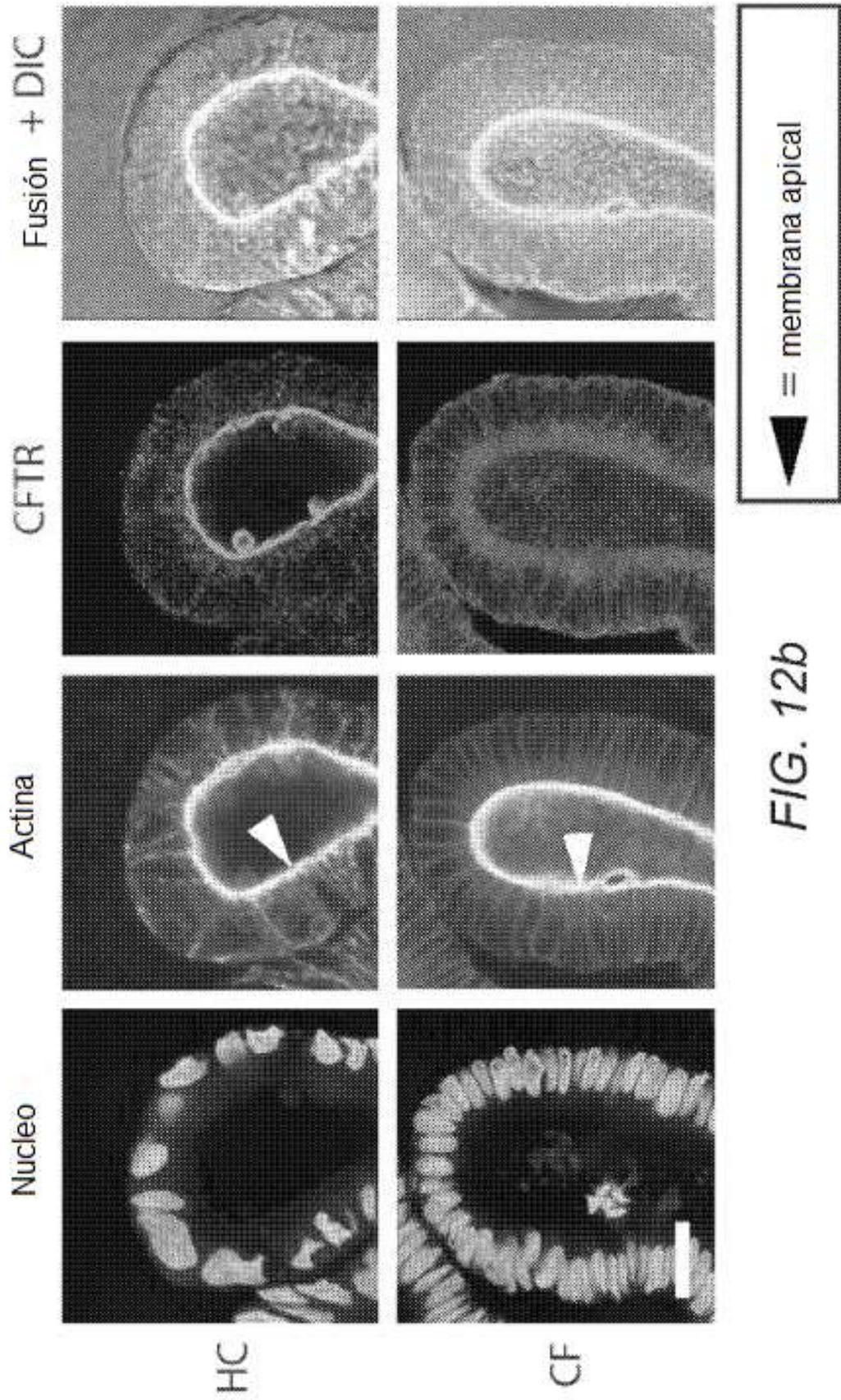


FIG. 12c

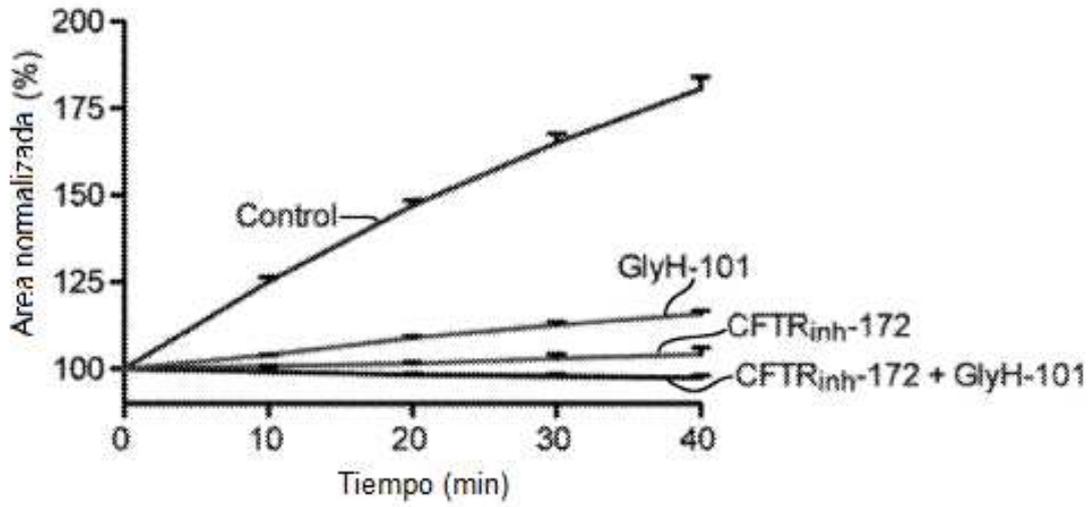


FIG. 12d

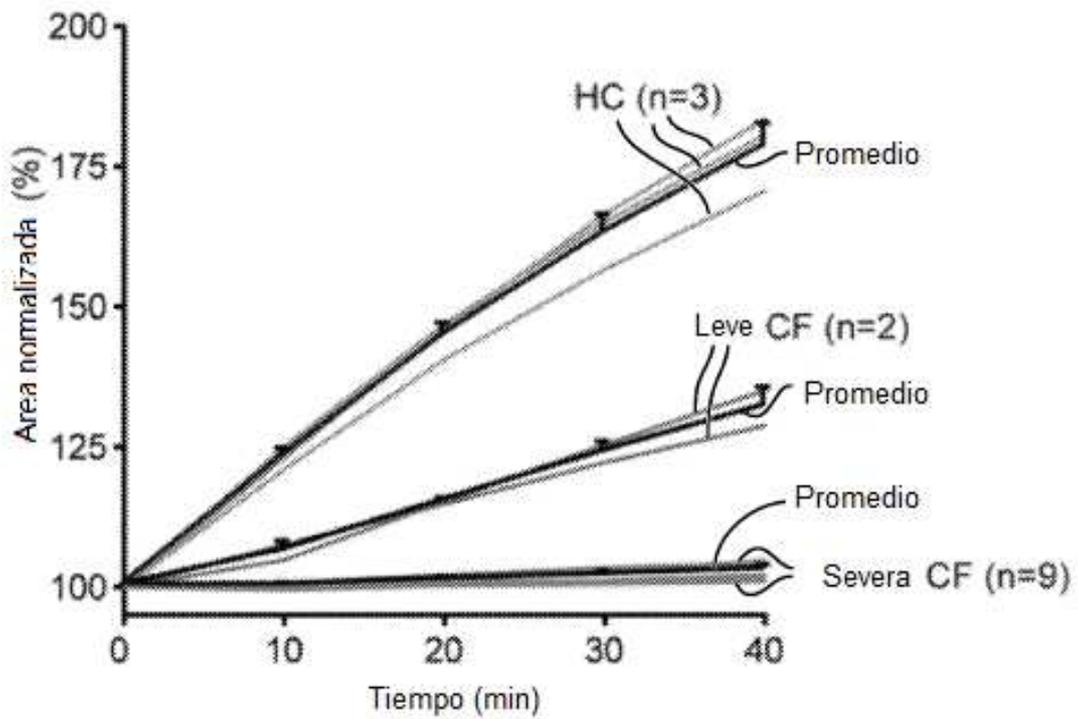


FIG. 12e

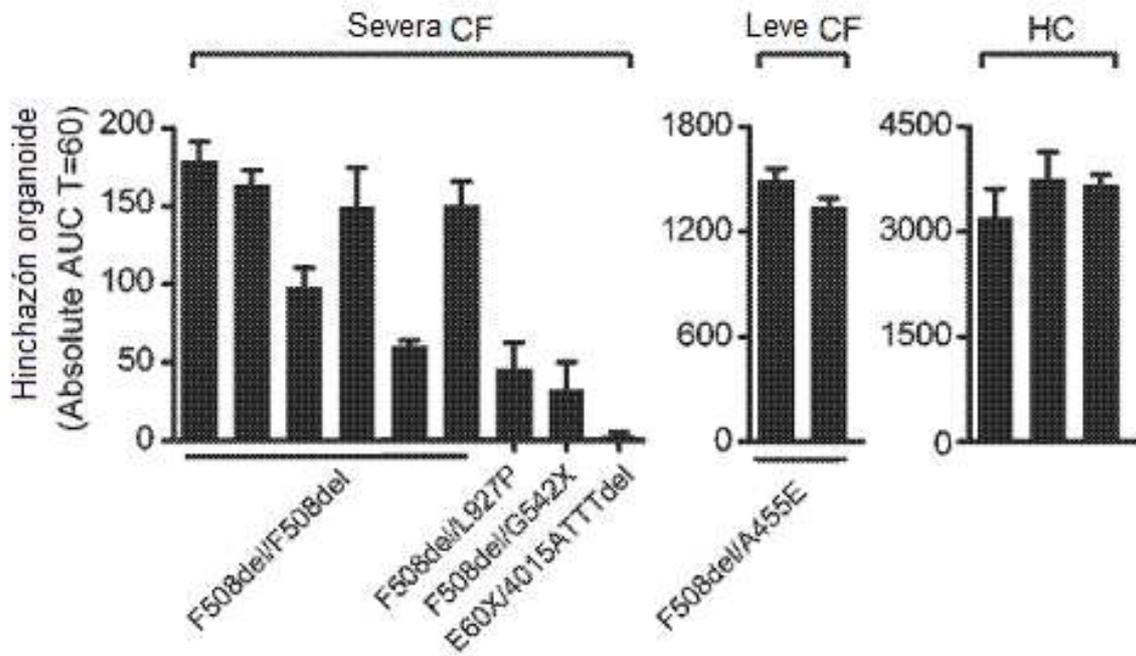


FIG. 12f

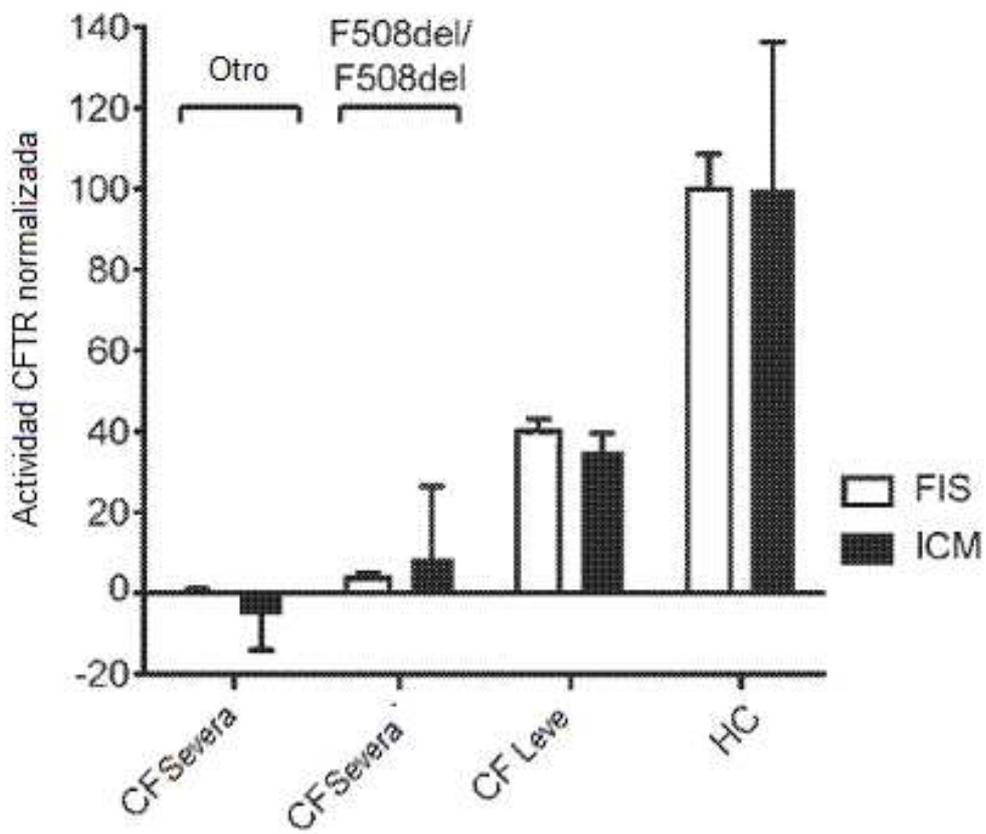


FIG. 13a

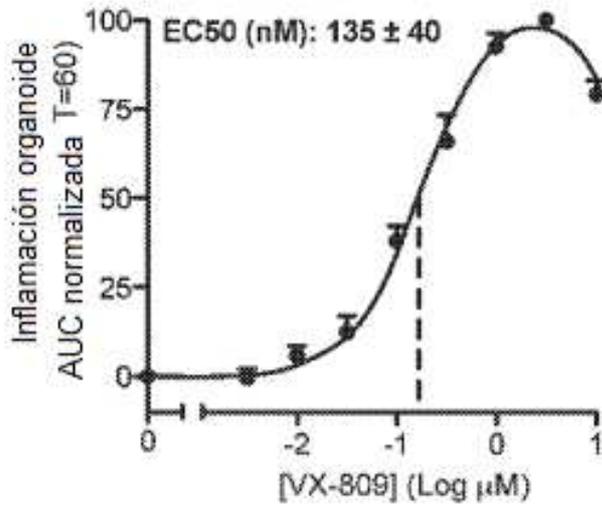
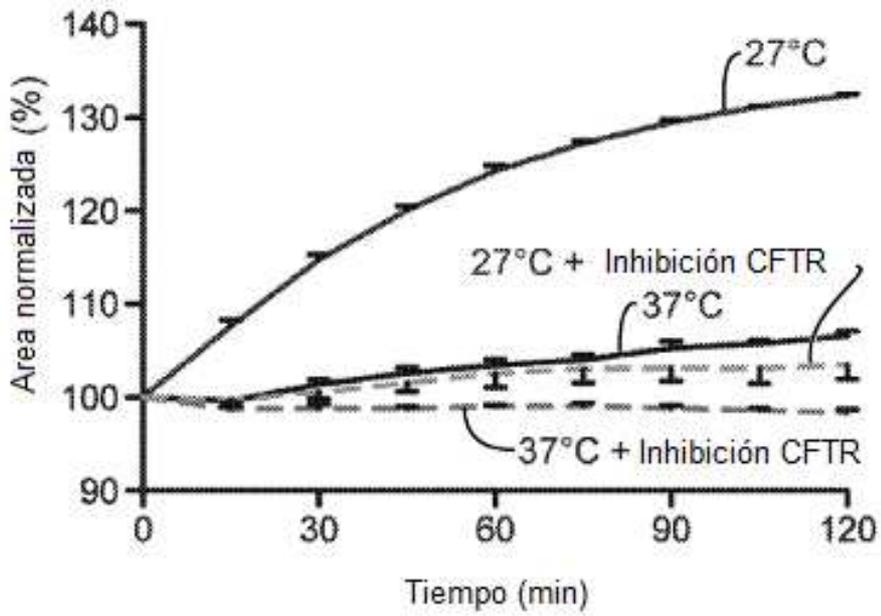


FIG. 13b

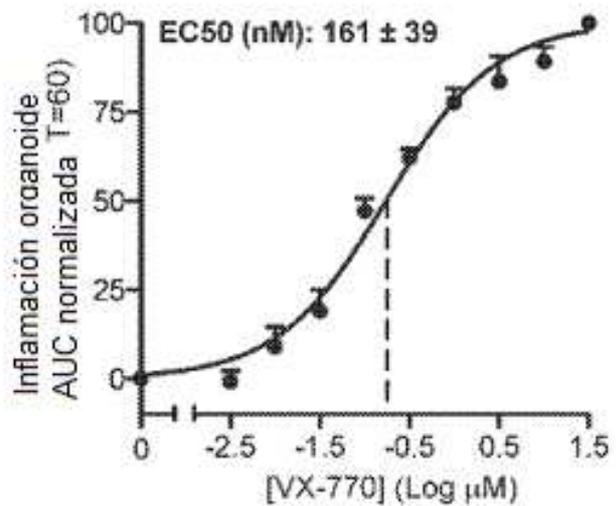


FIG. 13C

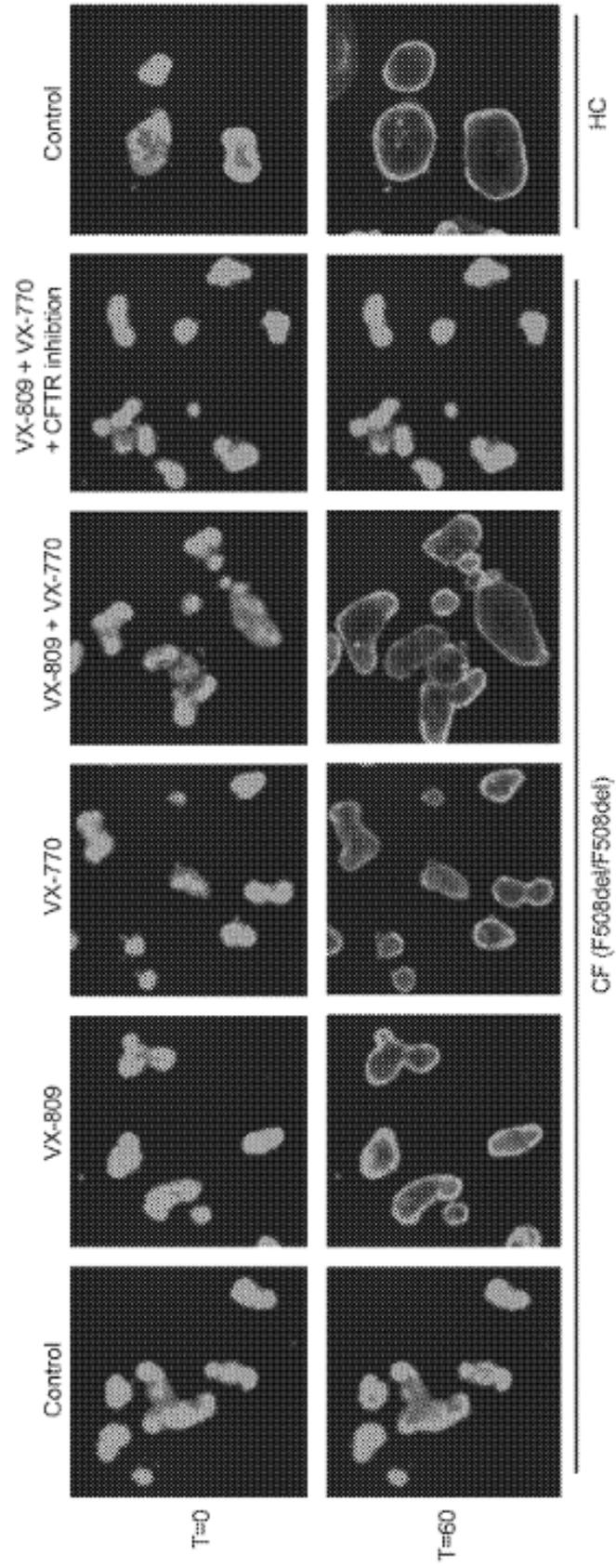


FIG. 13d

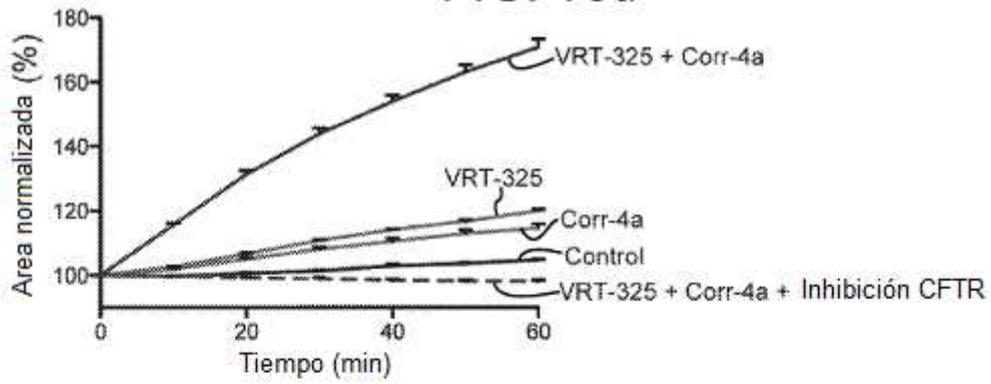


FIG. 13e

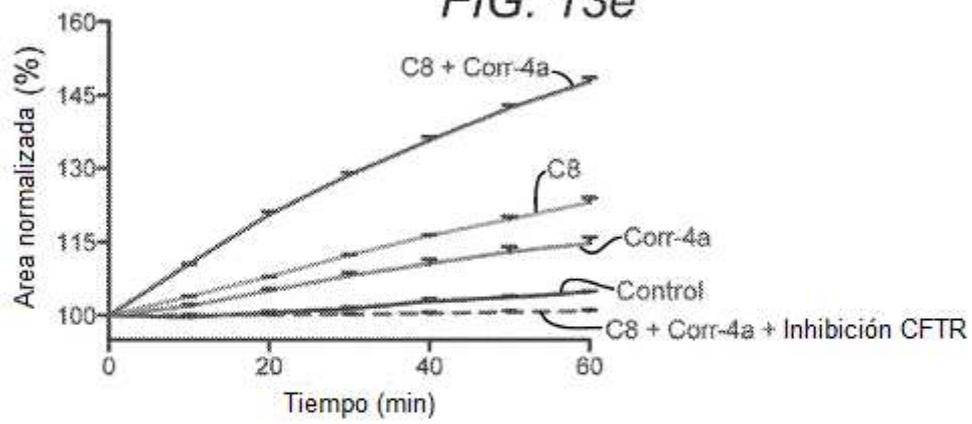


FIG. 13f

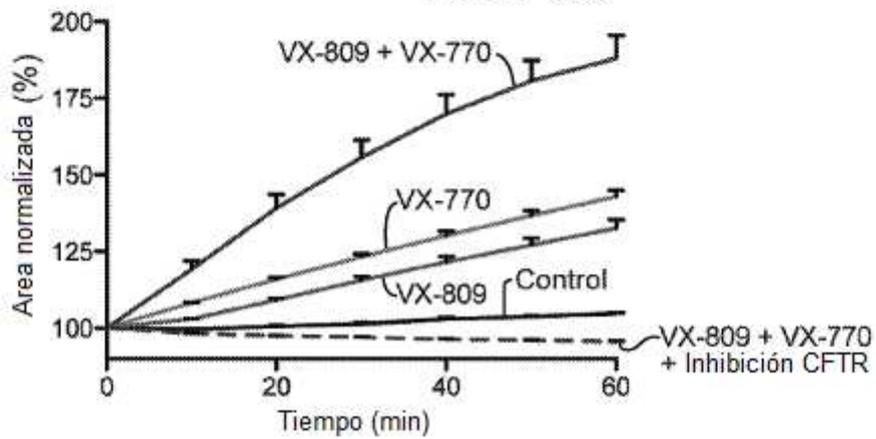


FIG. 14a

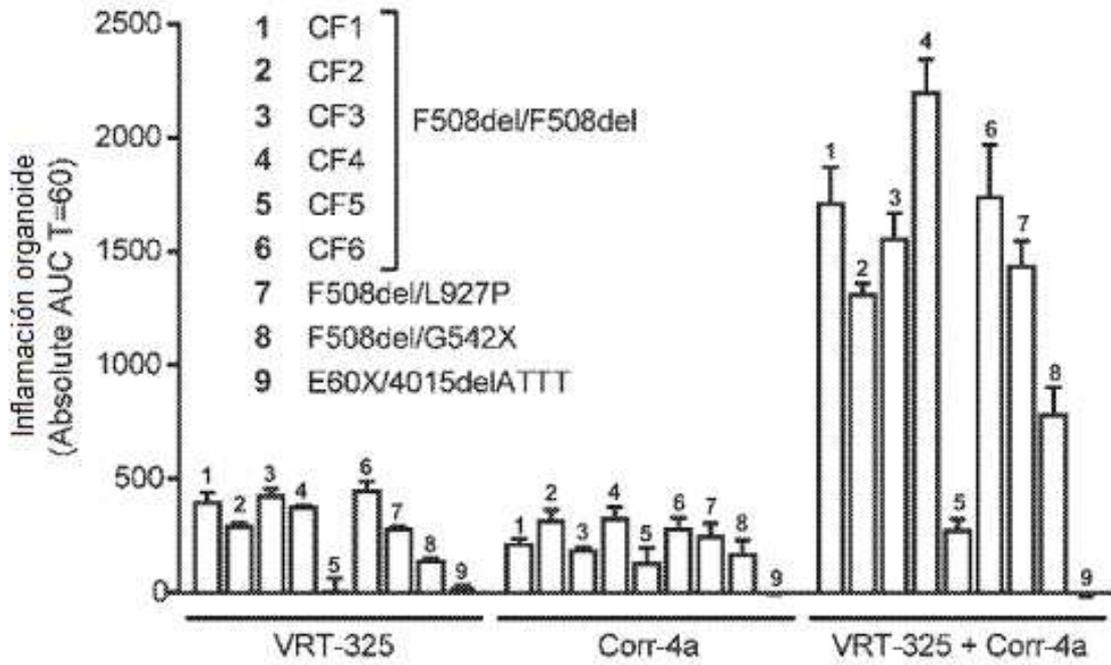


FIG. 14b

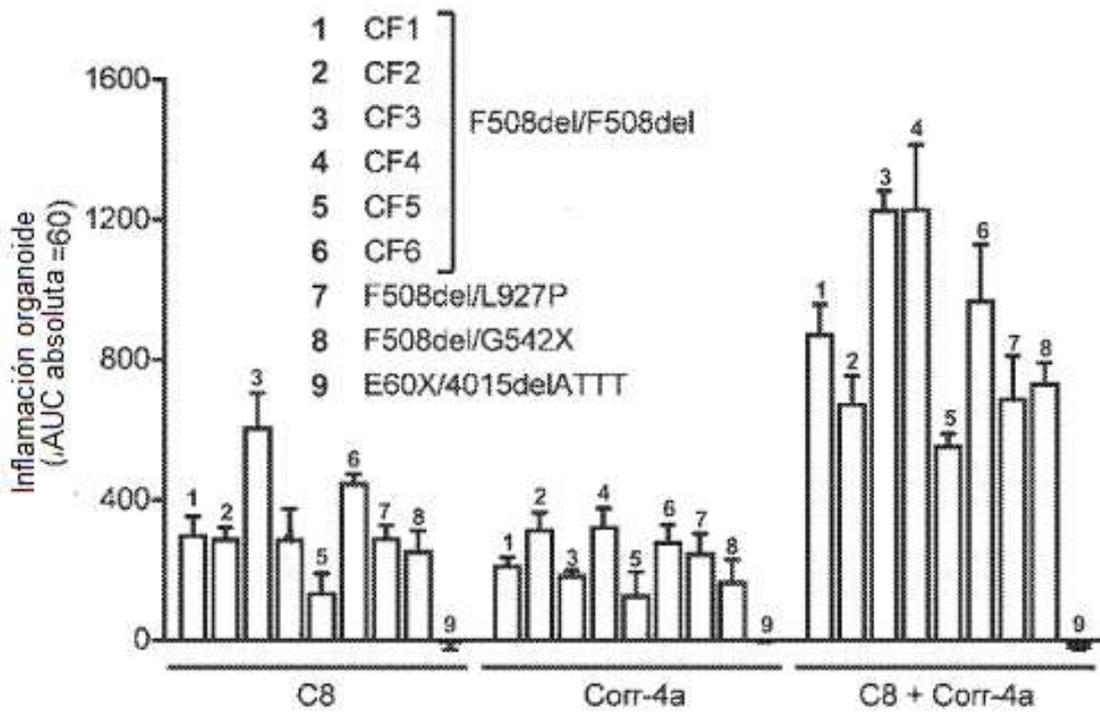


FIG. 14c

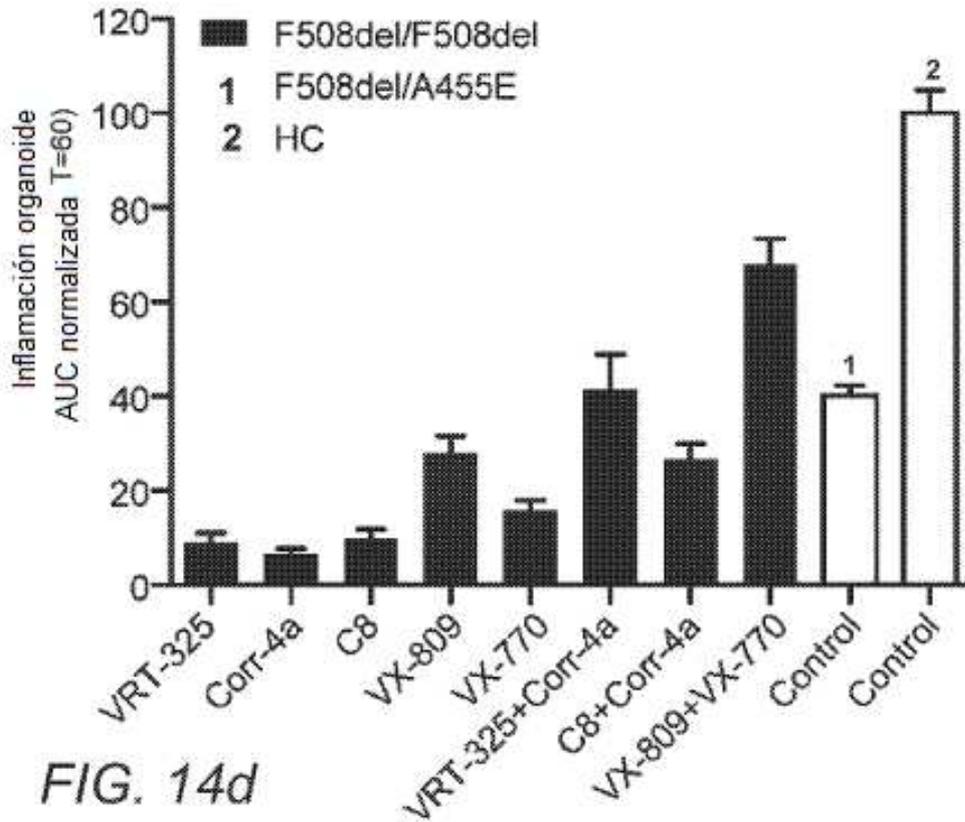
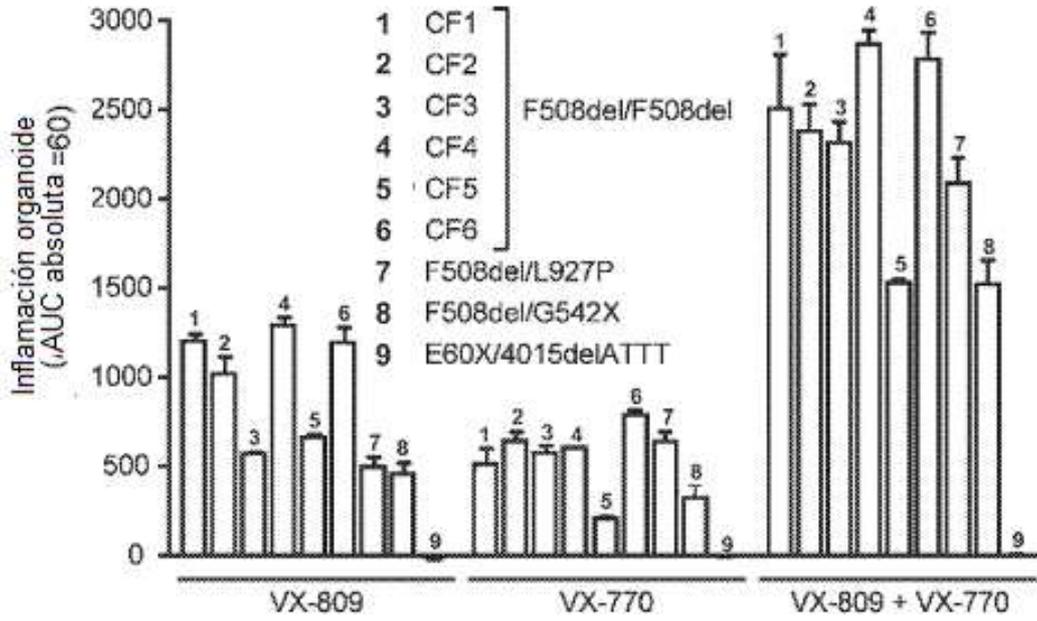


FIG. 14d

FIG. 15

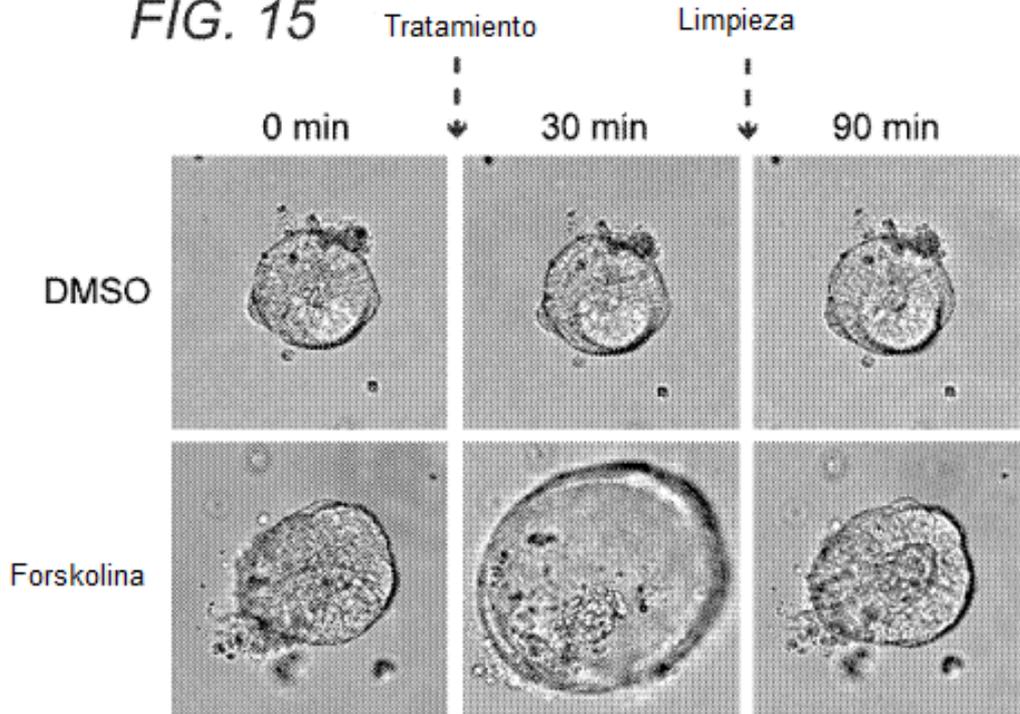


FIG. 16b

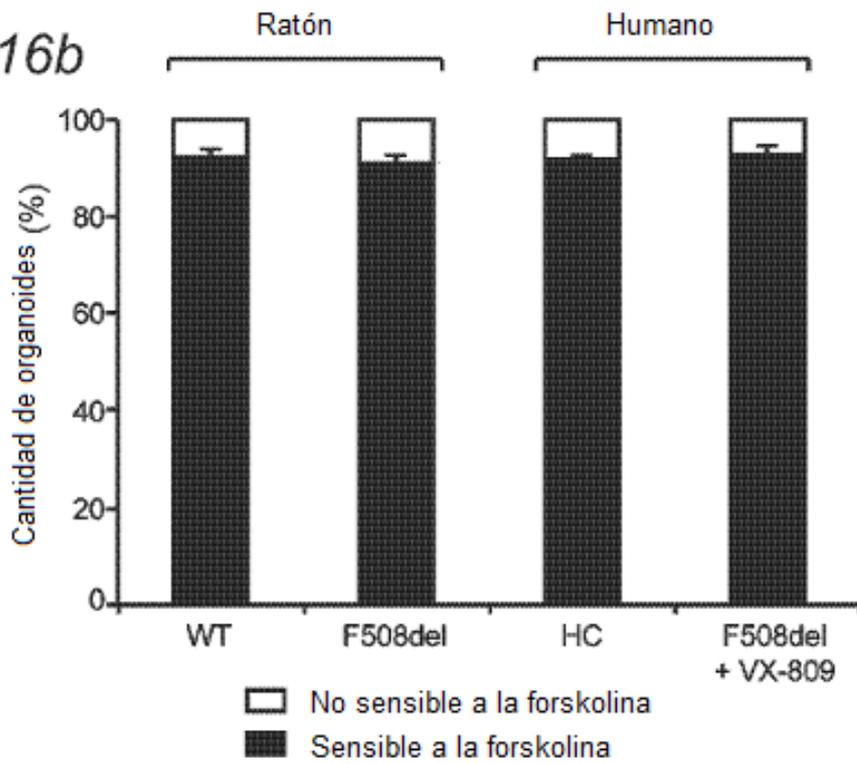
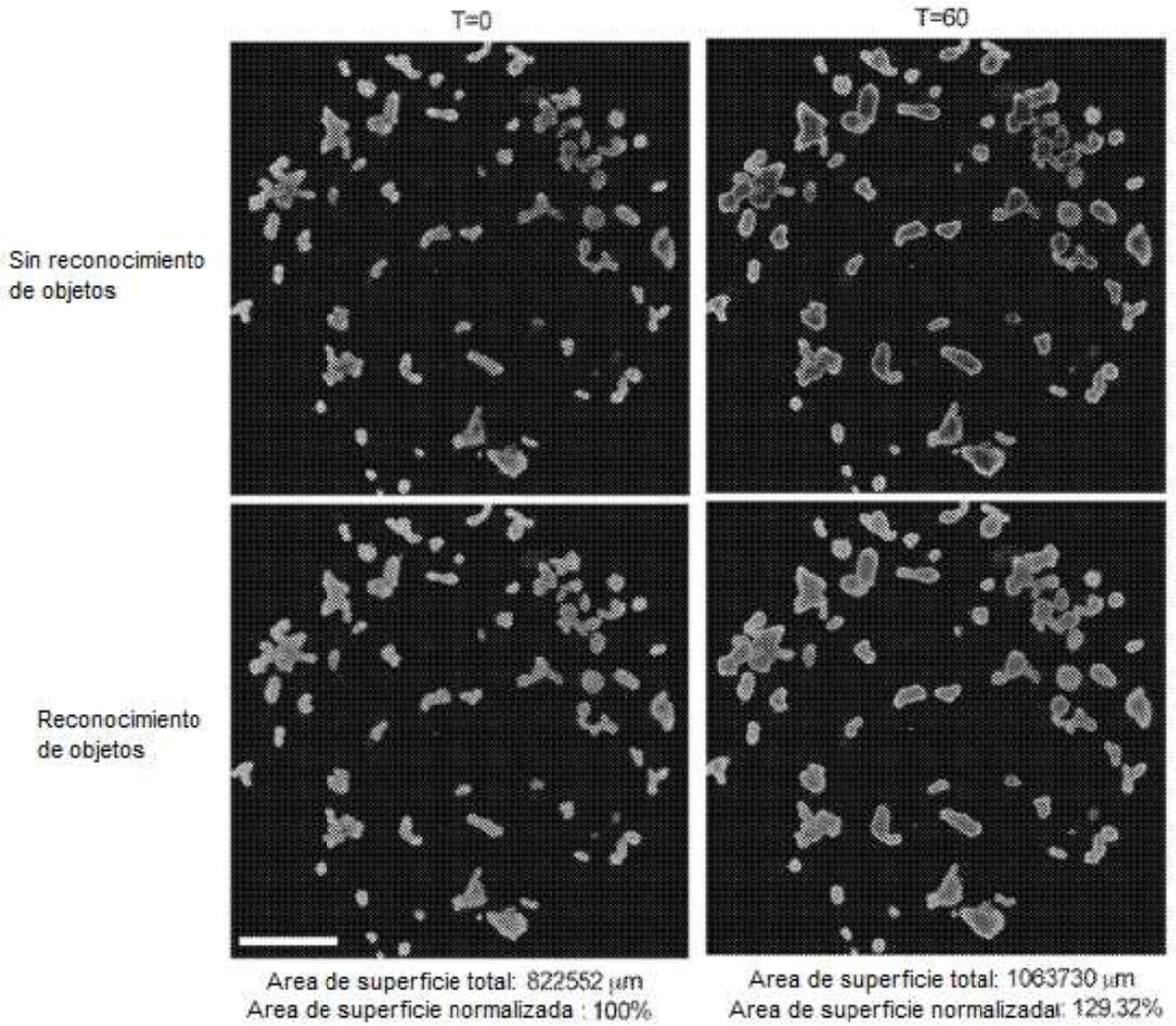


FIG. 16a



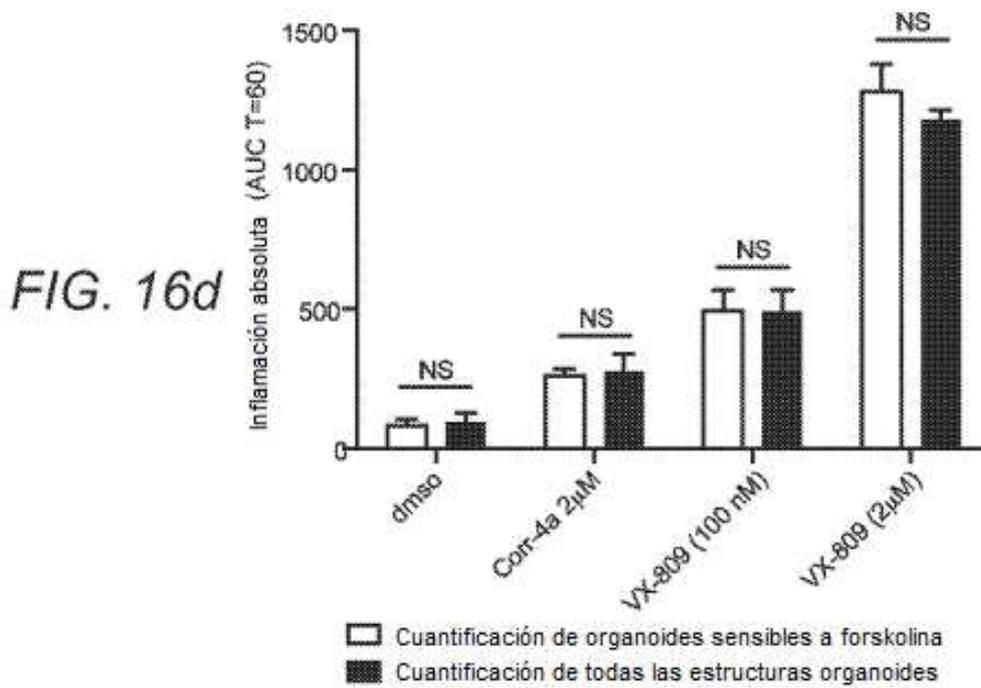
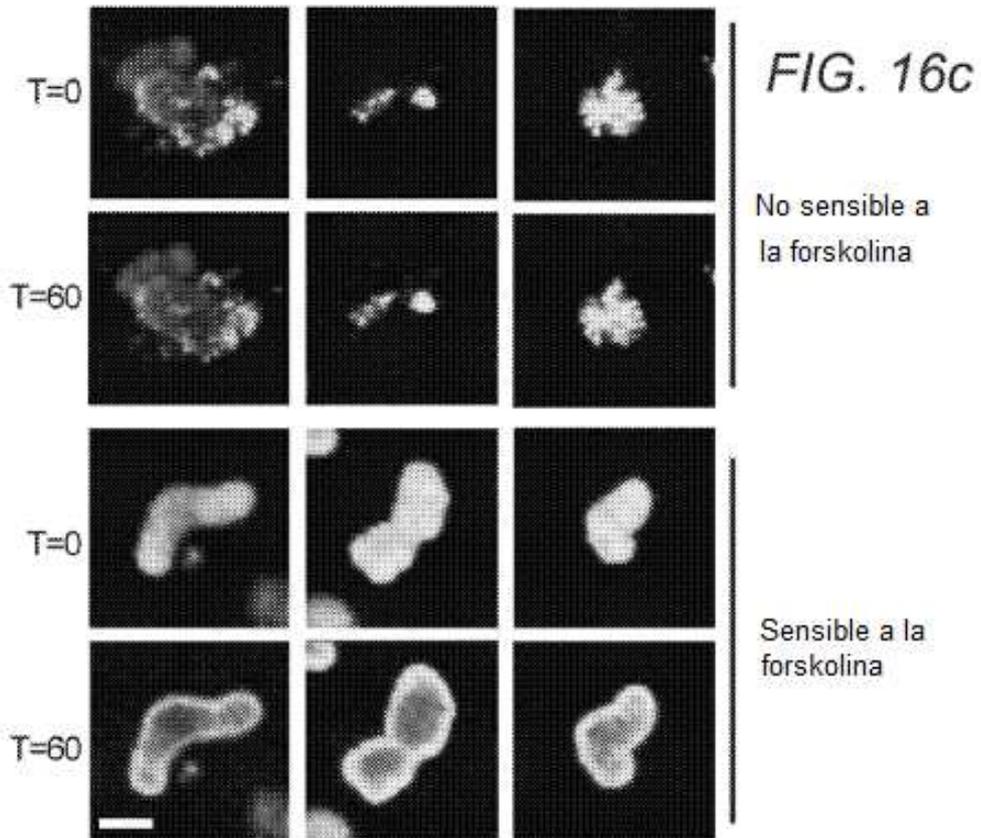


FIG. 17a

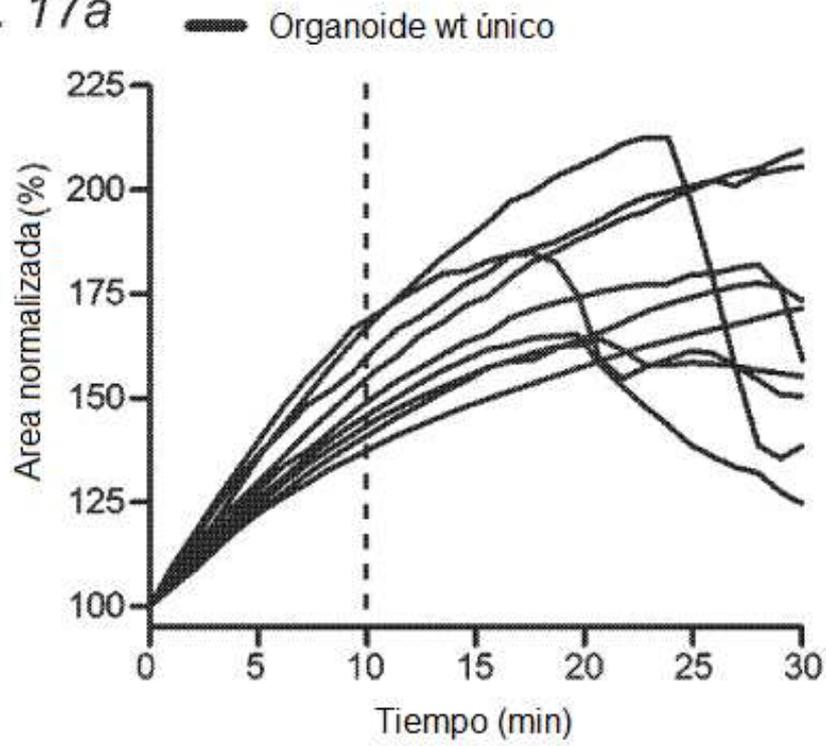


FIG. 17b

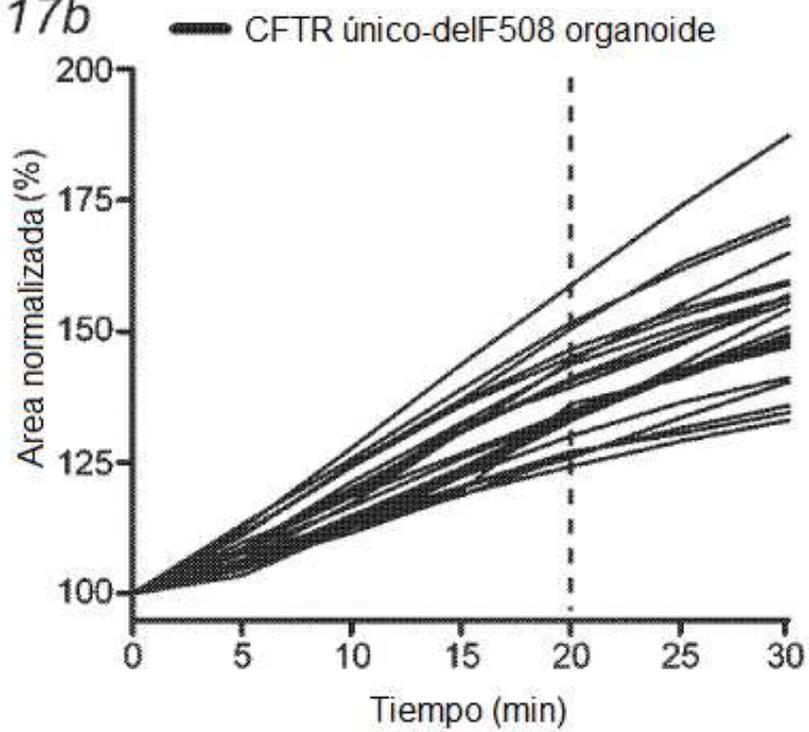


FIG. 17c

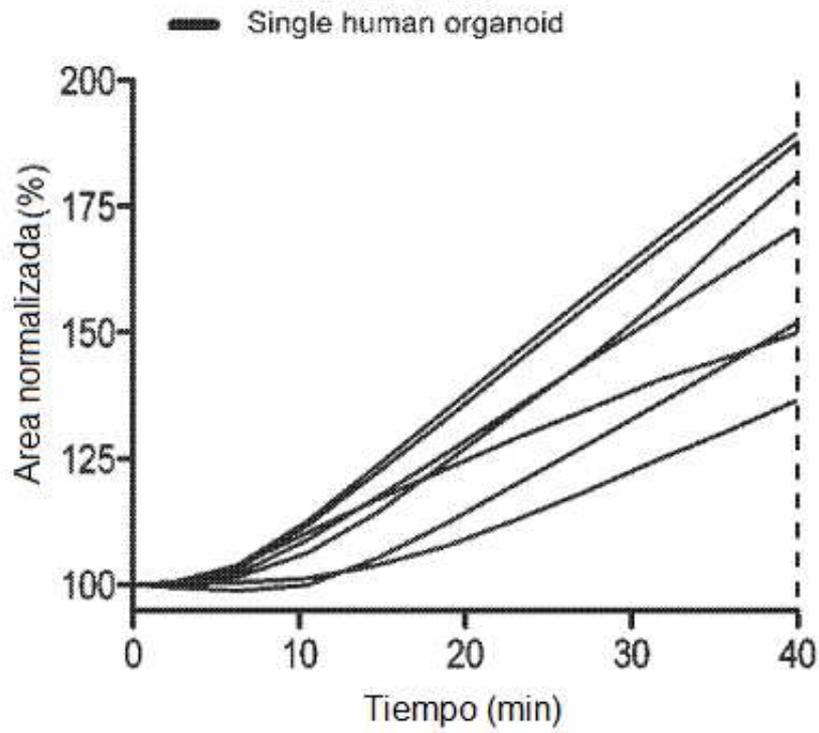


FIG. 19a

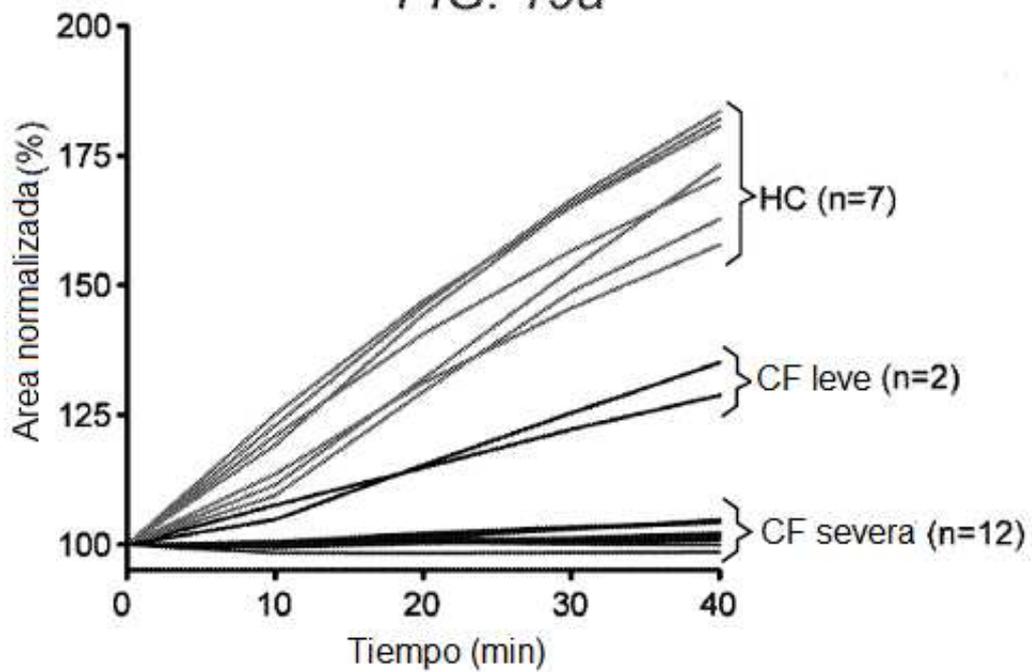


FIG. 18

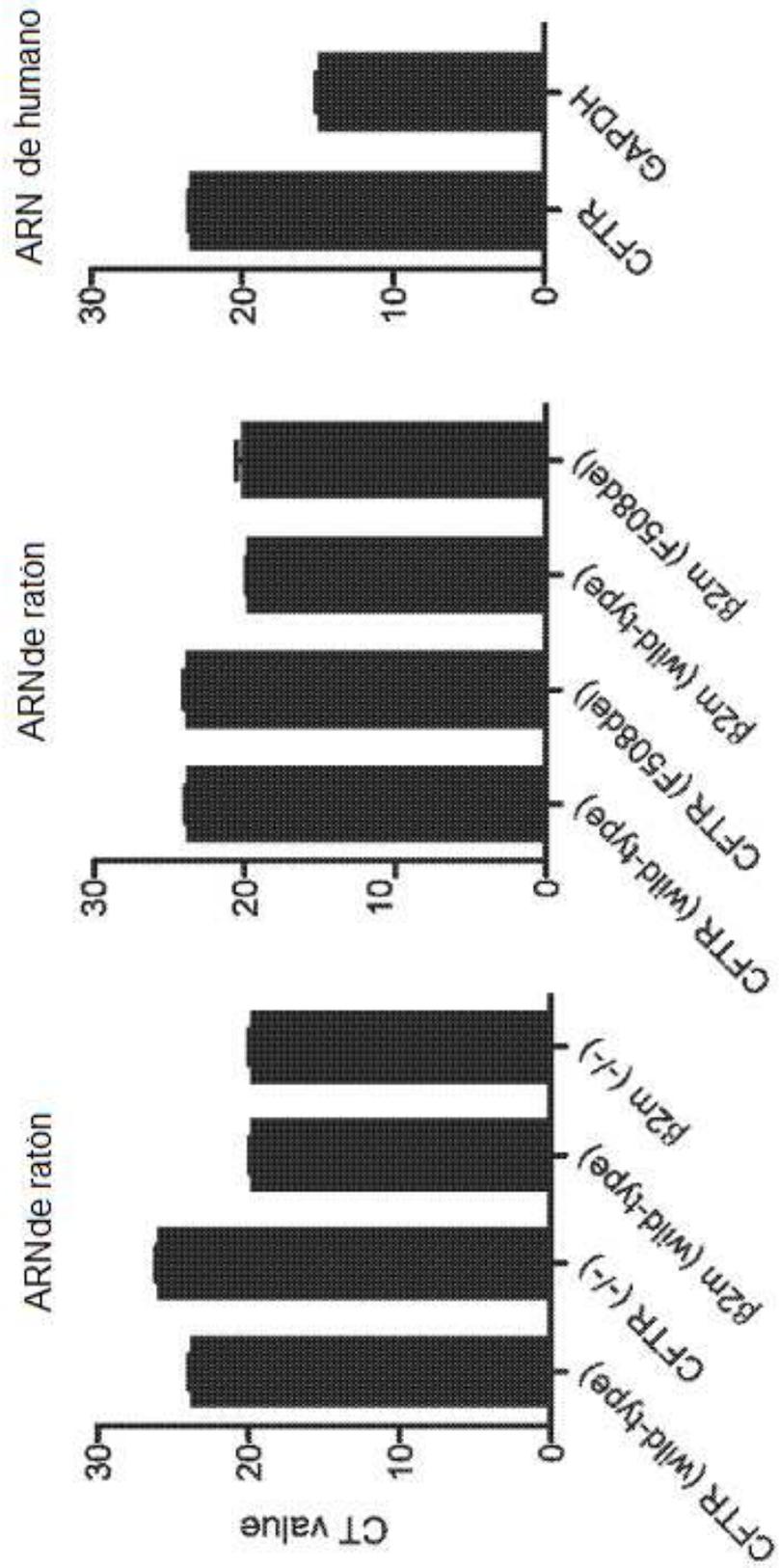


FIG. 19c

CF Leve (N=2)

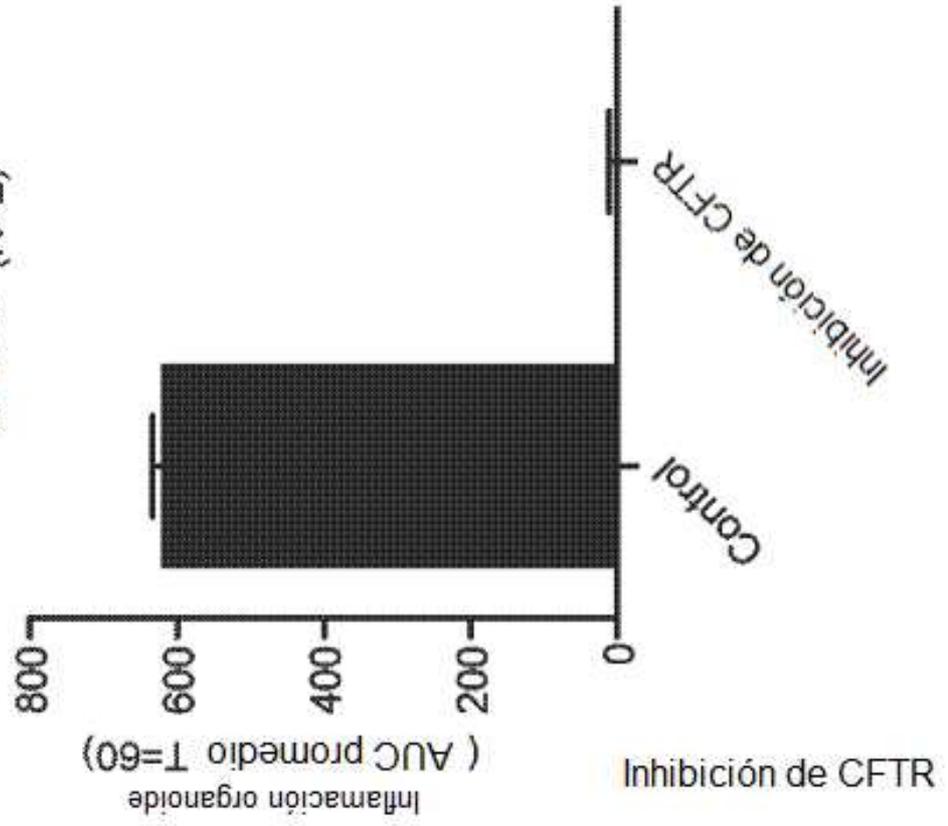


FIG. 19b

CF Severa (N=8)

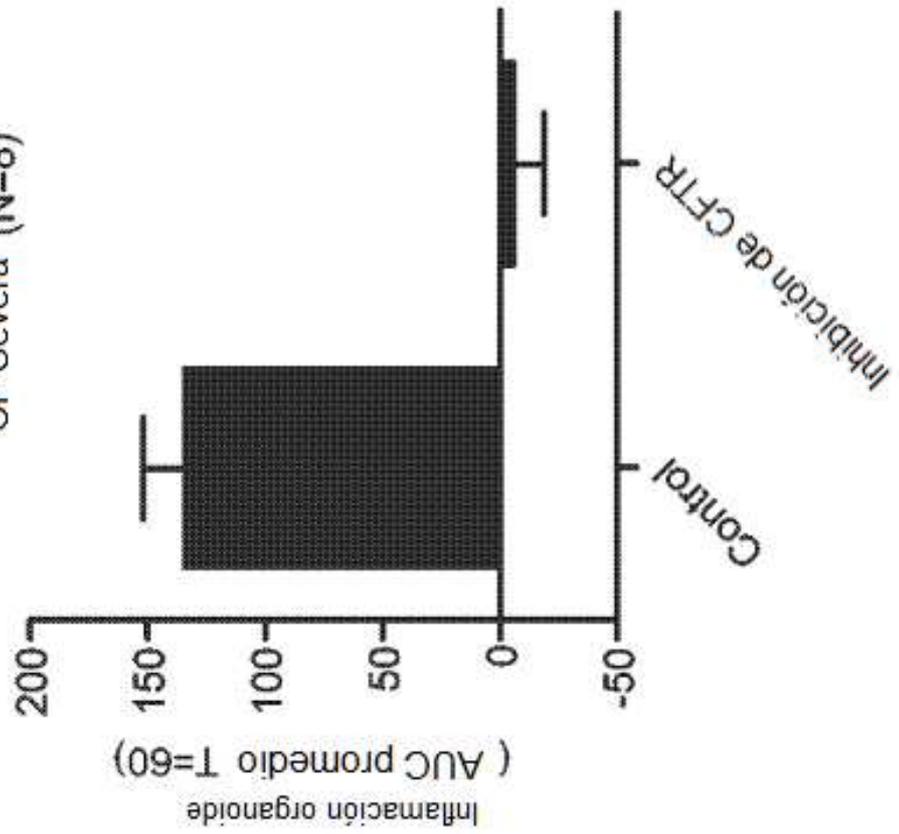


FIG. 20a

Rastreo de IMC

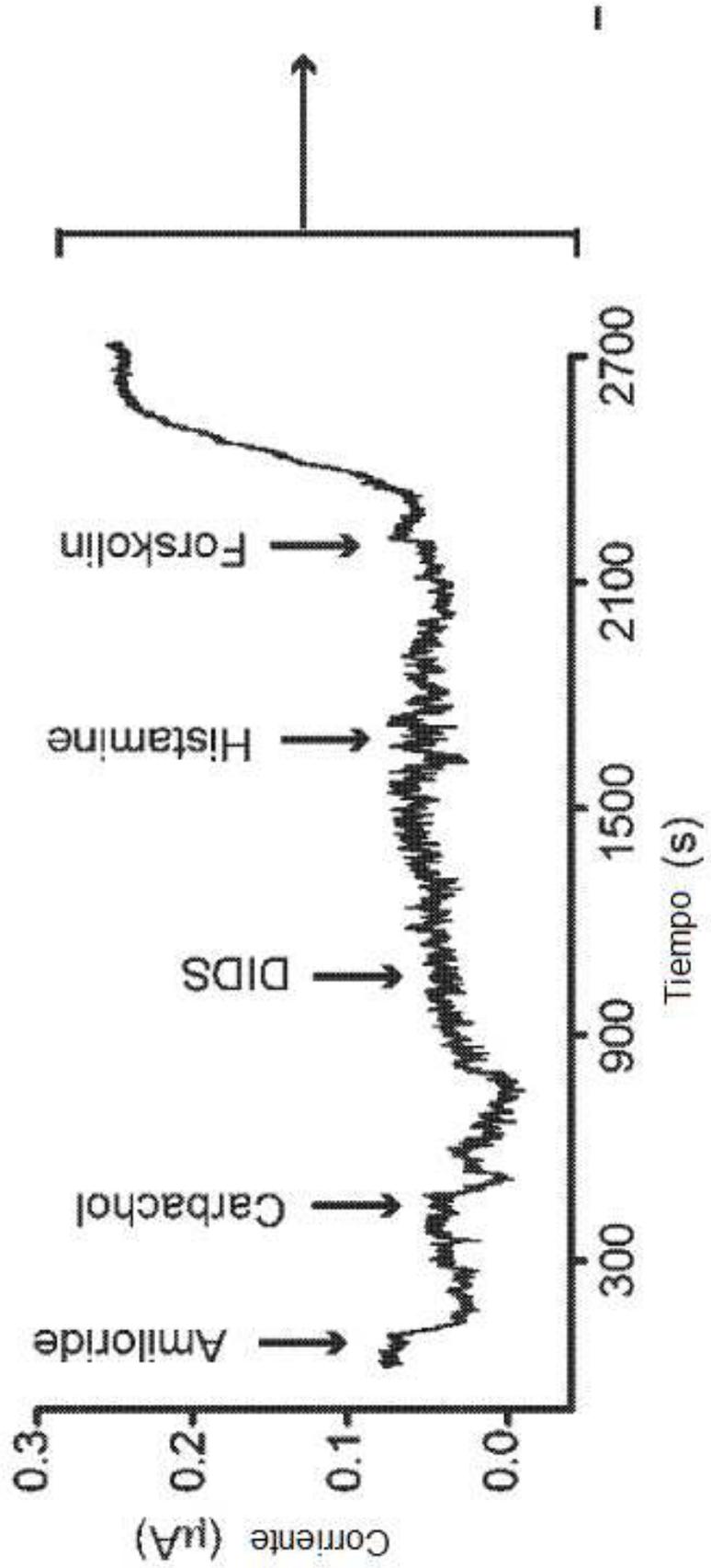


FIG. 20b

	Inflamación de forskolin inducida (AUC T=60)	SD	Secreción de Cl ⁻ inducida por forskolina (μ Amp/cm ²)	SD
E60X/4015delATTT	2.63	4.56	-5.1	3.9
F508del/G542X	32.49	30.65	0.5	0.8
F508del/F508del	60.52	4.75	7	3.1
F508del/F508del	149.93	49.52	5.3	1.7
F508del/F508del	98.21	21.45	7.9	3.2
F508del/F508del	164.14	20.54	9.1	4.4
F508del/F508del	179.33	23.90	-10.1	-3.7
F508del/A455E	1494.00	118.03	14.2	4.4
F508del/A455E	1343.33	81.29	17	4.7
Healthy control	3191.33	724.50	26.3	12.8
Healthy control	3755.00	762.86	57	18.2
Healthy control	3666.75	287.97	50.1	14.5

FIG. 20c

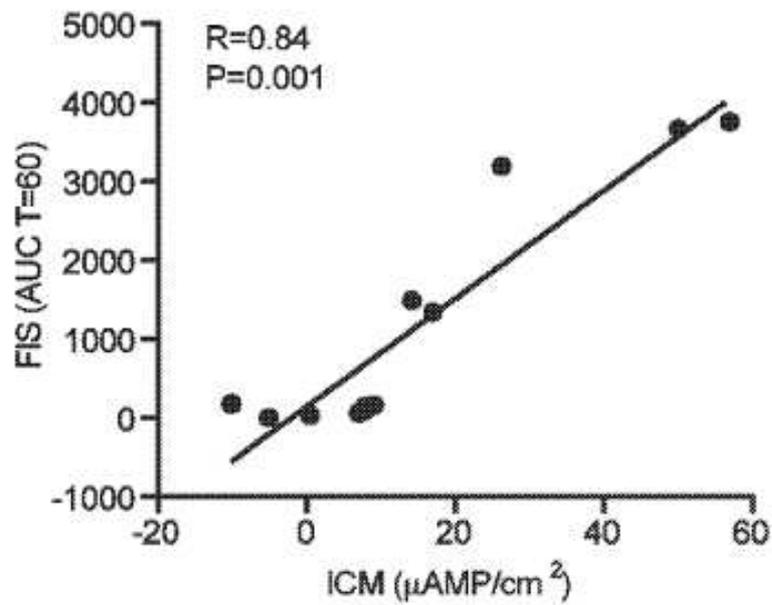


FIG. 21

Ileal F508del/F508del organoids

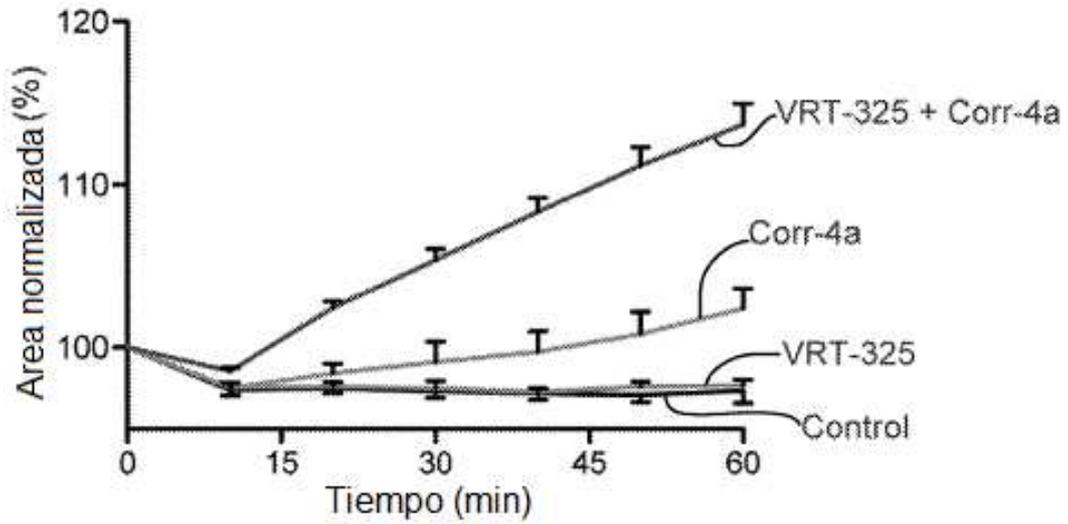


FIG. 21(contd)

Ileal F508del/F508del organoids

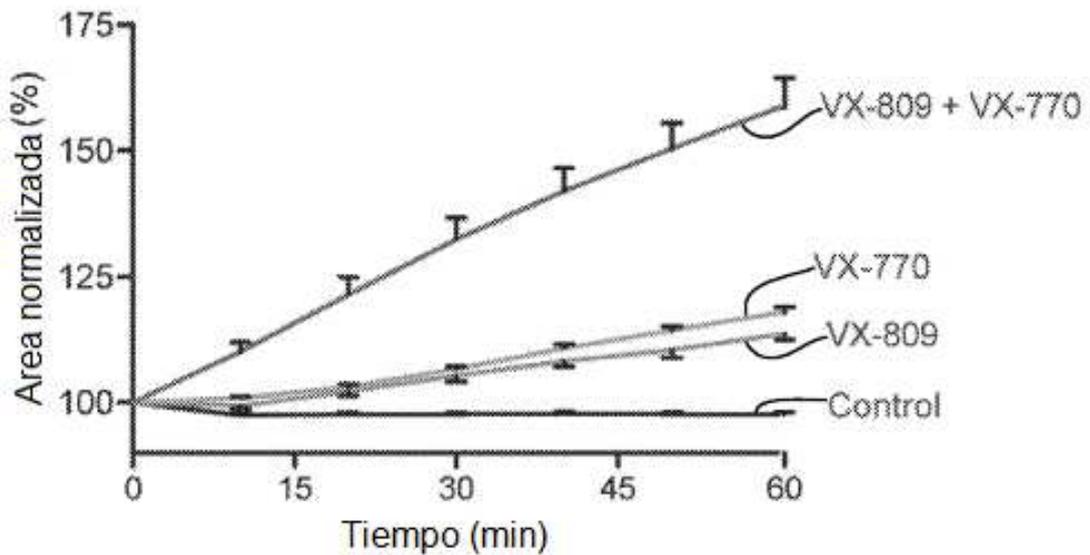


FIG. 21(contd)

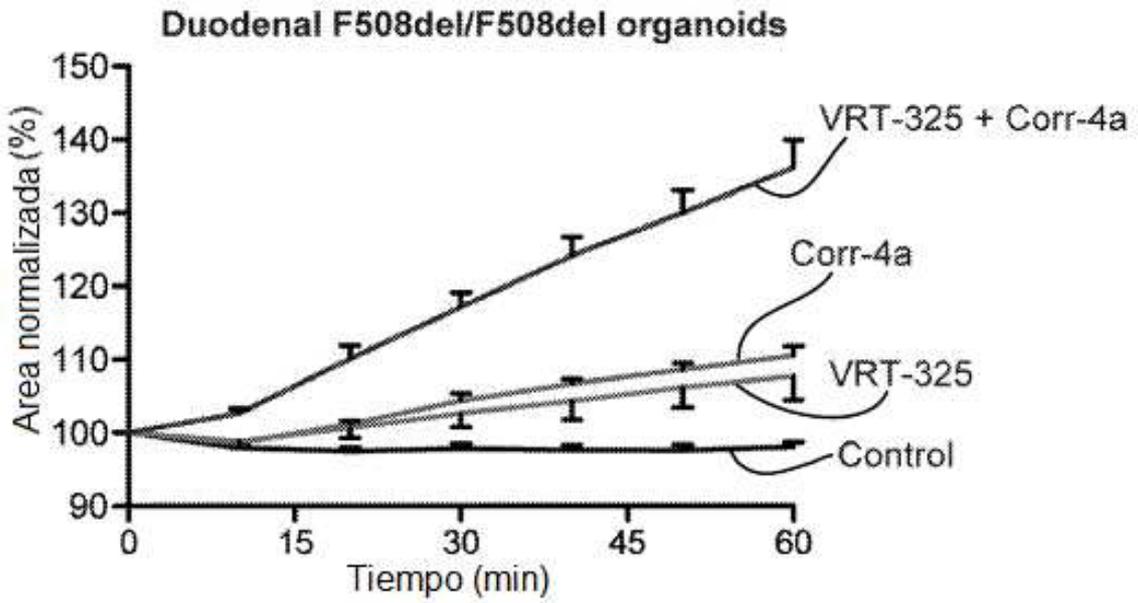


FIG. 21(contd)

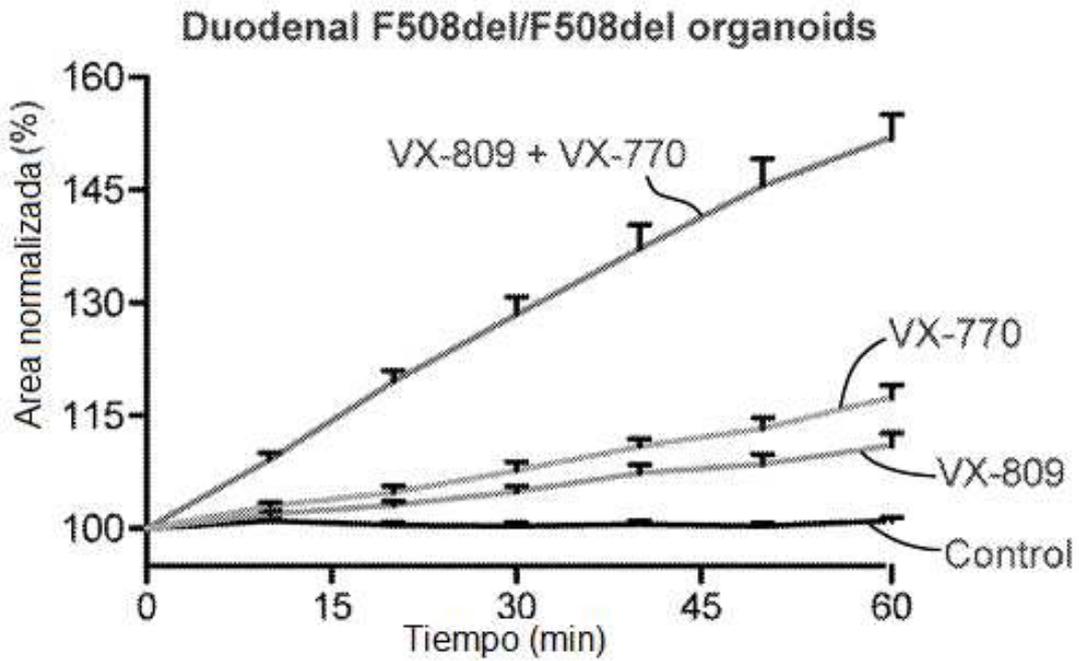


FIG. 21(contd)

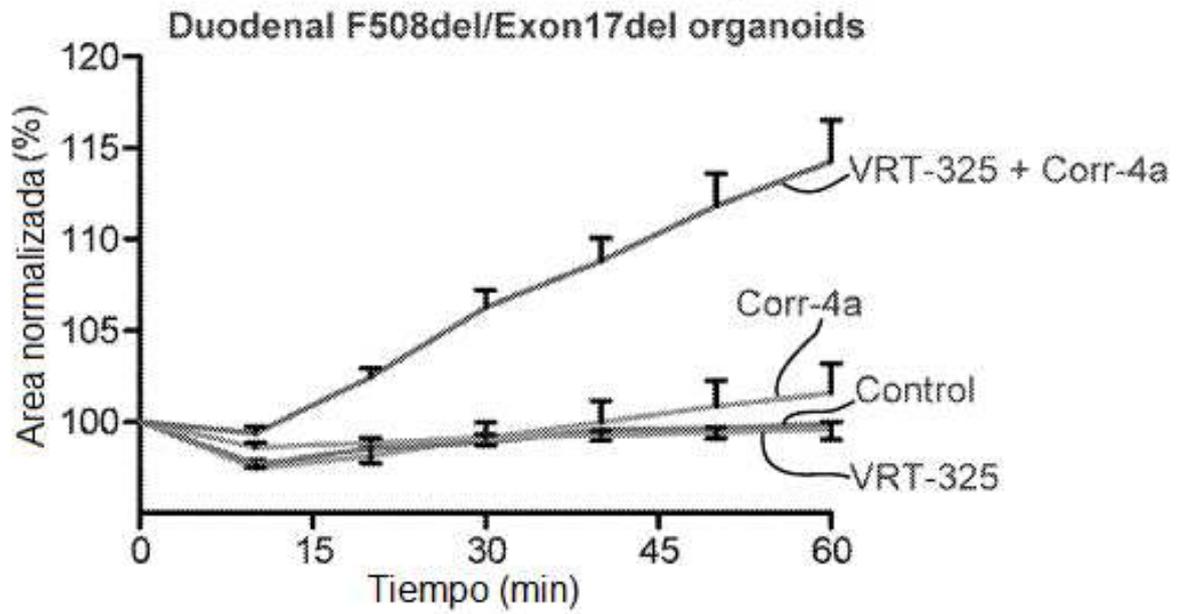


FIG. 21(contd)

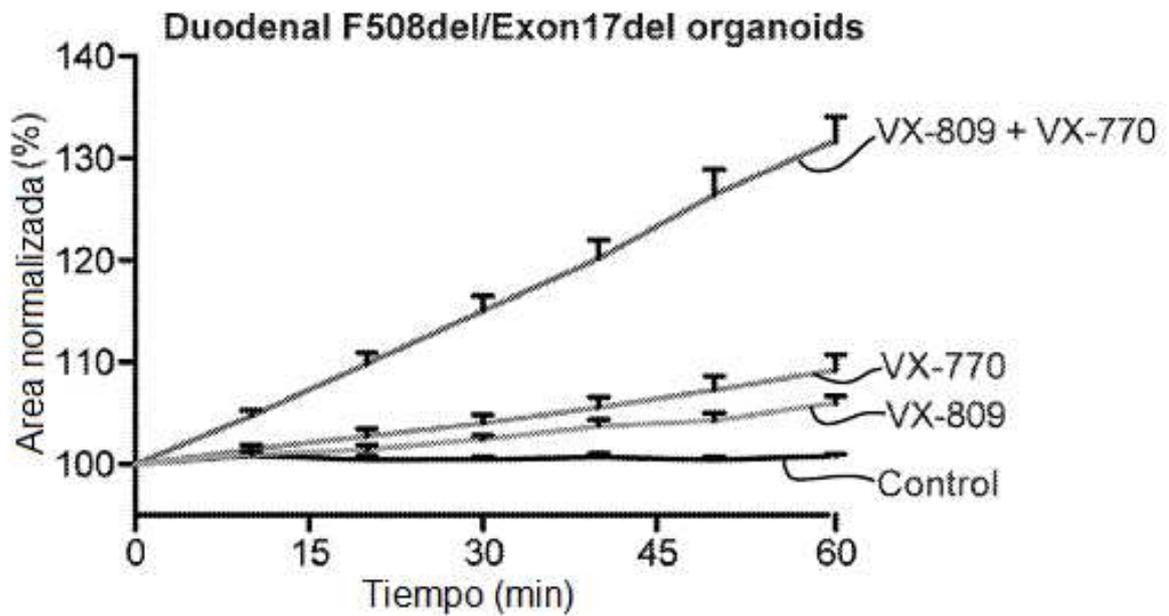
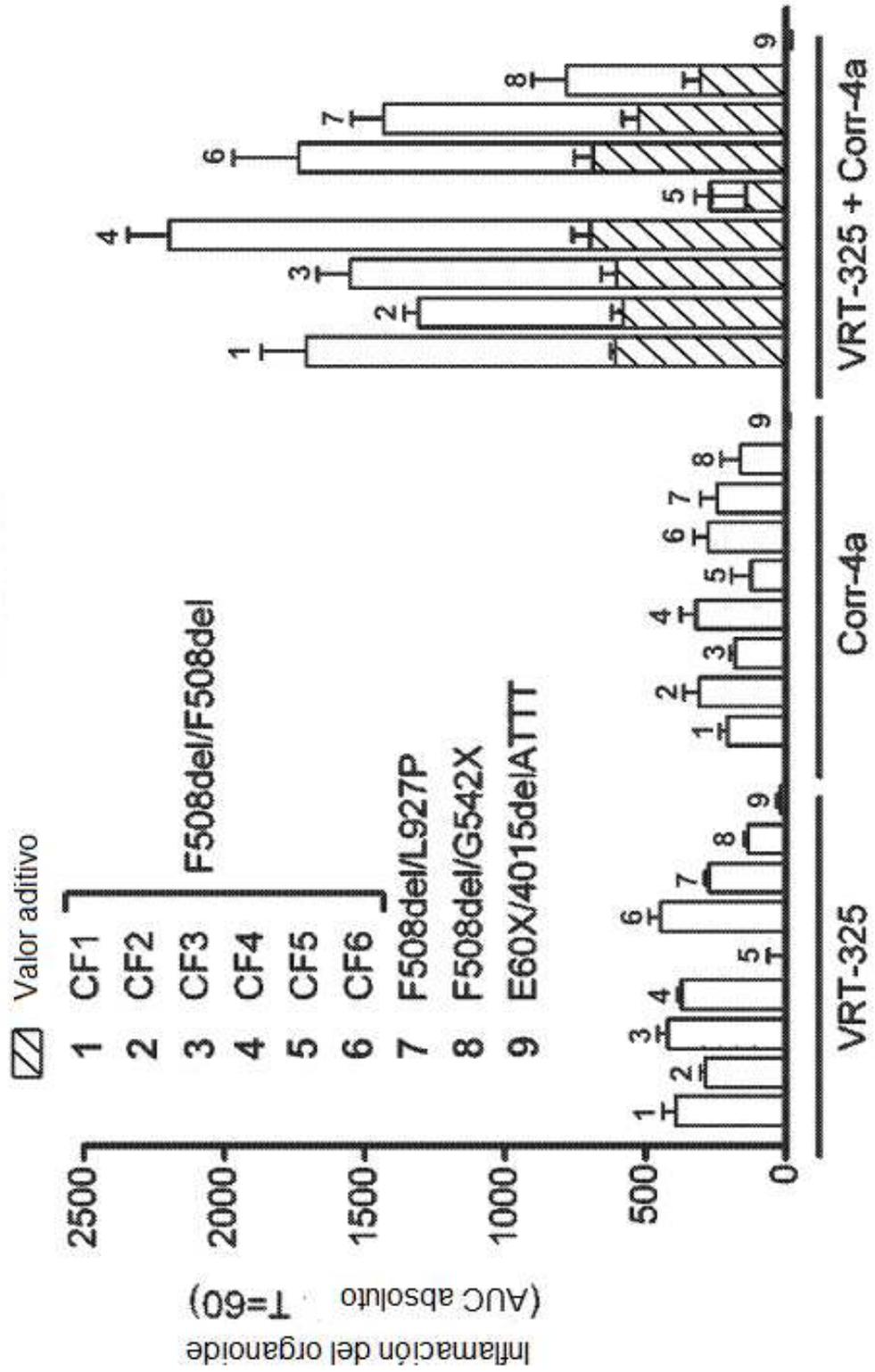
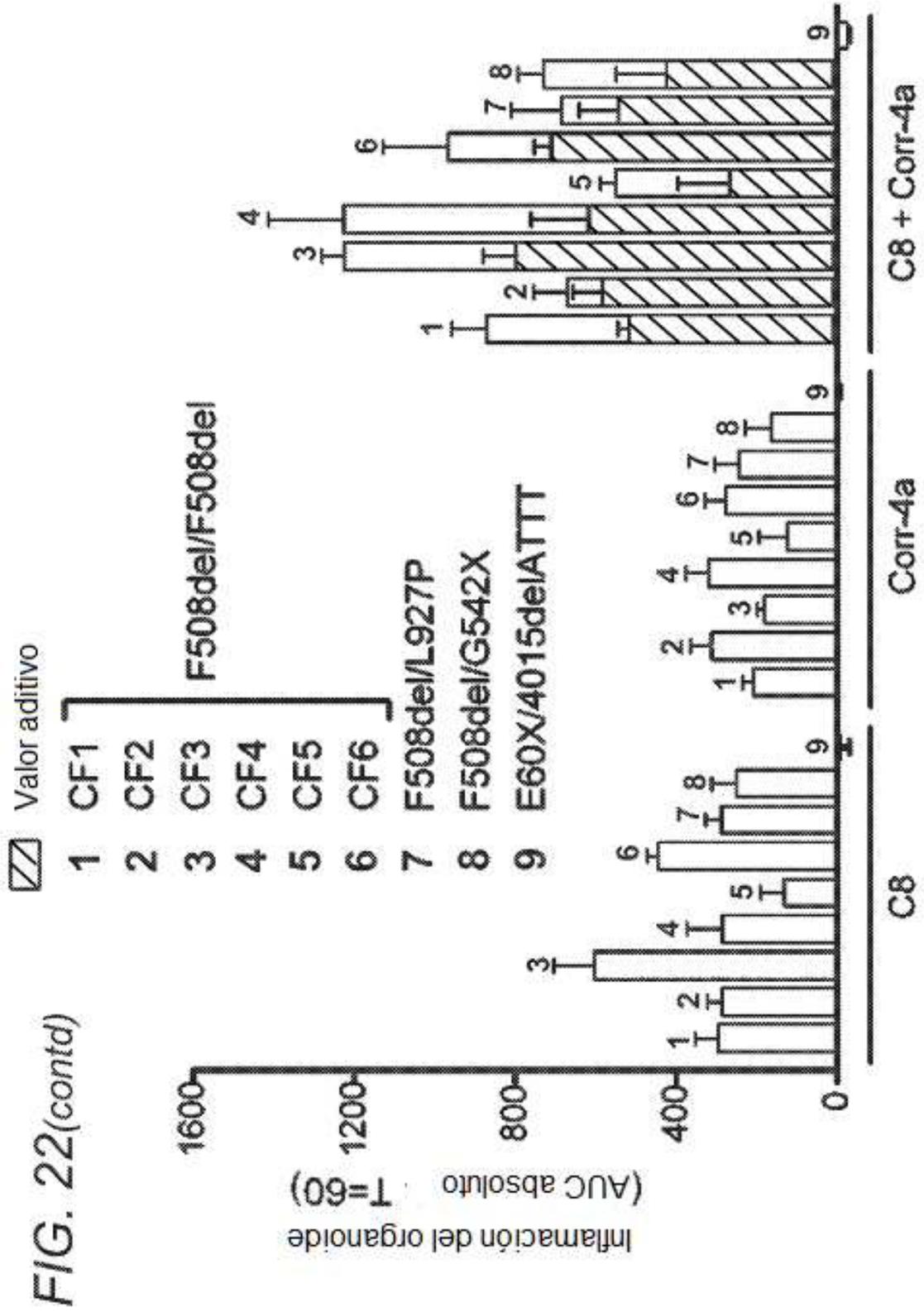


FIG. 22





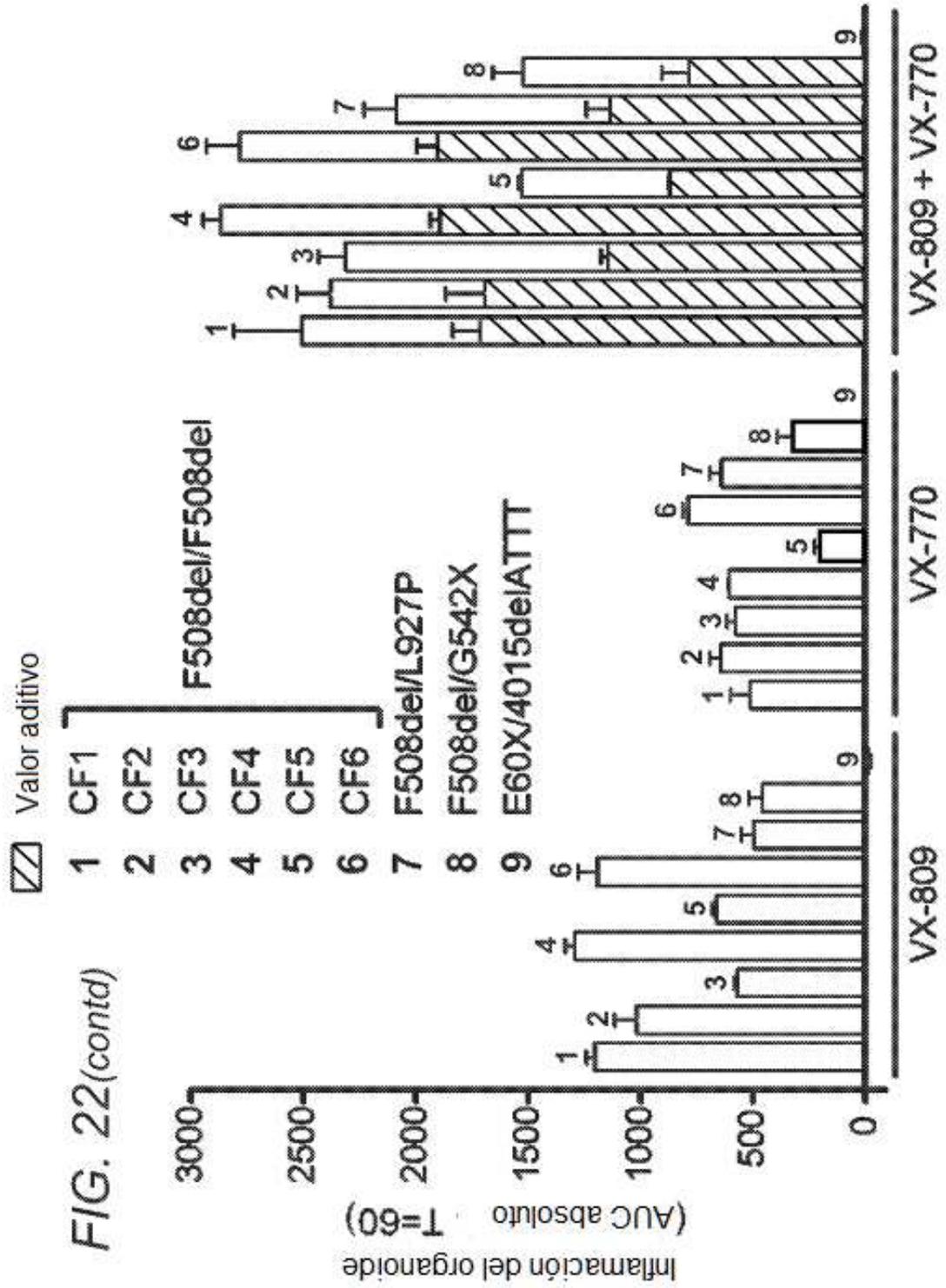


FIG. 23

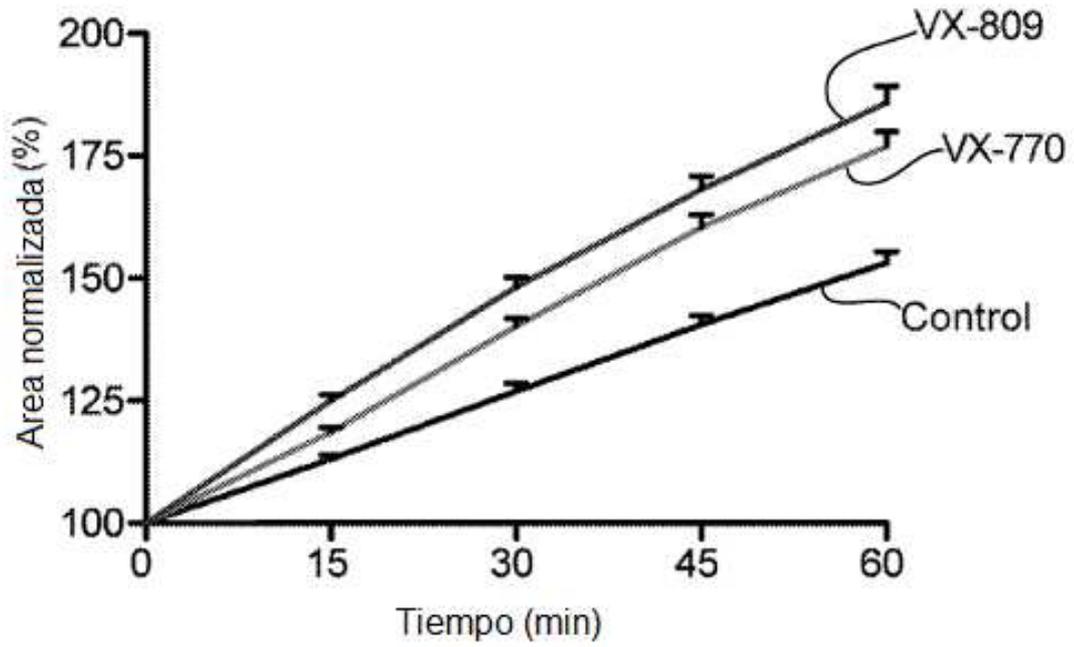


FIG. 24

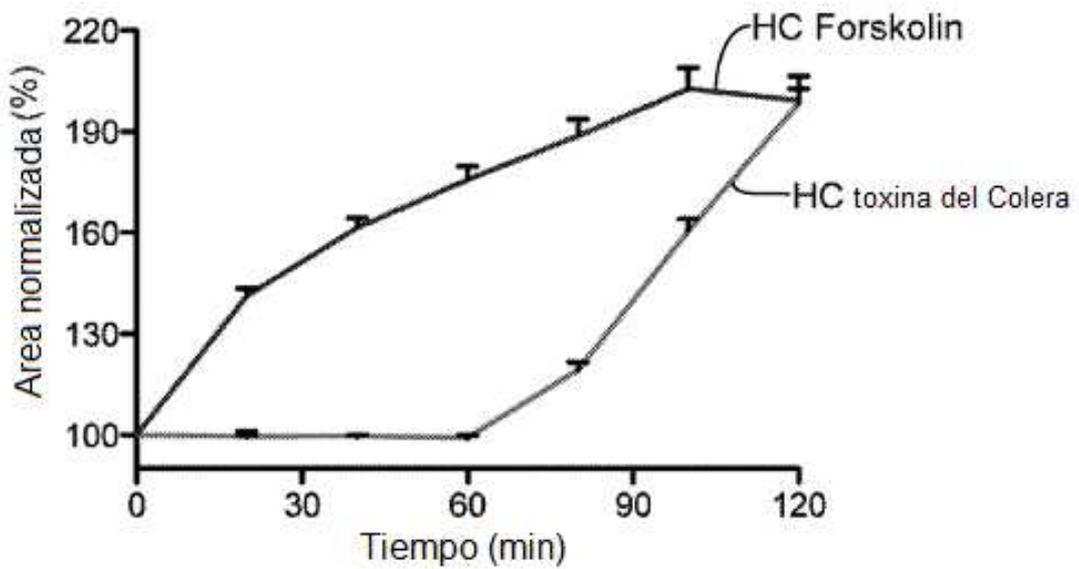


FIG. 25a

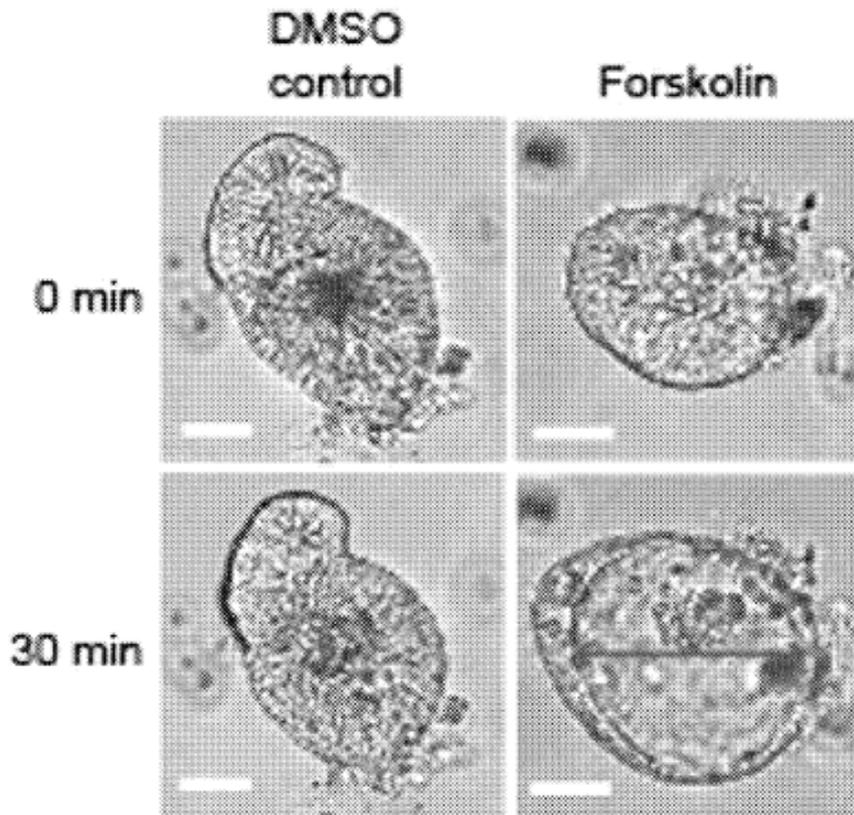


FIG. 25b

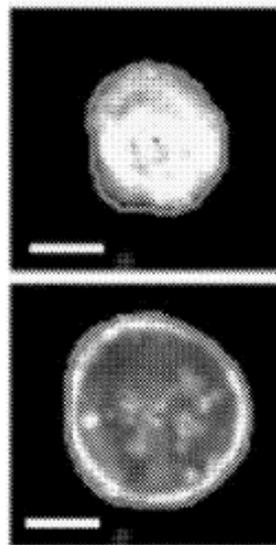


FIG. 25c

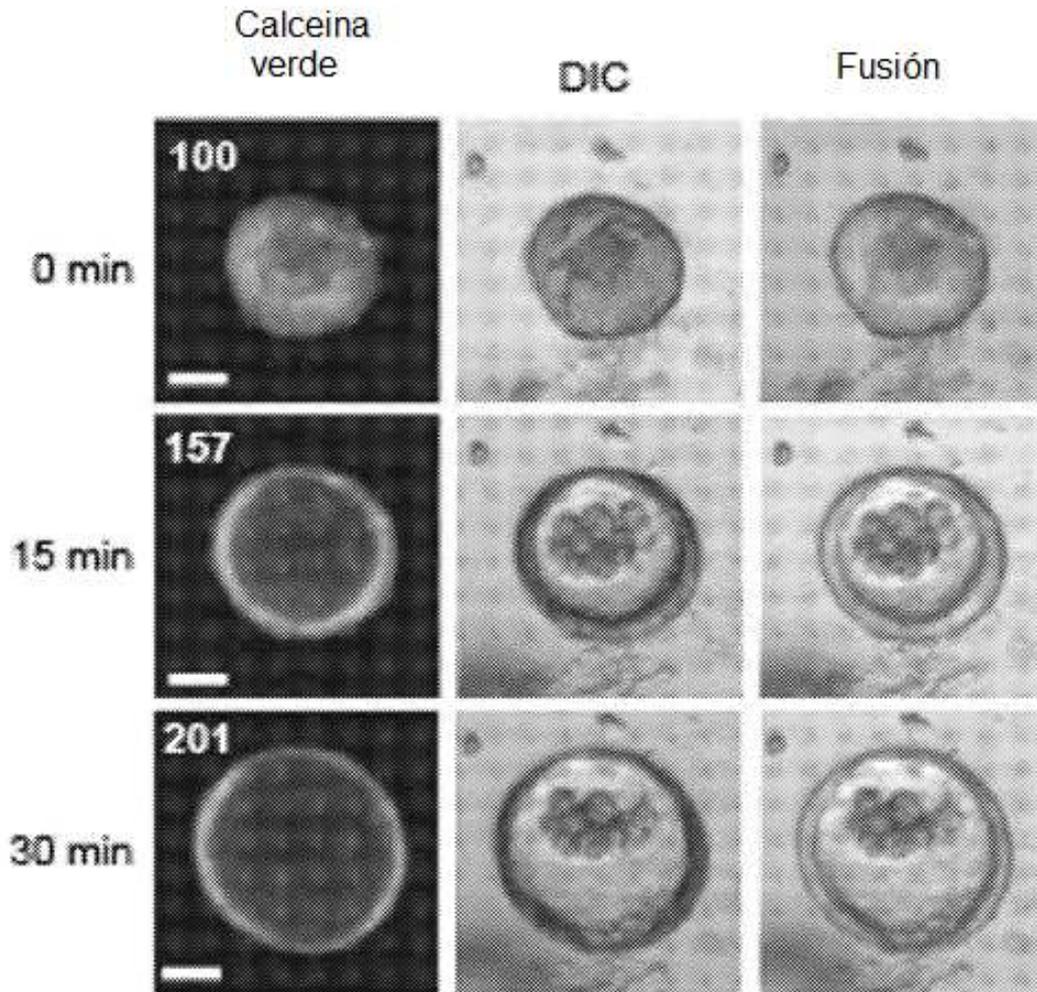


FIG. 25d

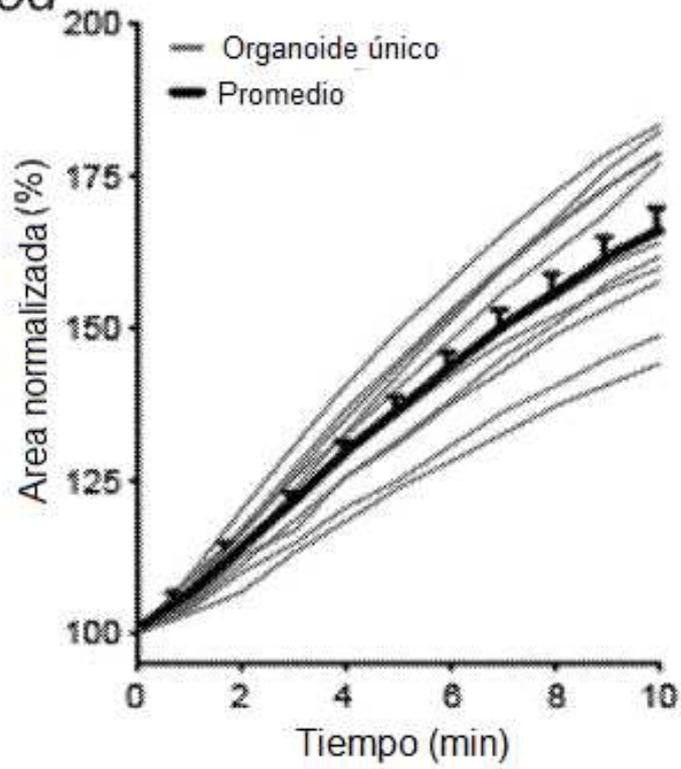


FIG. 25e

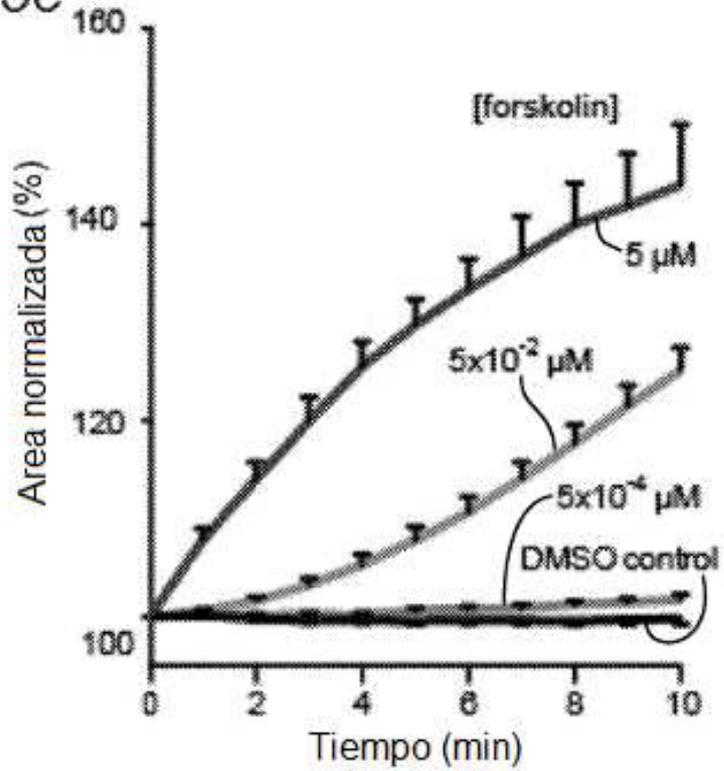


FIG. 26a

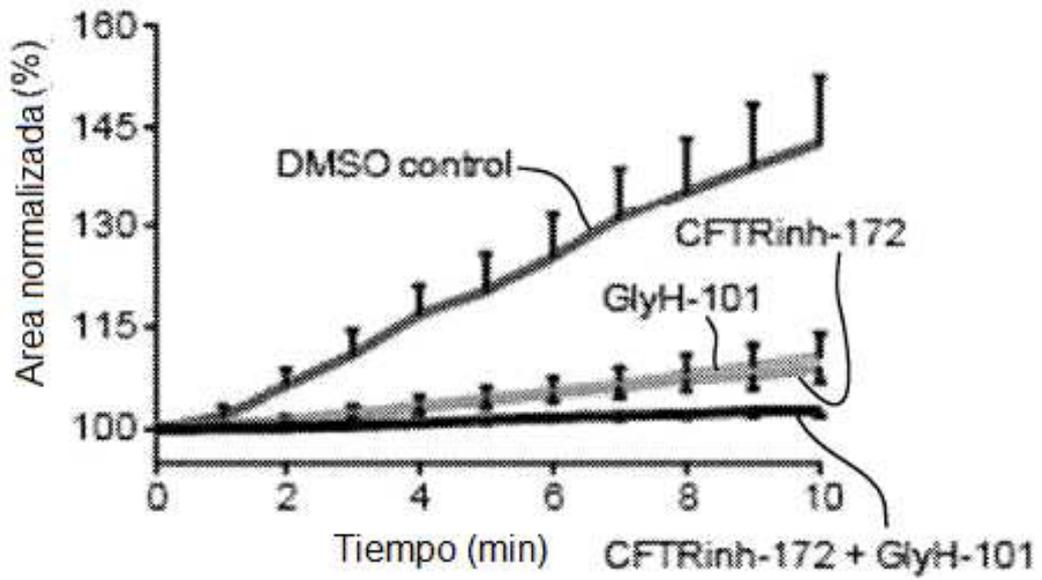


FIG. 26b

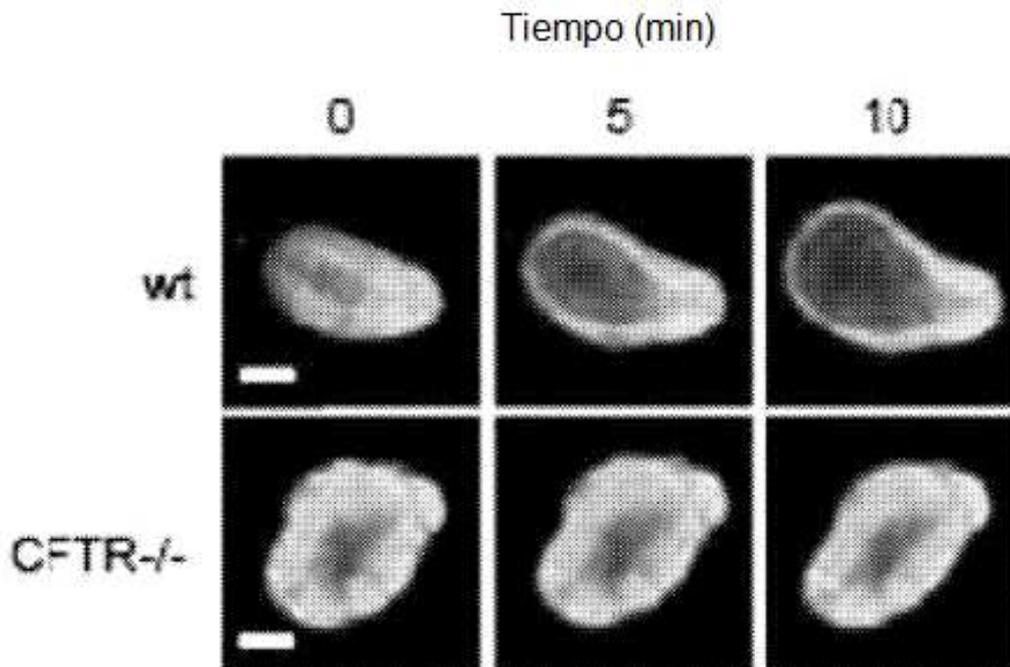


FIG. 26c

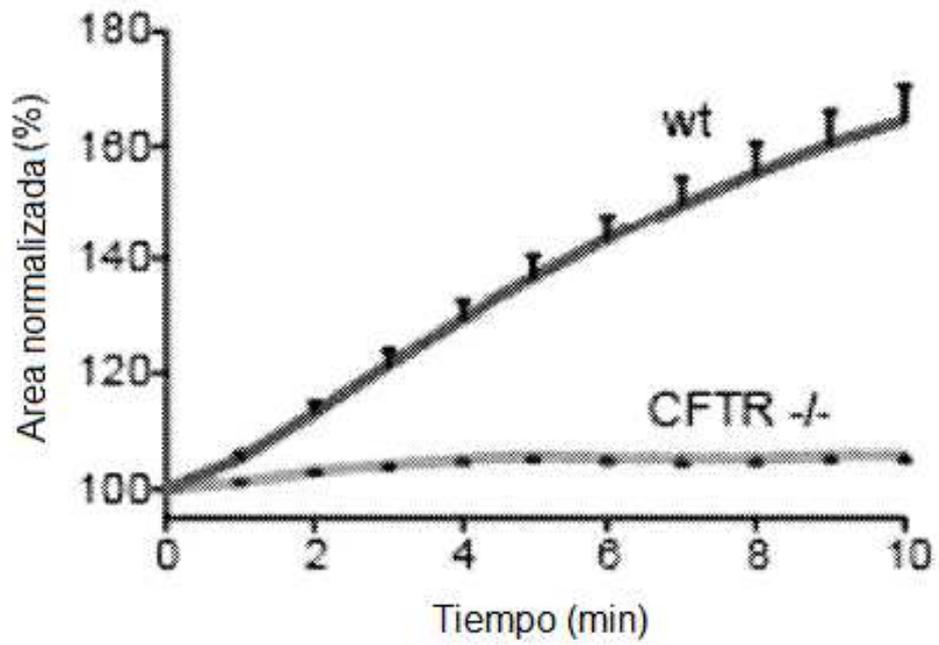


FIG. 26d

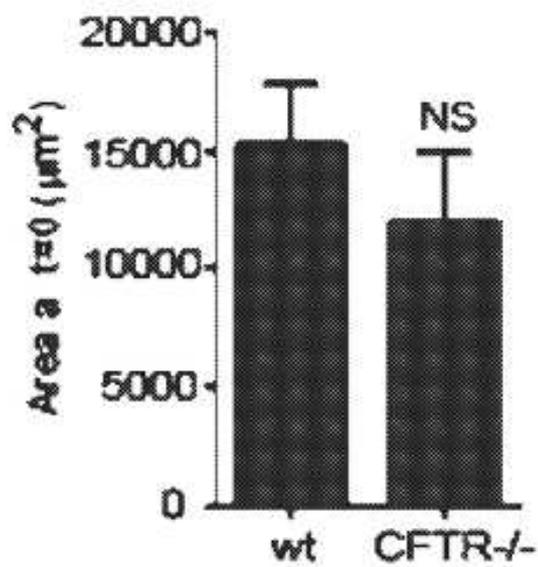


FIG. 26e

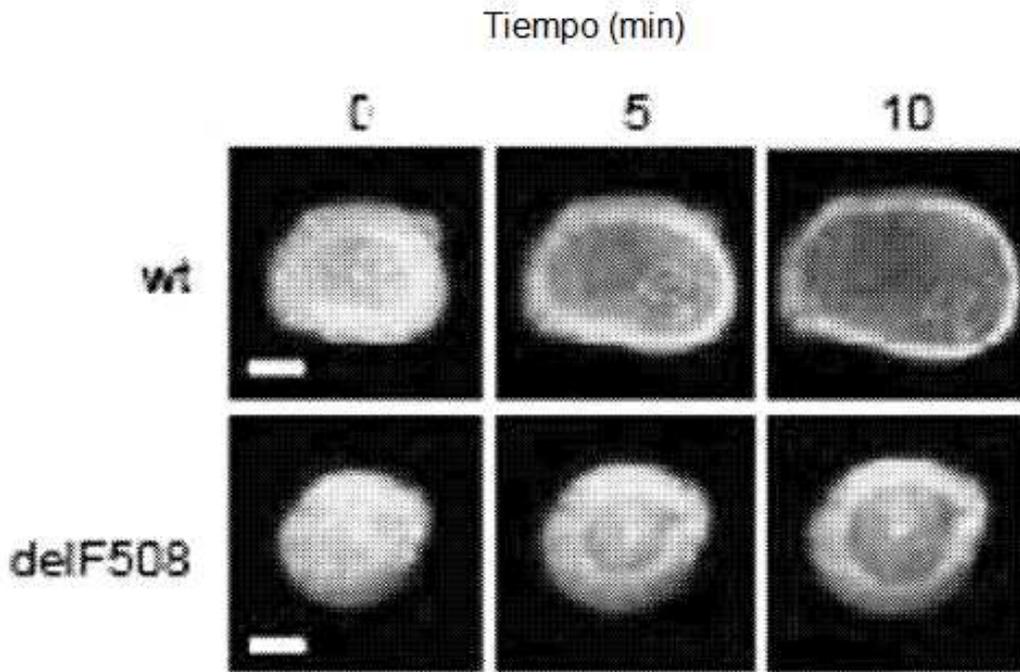


FIG. 26f

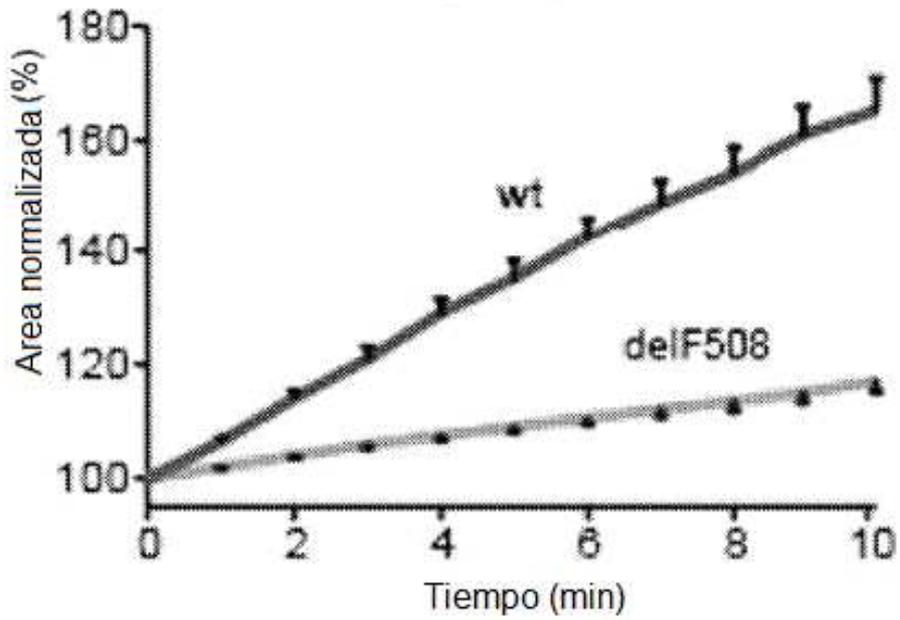


FIG. 26g

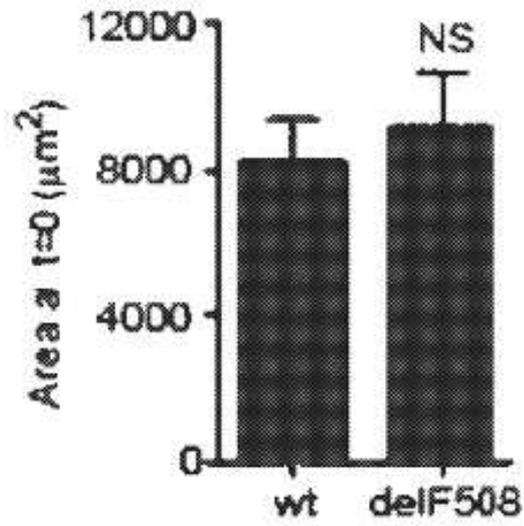


FIG. 26h

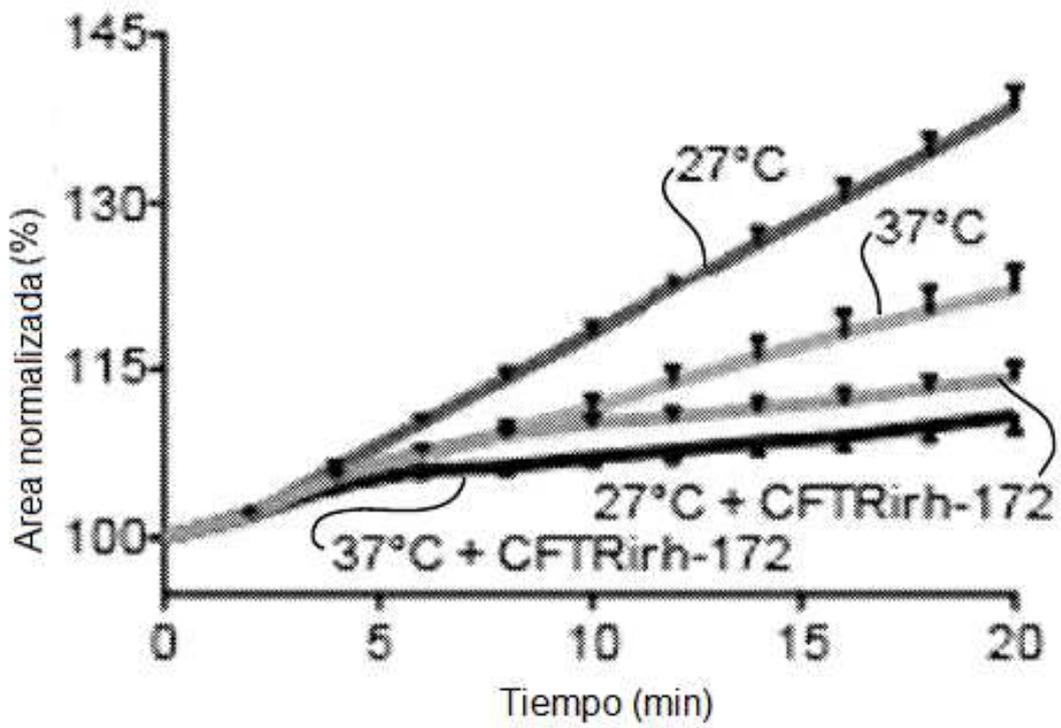


FIG. 27a

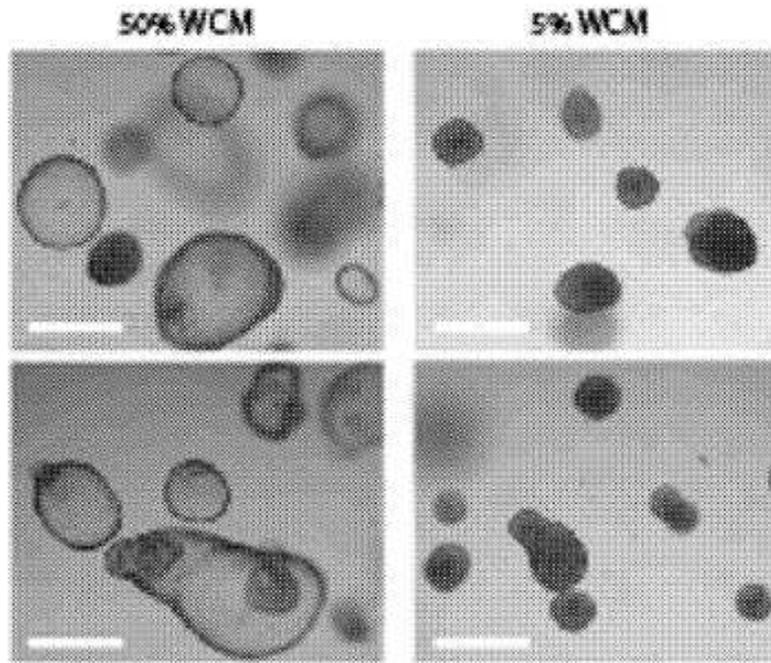


FIG. 27b

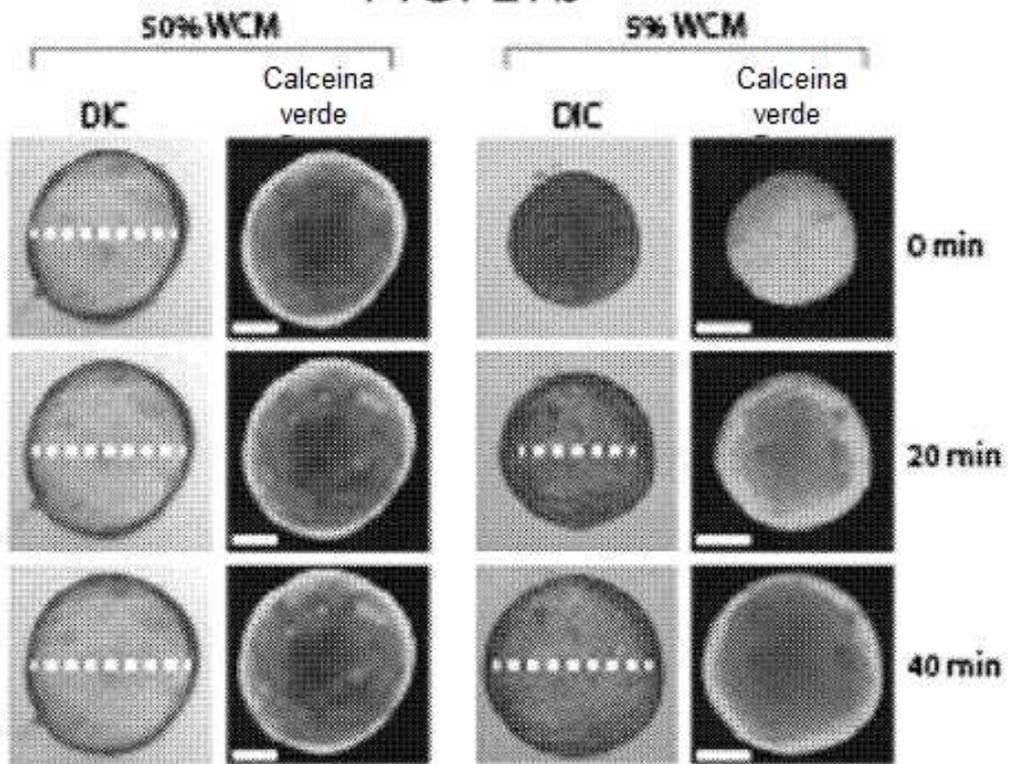


FIG. 27c

50% WCM

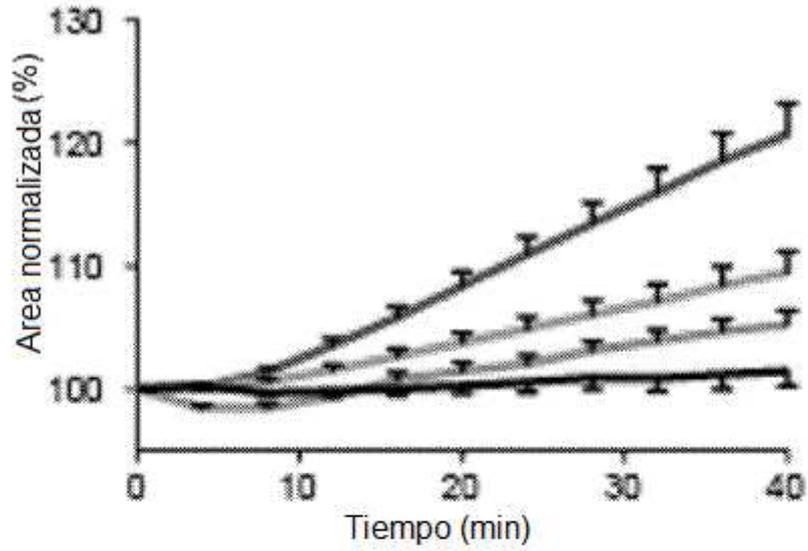


FIG. 27d

5% WCM

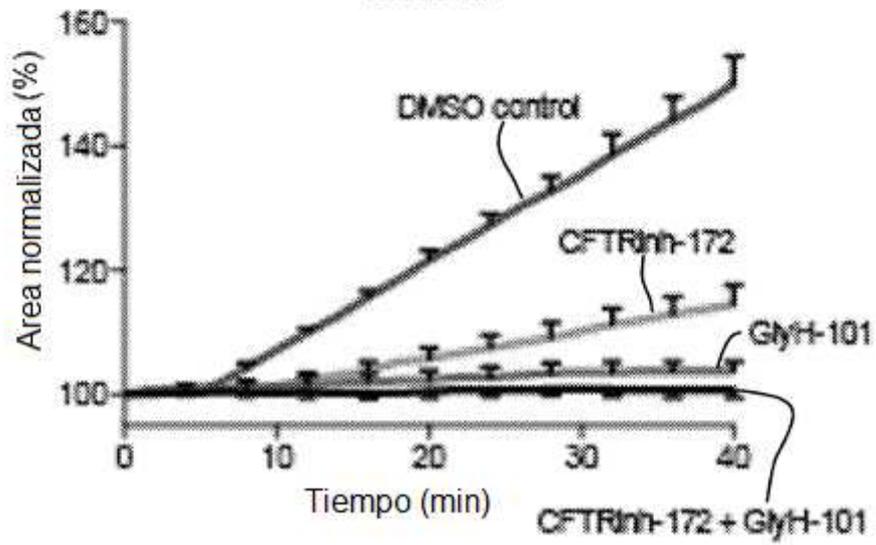


FIG. 28a

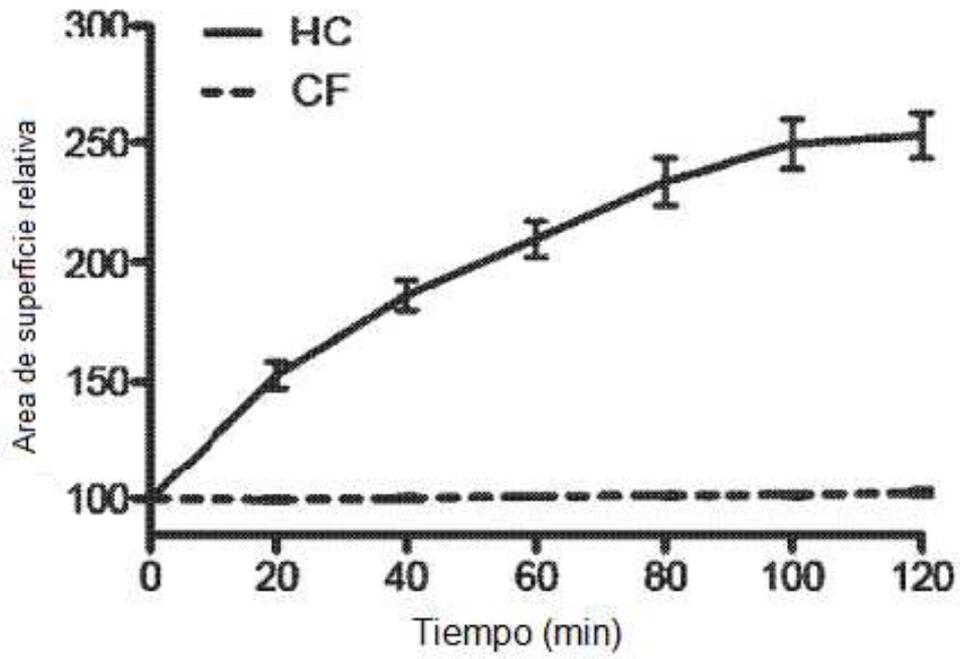


FIG. 28b

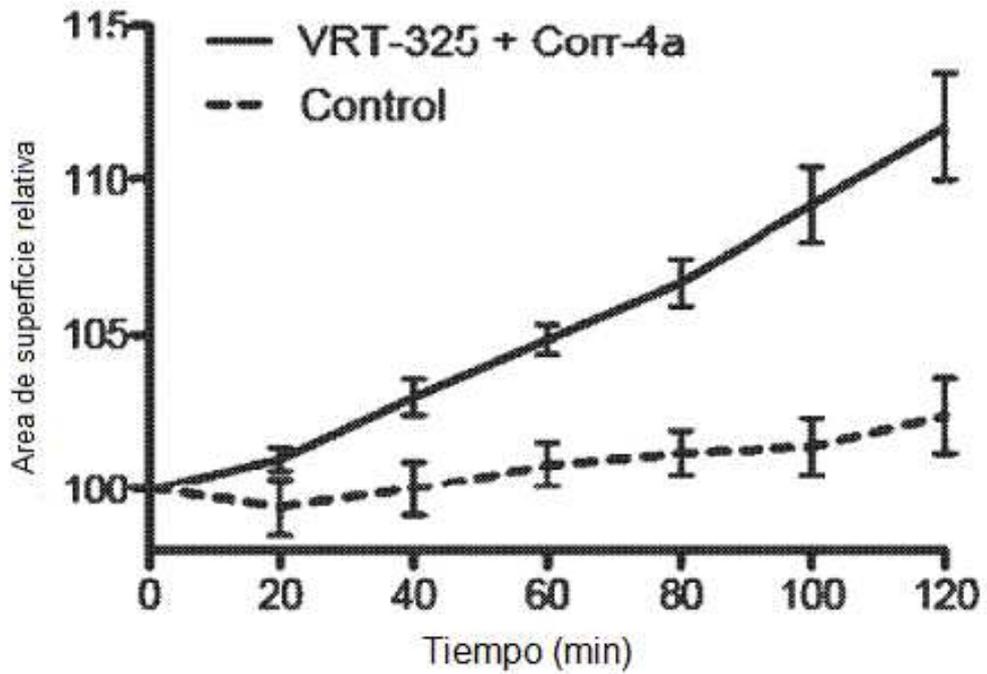


FIG. 29

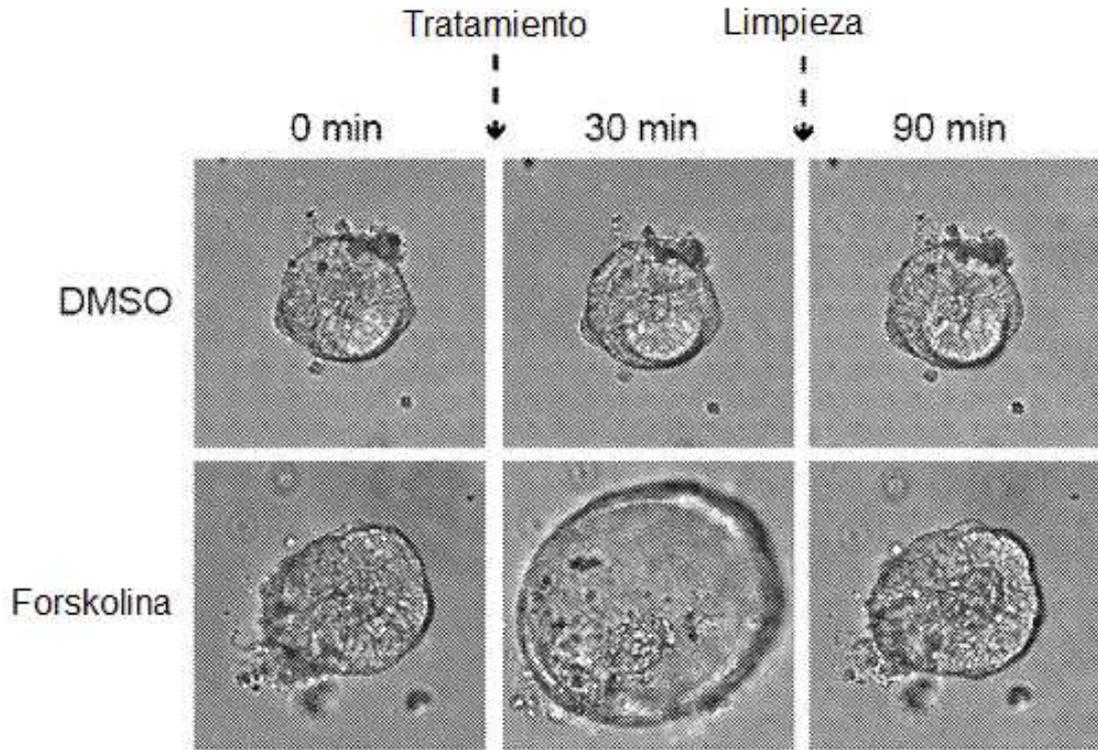


FIG. 30

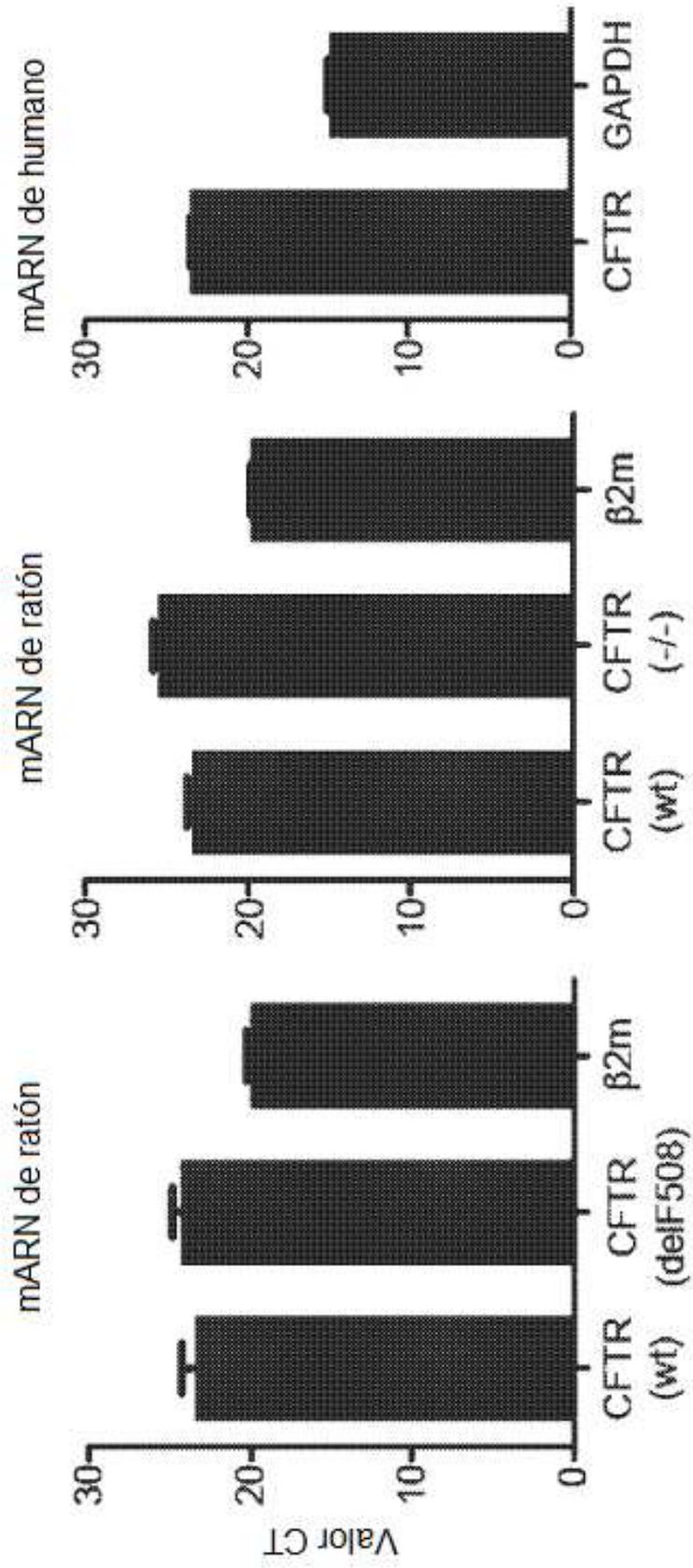


FIG. 31a

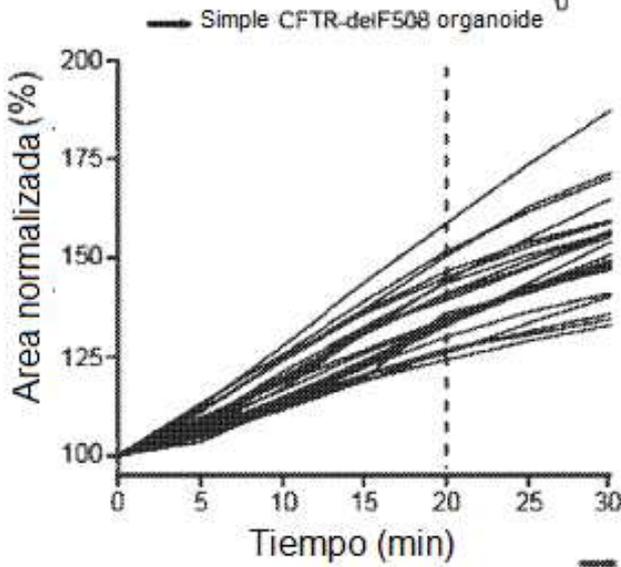
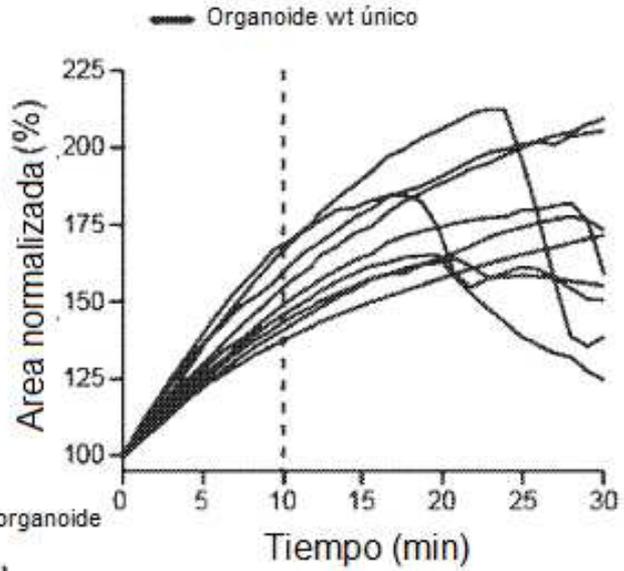


FIG. 31b

FIG. 31c

