(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 112166182 A
(43)申请公布日 2021.01.01

(21)申请号 201980035253.3
(22)申请日 2019.05.24
(30)优先权数据
62/676,582 2018.05.25 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2020.11.25
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/CA2019/050705 2019.05.24
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2019/222853 EN 2019.11.28
(71)申请人 HSJ增殖合伙人有限公司
地址 加拿大魁北克
(72)发明人 马西米利亚诺·帕加内利
克劳迪娅·拉吉
(74)专利代理机构 北京康信知识产权代理有限责任公司 11240
代理人 殷爽
(51)Int.Cl.
C12N 5/071(2010.01)
A61K 35/407(2015.01)
C12N 5/02(2006.01)
C12N 5/077(2010.01)

权利要求书5页 说明书40页 附图12页

(54)发明名称

由内胚层细胞制备肝谱系细胞群的方法以及包含所述肝谱系细胞群的细胞组合物

(57)摘要

本公开涉及用于将内胚层细胞分化成前肠后段细胞，将前肠后段细胞分化成肝祖细胞和/或将肝祖细胞分化成肝细胞样细胞的方法以及添加剂。在一些实施方案中，所述方法可在不存在血清的情况下进行。从这种方法获得的肝细胞样细胞群具有可检测的Cyp3A4活性和/或表达可检测水平的白蛋白和/或尿素。所述方法可被设计来增加细胞产率。

CN 112166182 A

1.一种由内胚层细胞制备前肠后段细胞的方法,所述方法包括在允许所述内胚层细胞分化成所述前肠后段细胞的条件下,使所述内胚层细胞与不包含胰岛素并且包含第一组添加剂的第一培养基接触,其中所述第一组添加剂不包含胰岛素并且包含以下或基本上由以下组成:

• 骨形态发生蛋白(BMP)信号传导途径的激活剂;

• 成纤维细胞生长因子(FGF)信号传导途径的激活剂;

• Wnt信号传导途径的抑制剂;和

• 转化生长因子β(TGFβ)信号传导途径的抑制剂。

2.如权利要求1所述的方法,所述方法还包括由所述前肠后段细胞制备肝祖细胞,以及由所述肝祖细胞制备肝细胞样细胞。

3.如权利要求1或2所述的方法,其中所述第一培养基包含血清。

4.如权利要求1至3中任一项所述的方法,其中所述BMP信号传导途径的激活剂是BMP受体激动剂。

5.如权利要求4所述的方法,其中所述BMP受体激动剂是BMP4。

6.如权利要求1至5中任一项所述的方法,其中所述FGF信号传导途径的激活剂是FGF受体激动剂。

7.如权利要求6所述的方法,其中所述FGF受体激动剂是碱性FGF。

8.如权利要求1至7中任一项所述的方法,其中所述Wnt信号传导途径的抑制剂能够抑制Porcupine的生物活性。

9.如权利要求8所述的方法,其中所述Wnt信号传导途径的抑制剂是IWP2。

10.如权利要求1至9中任一项所述的方法,其中所述TGFβ信号传导途径的抑制剂能够抑制ALK4、ALK5或ALK7中的至少一者的生物活性。

11.如权利要求10所述的方法,其中所述TGFβ信号传导途径的抑制剂是A83-01。

12.如权利要求1至11中任一项所述的方法,其中所述内胚层细胞表达SOX17、GATA4、FOXA2、CXCR4或EOMES中的至少一者。

13.如权利要求1至12中任一项所述的方法,其中所述内胚层细胞基本上不能表达c-Kit。

14.如权利要求1至13中任一项所述的方法,其中所述前肠后段细胞表达SOX2、FOXA1、FOXA2、HNF4a、AFP或白蛋白中的至少一者。

15.一种前肠后段细胞群,所述前肠后段细胞群能够通过或通过如权利要求1至14中任一项所述的方法获得。

16.一种用于由前肠后段细胞制备肝祖细胞的方法,所述方法包括在允许所述前肠后段细胞分化成所述肝祖细胞的条件下,使所述前肠后段细胞与包含第二组添加剂的第二培养基接触,其中所述第二组添加剂包含以下或基本上由以下组成:

• 胰岛素信号传导途径的激活剂;

• 骨形态发生蛋白(BMP)信号传导途径的激活剂;

• 成纤维细胞生长因子(FGF)信号传导途径的激活剂;

• 肝细胞生长因子(HGF)信号传导途径的激活剂;和

• Wnt信号传导途径的激活剂。

17.如权利要求16所述的方法,其中所述第二培养基包含血清。

18.如权利要求16或17所述的方法,其中所述胰岛素信号传导途径的激活剂是胰岛素受体激动剂。

19.如权利要求18所述的方法,其中所述胰岛素受体激动剂是胰岛素。

20.如权利要求16至19中任一项所述的方法,其中所述BMP信号传导途径的激活剂是BMP受体激动剂。

21.如权利要求20所述的方法,其中所述BMP受体激动剂是BMP4。

22.如权利要求16至21中任一项所述的方法,其中所述FGF信号传导途径的激活剂是FGF受体激动剂。

23.如权利要求22所述的方法,其中所述FGF受体激动剂是碱性FGF。

24.如权利要求16至23中任一项所述的方法,其中所述HGF信号传导的激活剂是HGF受体激动剂。

25.如权利要求24所述的方法,其中所述HGF受体激动剂是HGF。

26.如权利要求16至25中任一项所述的方法,其中所述Wnt信号传导途径的激活剂能够抑制GSK3的生物活性。

27.如权利要求26所述的方法,其中所述Wnt信号传导途径的激活剂是CHIR99021。

28.如权利要求16至27中任一项所述的方法,其中所述前肠后段细胞表达SOX2、FOXA1、FOXA2、HNF4a、AFP或白蛋白中的至少一者。

29.如权利要求16至28中任一项所述的方法,其中所述肝细胞祖细胞表达α-胎蛋白(AFP)、白蛋白(ALB)、细胞角蛋白7(CK7)、细胞角蛋白19(CK19)、SOX9、PDX1、PROX1、HHEX、HNF4a或上皮细胞粘附分子(EpCAM)中的至少一者。

30.一种肝细胞祖细胞群,所述肝细胞祖细胞群能够通过或通过如权利要求16至29中任一项所述的方法获得。

31.一种用于由肝祖细胞制备成熟肝细胞样细胞的方法,所述方法包括:

(i)在旨在获得肝细胞谱系细胞的条件下,使所述肝祖细胞与包含第三组添加剂的第三培养基接触,其中所述第三组添加剂包含以下或基本上由以下组成:

- 胰岛素信号传导途径的激活剂,
- 骨形态发生蛋白(BMP)信号传导途径的激活剂,
- 成纤维细胞生长因子(FGF)信号传导途径的激活剂,
- 肝细胞生长因子(HGF)信号传导途径的激活剂,
- Wnt信号传导途径的激活剂,
- 转化生长因子β(TGFβ)信号传导途径的抑制剂,
- 细胞因子,和
- 糖皮质激素;

(ii)在旨在获得未成熟肝细胞样细胞的条件下,使所述肝细胞谱系细胞与包含第四组添加剂的第四培养基接触,其中所述第四组添加剂包含以下或基本上由以下组成:

- 细胞因子,和
- 糖皮质激素;以及

(iii)在旨在获得所述成熟肝细胞样细胞的条件下,使所述未成熟肝细胞样细胞与不

包含细胞因子包含第五组添加剂的第五培养基接触，其中所述第五组添加剂不包含细胞因子并且包含糖皮质激素或基本上由糖皮质激素组成。

32.如权利要求31所述的方法，其中所述第四培养基、所述第五培养基和/或所述第六培养基包含血清。

33.如权利要求31或32所述的方法，其中所述胰岛素信号传导途径的激活剂是胰岛素受体激动剂。

34.如权利要求33所述的方法，其中所述胰岛素受体激动剂是胰岛素。

35.如权利要求31至34中任一项所述的方法，其中所述BMP信号传导途径的激活剂是BMP受体激动剂。

36.如权利要求35所述的方法，其中所述BMP受体激动剂是BMP4。

37.如权利要求31至36中任一项所述的方法，其中所述FGF信号传导途径的激活剂是FGF受体激动剂。

38.如权利要求37所述的方法，其中所述FGF受体激动剂是碱性FGF。

39.如权利要求31至38中任一项所述的方法，其中所述HGF信号传导途径的激活剂是HGF受体激动剂。

40.如权利要求39所述的方法，其中所述HGF受体激动剂是HGF。

41.如权利要求31至40中任一项所述的方法，其中所述Wnt信号传导途径的激活剂能够抑制GSK3的生物活性。

42.如权利要求41所述的方法，其中所述Wnt信号传导途径激活剂的激活剂是CHIR99021。

43.如权利要求31至42中任一项所述的方法，其中所述TGFβ信号传导途径的抑制剂能够抑制ALK4、ALK5或ALK7中的至少一者的生物活性。

44.如权利要求43所述的方法，其中所述TGFβ信号传导途径的抑制剂是A83-01。

45.如权利要求31至44中任一项所述的方法，其中所述细胞因子是制瘤素M(OSM)。

46.如权利要求31至44中任一项所述的方法，其中所述糖皮质激素是地塞米松。

47.如权利要求31至46中任一项所述的方法，其中所述肝祖细胞表达α-胎蛋白(AFP)、白蛋白(ALB)、细胞角蛋白7(CK7)、细胞角蛋白19(CK19)、SOX9、PDX1、PROX1和/或HNF4a中的至少一者。

48.如权利要求31至47中任一项所述的方法，其中所述未成熟肝细胞样细胞和/或所述成熟肝细胞样细胞表达α-胎蛋白(AFP)、白蛋白(ALB)、ASGR1、HNF4a或SOX9中的至少一者。

49.如权利要求31至48中任一项所述的方法，其中所述成熟肝细胞样细胞具有可检测的Cyp3A4活性，表达可检测水平的白蛋白和/或尿素。

50.一种肝细胞样细胞群，所述肝细胞样细胞群能够通过或通过如权利要求31至49中任一项所述的方法获得。

51.一种用于由内胚层细胞制备肝祖细胞的方法，所述方法包括以下或基本上由以下组成：

(a)执行如权利要求1至14中任一项所述的方法以获得前肠后段细胞，或提供如权利要求15所述的前肠后段细胞群；以及

(b)使所述前肠后段细胞经受如权利要求16至29中任一项所述的方法以获得所述肝祖

细胞。

52.一种肝祖细胞群,所述肝祖细胞群能够通过或通过如权利要求51所述的方法获得。

53.一种用于由肝细胞祖细胞制备肝细胞样细胞的方法,所述方法包括以下或基本上由以下组成:

(a)执行如权利要求16至29中任一项所述的方法以获得肝祖细胞,或提供如权利要求30所述的肝祖细胞群;以及

(b)使所述肝祖细胞经受如权利要求31至49中任一项所限定的方法以获得所述肝细胞样细胞。

54.一种肝细胞样细胞群,所述肝细胞样细胞群能够通过或通过如权利要求53所述的方法获得。

55.一种用于由内胚层细胞制备肝细胞样细胞的方法,所述方法包括以下或基本上由以下组成:

(a)任选地执行如权利要求1至14中任一项所述的方法以获得前肠后段细胞,或任选地提供如权利要求15所述的前肠后段细胞群;

(b)使所述前肠后段细胞经受如权利要求16至29中任一项所述的方法以获得所述肝祖细胞,或提供如权利要求30所述的肝祖细胞群;以及

(c)使所述肝祖细胞经受如权利要求31至49中任一项所述的方法以获得所述肝细胞样细胞。

56.一种肝细胞样细胞群,所述肝细胞样细胞群能够通过或通过如权利要求55所述的方法获得。

57.一种用于制备包封的肝组织的方法,所述方法包括:

(a)提供如权利要求54或56所述的肝细胞样细胞群;

(b)将所述肝细胞样细胞、间充质细胞和任选的内皮细胞组合并在悬浮液中培养以获得至少一个肝类器官,所述至少一个肝类器官(i)包含含有间充质细胞和任选的内皮细胞的细胞核心,其中所述细胞核心至少部分地被肝细胞样细胞和/或胆管上皮细胞覆盖,(ii)具有球形形状,并且(iii)具有介于约50与约500μm之间的相对直径;以及

(c)用第一生物相容性交联聚合物至少部分地覆盖所述至少一个肝类器官。

58.如权利要求57所述的方法,其中将所述内胚层细胞和所述肝细胞样细胞在培养之前以1:0.2-7的比例组合。

59.如权利要求57或58所述的方法,其中将所述内胚层细胞和所述内皮细胞在培养之前以1:0.2-1的比例组合。

60.如权利要求57至59中任一项所述的方法,其中通过分化干细胞获得所述肝细胞样细胞、所述内胚层细胞和所述内皮细胞中的至少一者。

61.如权利要求60所述的方法,其中所述干细胞是多能干细胞。

62.如权利要求57至61中任一项所述的方法,其中所述内皮细胞是内皮祖细胞。

63.如权利要求57至62中任一项所述的方法,所述方法包括用所述第一生物相容性交联聚合物基本上覆盖所述至少一个肝类器官。

64.如权利要求57至63中任一项所述的方法,其中所述第一生物相容性交联聚合物包括聚(乙)二醇(PEG)。

65.如权利要求57至64中任一项所述的方法，所述方法还包括用第二生物相容性交联聚合物至少部分地覆盖所述第一生物相容性交联聚合物。

66.如权利要求65所述的方法，所述方法还包括用所述第二生物相容性交联聚合物基本上覆盖所述第一生物相容性交联聚合物。

67.如权利要求57至66中任一项所述的方法，其中所述第一生物相容性交联聚合物是至少部分可生物降解的。

68.如权利要求57至67中任一项所述的方法，其中所述第二生物相容性交联聚合物至少部分地抗生物降解。

69.如权利要求65至68中任一项所述的方法，其中所述第二生物相容性交联聚合物包括聚(乙)二醇(PEG)。

70.一种包封的肝组织，所述包封的肝组织能够通过或通过如权利要求57至69中任一项所述的方法获得。

71.一种第一组添加剂，所述第一组添加剂如权利要求1至14中任一项所限定。

72.一种第一培养基，所述第一培养基包含如权利要求71所述的第一组添加剂并且不包含所述胰岛素信号传导途径的激活剂。

73.如权利要求72所述的第一培养基，所述第一培养基还包含内胚层细胞。

74.如权利要求72或73所述的第一培养基，所述第一培养基还包含前肠后段细胞。

75.一种第二组添加剂，所述第二组添加剂如权利要求16至29中任一项所限定。

76.一种第二培养基，所述第二培养基包含如权利要求75所限定的第二组添加剂。

77.如权利要求76所述的第二培养基，所述第二培养基包含前肠后段细胞。

78.如权利要求76或77所述的第二培养基，所述第二培养基还包含肝祖细胞。

79.一种第三组添加剂，所述第三组添加剂如权利要求31至49中任一项所限定。

80.一种第三培养基，所述第三培养基包含如权利要求79所限定的第三组添加剂。

81.一种第四组添加剂，所述第四组添加剂如权利要求31至49中任一项所限定。

82.一种第四培养基，所述第四培养基包含如权利要求81所限定的第四组添加剂。

83.一种第五组添加剂，所述第五组添加剂如权利要求31至49中任一项所限定。

84.一种第五培养基，所述第五培养基包含如权利要求83所限定的第五组添加剂并且不包含细胞因子。

85.一种用于制备前肠后段细胞、肝祖细胞或肝细胞样细胞的试剂盒，所述试剂盒包括：

- 如权利要求71、75、77、81或83中任一项所述的至少一组添加剂；和/或
- 如权利要求72、76、80、82或84中任一项所述的至少一种培养基；和
- 用于制备前肠后段细胞、肝祖细胞或肝细胞样细胞的说明书。

86.如权利要求85所述的试剂盒，所述试剂盒还包括：

- 内胚层细胞，
- 前肠后段细胞，和/或
- 肝祖细胞。

由内胚层细胞制备肝谱系细胞群的方法以及包含所述肝谱系细胞群的细胞组合物

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2018年5月25日提交的美国临时申请序列号62/676582的优先权，并且同此以引用方式整体并入本文。

背景技术

[0003] 已经证明难以以高产率获得活的和功能性的肝细胞样细胞，当此类细胞是通过分化多能干细胞诸如诱导型多能干细胞而获得时尤其如此。还已经证明难以以可再现的方式获得均质的细胞群。

[0004] 因此，需要提供表现出生物活性，特别是能够代谢分子诸如治疗剂和/或潜在治疗剂的肝细胞谱系的细胞。

发明内容

[0005] 本公开涉及用于通过在培养期间提供或排除特定添加剂而将多能细胞分化成活的和功能性的肝细胞样细胞的方法。所述方法还用于将多能细胞分化成内胚层谱系，而不有助于并且在一些实施方案中允许将多能细胞(或所得的分化的细胞)分化成中胚层谱系。所述方法包括为了有助于向内胚层分化，激活Wnt途径(以允许Nodal表达)和TGFβ途径。内胚层前后构型的初始转变是以定形内胚层后端处的Wnt、FGF和BMP信号传导的组合开始的。前内胚层中Wnt途径的最初抑制加上TGFβ途径的抑制以及FGF和BMP信号传导的使用允许Hex的表达(这是肝脏(和胰腺)发育所需的)。Wnt信号传导的最初抑制后，紧接着的是相同途径的激活以便于肝脏生长。来自肝间充质细胞和内皮细胞的持续的信号传导(包括FGF、BMP、Wnt和HGF途径)促进分化。为了熟化成肝细胞样细胞，细胞因子、糖皮质激素、HGF和Wnt是有益的。细胞因子(如OSM)诱导形态成熟为极化的上皮。

[0006] 在第一方面，本公开提供了一种由内胚层细胞制备前肠后段细胞的方法。所述方法包括在允许所述内胚层细胞分化成所述前肠后段细胞的条件下，使所述内胚层细胞与不包含胰岛素并且包含第一组添加剂的第一培养基接触。所述第一组添加剂不包括胰岛素，并且包含以下或基本上由以下组成：骨形态发生蛋白(BMP)信号传导途径的激活剂；成纤维细胞生长因子(FGF)信号传导途径的激活剂；Wnt信号传导途径的抑制剂；和转化生长因子β(TGFβ)信号传导途径的抑制剂。在一个实施方案中，所述第一培养基包含血清。在另一个实施方案中，所述BMP信号传导途径的激活剂是BMP受体激动剂，例如BMP4。在另一个实施方案中，所述FGF信号传导途径的激活剂是FGF受体激动剂，例如碱性FGF。在另一个实施方案中，所述Wnt信号传导途径的抑制剂能够抑制Porcupine的生物活性，例如IWP2。在又一个实施方案中，所述TGFβ信号传导途径的抑制剂能够抑制ALK4、ALK5或ALK7中的至少一者的生物活性，例如A83-01。在一个实施方案中，所述内胚层细胞表达SOX17、GATA4、FOXA2、CXCR4或EOMES中的至少一者和/或基本上不能表达c-Kit。如在本公开的上下文中所使用的，当少于3％的细胞对c-Kit标记物呈阳性时，前肠后段细胞的细胞群“基本上不能表达c-Kit”。因

此,源自肠后段细胞的细胞由于其内胚层起源也基本上不能表达c-Kit。在另一个实施方案中,所述前肠后段细胞表达SOX2、FOXA1、FOXA2、HNF4a、AFP或白蛋白中的至少一者。本公开还提供了一种前肠后段细胞群,所述前肠后段细胞群能够通过或通过本文所描述的方法获得。

[0007] 在第二方面,本公开提供了一种用于由前肠后段细胞制备肝祖细胞的方法。所述方法包括在允许所述前肠后段细胞分化成所述肝祖细胞的条件下,使所述前肠后段细胞与包含第二组添加剂的第二培养基接触,其中所述第二组添加剂包含以下或基本上由以下组成:胰岛素信号传导途径的激活剂;骨形态发生蛋白(BMP)信号传导途径的激活剂;成纤维细胞生长因子(FGF)信号传导途径的激活剂;肝细胞生长因子(HGF)信号传导途径的激活剂;和Wnt信号传导途径的激活剂。在一个实施方案中,所述第二培养基包含血清。在另一个实施方案中,所述胰岛素信号传导途径的激活剂是胰岛素受体激动剂,例如胰岛素。在另一个实施方案中,所述BMP信号传导途径的激活剂是BMP受体激动剂,例如BMP4。在另一个实施方案中,所述FGF信号传导途径的激活剂是FGF受体激动剂,例如碱性FGF。在又一个实施方案中,所述HGF信号传导的激活剂是HGF受体激动剂,例如HGF。在又一个实施方案中,所述Wnt信号传导途径的激活剂能够抑制GSK3的生物活性,例如CHIR99021。在一个实施方案中,所述前肠后段细胞表达SOX2、FOXA1、FOXA2、HNF4a、AFP或白蛋白中的至少一者。在另一个实施方案中,所述肝细胞祖细胞表达α-胎蛋白(AFP)、白蛋白(ALB)、细胞角蛋白7(CK7)、细胞角蛋白19(CK19)、SOX9、PDX1、PROX1或HNF4a中的至少一者。本公开还提供了一种肝细胞祖细胞群,所述肝细胞祖细胞群能够通过或通过本文所描述的方法获得。

[0008] 根据第三方面,本公开提供了一种用于由肝祖细胞制备肝细胞样细胞的方法。所述方法包括(i)在旨在获得肝细胞谱系细胞的条件下,使所述肝祖细胞与包含第三组添加剂的第三培养基接触,(ii)在旨在获得未成熟肝细胞样细胞的条件下,使所述肝细胞谱系细胞与包含第四组添加剂的第四培养基接触,以及(iii)在旨在获得成熟肝细胞样细胞的条件下,使所述未成熟肝细胞样细胞与不包含细胞因子包含第五组添加剂的第五培养基接触。所述第三组添加剂包含以下或基本上由以下组成:胰岛素信号传导途径的激活剂;骨形态发生蛋白(BMP)信号传导途径的激活剂;成纤维细胞生长因子(FGF)信号传导途径的激活剂;肝细胞生长因子(HGF)信号传导途径的激活剂;Wnt信号传导途径的激活剂;转化生长因子β(TGFβ)信号传导途径的抑制剂;细胞因子和糖皮质激素。所述第四组添加剂包含细胞因子和糖皮质激素或基本上由细胞因子和糖皮质激素组成。所述第五组添加剂不包含细胞因子并且包含糖皮质激素或基本上由糖皮质激素组成。在一个实施方案中,所述第四培养基、所述第五培养基和/或所述第六培养基包含血清。在另一个实施方案中,所述胰岛素信号传导途径的激活剂是胰岛素受体激动剂,例如胰岛素。在另一个实施方案中,所述BMP信号传导途径的激活剂是BMP受体激动剂,例如BMP4。在又一个实施方案中,所述FGF信号传导途径的激活剂是FGF受体激动剂,例如碱性FGF。在又一个实施方案中,所述HGF信号传导途径的激活剂是HGF受体激动剂,例如HGF。在又一个实施方案中,所述Wnt信号传导途径的激活剂能够抑制GSK3的生物活性,例如CHIR99021。在又一个实施方案中,所述TGFβ信号传导途径的抑制剂能够抑制ALK4、ALK5或ALK7中的至少一者的生物活性,例如A83-01。在另一个实施方案中,所述细胞因子是制瘤素M(OSM)。在另一个实施方案中,所述糖皮质激素是地塞米松。在又一个实施方案中,所述肝祖细胞表达α-胎蛋白(AFP)、白蛋白(ALB)、细胞角蛋白7

(CK7)、细胞角蛋白19(CK19)、SOX9、PDX1、PROX1或HNF4a中的至少一者。在又一个实施方案中，所述未成熟肝细胞样细胞和/或所述成熟肝细胞样细胞表达α-胎蛋白(AFP)、白蛋白(ALB)、ASGR1、HNF4a或SOX9中的至少一者。在一个实施方案中，所述成熟肝细胞样细胞具有可检测的Cyp3A4活性，表达可检测水平的白蛋白和/或尿素。本公开还提供了一种肝细胞样细胞群，所述肝细胞样细胞群能够通过或通过本文所描述的方法获得。

[0009] 根据第四方面，本公开提供了一种用于由内胚层细胞制备肝祖细胞的方法。所述方法包括以下或基本上由以下组成：(a)执行本文所描述的方法以获得前肠后段细胞，或提供本文所描述的前肠后段细胞群；以及(b)使所述前肠后段细胞经受本文所描述的方法以获得所述肝祖细胞。本公开还提供了一种肝祖细胞群，所述肝祖细胞群能够通过或通过本文所描述的方法获得。

[0010] 根据第五方面，本公开提供了一种用于由肝祖细胞制备肝细胞样细胞的方法。所述方法包括以下或基本上由以下组成：(a)执行本文所描述的方法以获得肝祖细胞，或提供本文所描述的肝祖细胞群；以及(b)使所述肝祖细胞经受本文所描述的方法以获得所述肝细胞样细胞。所述方法还提供了一种肝细胞样细胞群，所述肝细胞样细胞群能够通过或通过本文所描述的方法获得。

[0011] 根据第六方面，本公开提供了一种用于由内胚层细胞制备肝细胞样细胞的方法。所述方法包括以下或基本上由以下组成：(a)任选地执行本文所描述的方法以获得前肠后段细胞，或任选地提供本文所描述的前肠后段细胞群；(b)使所述前肠后段细胞经受本文所描述的方法以获得所述肝祖细胞，或提供本文所描述的肝祖细胞群；以及(c)使所述肝祖细胞经受本文所描述的方法以获得所述肝细胞样细胞。所述方法还提供了一种肝细胞样细胞群，所述肝细胞样细胞群能够通过或通过本文所描述的方法获得。

[0012] 根据第七方面，本公开提供了一种用于制备包封的肝组织的方法。所述方法包括(a)提供本文所描述的肝细胞样细胞群；(b)将所述肝细胞、间充质细胞和任选的内皮细胞组合并在悬浮液中培养以获得至少一个肝类器官，所述至少一个肝类器官(i)包含含有间充质细胞和任选的内皮细胞的细胞核心，其中所述细胞核心至少部分地被肝细胞样细胞和/或胆管上皮细胞覆盖，(ii)具有球形形状，并且(iii)具有介于约50与约500μm之间的相对直径；以及(c)用第一生物相容性交联聚合物至少部分地覆盖所述至少一个肝类器官。在一个实施方案中，将所述内胚层细胞和所述肝细胞样细胞在培养之前以1:0.2-7的比例组合。在另一个实施方案中，将所述肝细胞和所述内皮细胞在培养之前以1:0.2-1的比例组合。在又一个实施方案中，通过分化多能细胞诸如多能干细胞获得所述肝细胞、所述内胚层细胞和所述内皮细胞中的至少一者。在一个实施方案中，所述内皮细胞是内皮祖细胞。在另一个实施方案中，所述方法包括用所述第一生物相容性交联聚合物基本上覆盖所述至少一个肝类器官，例如像交联聚合物包括聚(乙)二醇(PEG)。在另一个实施方案中，所述方法还包括用第二生物相容性交联聚合物至少部分地覆盖，并且在一些实施方案中基本上覆盖所述第一生物相容性交联聚合物。在一个实施方案中，所述第一生物相容性交联聚合物和/或所述第二生物相容性交联聚合物是至少部分可生物降解的。在又一个实施方案中，所述第二生物相容性交联聚合物包括聚(乙)二醇(PEG)。本公开还提供了一种包封的肝组织，所述包封的肝组织能够通过本文所描述的方法获得。

[0013] 根据第八方面，本公开提供了添加剂组以及包含所述添加剂组的培养基。在一个

实施方案中，本公开提供了本文所描述的第一组添加剂以及包含第一组添加剂并且不包含所述胰岛素信号传导途径的激活剂的第一培养基。在一个实施方案中，所述第一培养基还包含内胚层细胞和/或前肠后段细胞。在另一个实施方案中，本公开提供了如本文所描述的第二组添加剂以及包含第二组添加剂的第二培养基。在一个实施方案中，所述第二培养基包含前肠后段细胞和/或肝祖细胞。在又一个实施方案中，本公开提供了如本文所描述的第三组添加剂以及包含第三组添加剂的第三培养基。在又一个实施方案中，本公开提供了本文所描述的第四组添加剂以及包含第四组添加剂的第四培养基。在又一个实施方案中，本公开提供了本文所描述的第五组添加剂以及包含第五组添加剂不包含细胞因子的第五培养基。本公开还提供了一种用于制备前肠后段细胞、肝祖细胞或肝细胞样细胞的试剂盒。所述试剂盒包括至少一组本文所描述的添加剂和/或至少一种本文所描述的培养基；以及用于制备前肠后段细胞、肝祖细胞或肝细胞样细胞(例如用以执行本文所描述的方法)的说明书。在一些实施方案中，所述试剂盒还包括内胚层细胞、前肠后段细胞和/或肝祖细胞。

附图说明

[0014] 已由此总体上描述了本发明的性质，现将参考通过说明方式显示本发明的优选实施方案的附图，并且在附图中：

[0015] 图1A和图1B示出内胚层特异性基因的表达。(图1A)如通过RT-qPCR测量的当与未分化的iPSC(iPSC-浅灰色条)相比时，iPSC来源的内胚层细胞(DE-深灰色条)中内胚层特异性基因(FOXA2、SOX17、CXCR4、EOMES、GATA4)的上调。结果显示为所测试的各种基因中的对数倍数变化。数据是平均值±s.d。对于DE，N＝6；对于iPSC，N＝3。*P<0.05，**p<0.01。(图1B)通过RT-qPCR对iPSC分化成内胚层期间内胚层特异性基因(EOMES、FOXA2、SOX17)表达的时程分析。结果显示为所测试的各种基因中的对数倍数变化(在X轴上标识)。数据是平均值±s.d。对于所有时间点，N＝3，**p<0.01，***p<0.001，****p<0.0001。

[0016] 图2提供针对FoxA2、Cxcr4、Sox17、Brachyury和c-Kit标记物，对iPSC来源的内胚层细胞的代表性流式细胞术分析。超过85％的细胞对FoxA2、Cxcr4和Sox17呈三阳性；90％的细胞对brachyury呈阳性；不到1％的细胞对c-Kit呈阳性，表明不存在中胚层细胞。数据是平均值±s.d。n＝4。

[0017] 图3提供iPSC来源的内胚层细胞(底行)和未分化的iPSC(顶行)中内胚层标记物Sox17、FoxA2和Cxcr4的代表性免疫荧光分析。插图显示核(DAPI)染色(比例尺200μm)。

[0018] 图4显示iPSC来源的腹侧前肠后段细胞(其产生肝祖细胞)中前肠后段特异性基因的表达增加。结果显示为iPSC来源的内胚层细胞(DE-深灰色条)和iPSC来源的前肠后段细胞(PFG-浅灰色条)中这些基因(FOXA2、SOX2、FOXA1、HNF4α、AFP和白蛋白(ALB))的mRNA表达的倍数变化。数据是平均值±s.d。对于DE，n＝3；对于PFG，n＝6，*p<0.05，**p<0.01，***p<0.001。

[0019] 图5A至图5D示出如通过免疫荧光测定的iPSC来源的肝祖细胞中肝特异性标记物(图5A AFP，图5B白蛋白，图5C CK19和CK7，图5D EpCAM)的表达(比例尺200μM)。

[0020] 图6提供与未分化的iPSC(iPSC-白色条)相比，iPSC来源的肝祖细胞(HB-灰色条)的多能性标记物TRA1-60和Nanog的代表性流式细胞术分析。数据是平均值±s.d。n＝3。

[0021] 图7显示如通过RT-qPCR测定的与iPSC来源的前肠后段细胞(PFG-浅灰色条)相比，

iPSC来源的肝祖细胞(HB-黑色条)中成肝细胞和肝细胞特异性基因(白蛋白(ALB)、AFP、CK19、CK7、PDX1、SOX9、PROX1、HNF4α、HHEX)的表达。结果显示为所测试的各种基因中的对数倍数变化(在X轴上标识)。数据是平均值±s.d。对于HB,n=8;对于PFG,n=3,**p<0.01。

[0022] 图8显示iPSC分化成肝祖细胞期间细胞增殖的时程,显示细胞产率的显著增加。数据是平均值±s.d。对于未分化的iPSC(iPSC),n=6;对于iPSC来源的内胚层细胞(DE),n=3;对于iPSC来源的肝祖细胞(HB),n=6。**p<0.01。

[0023] 图9A和图9B示出iPSC来源的肝细胞样细胞的特征。(图9A)如通过光学显微术测定的在第28天时iPSC来源的肝细胞样细胞(HLC)的代表性方面(比例尺:顶行为1000μm,底行为200μm)。(图9B)如通过免疫荧光测定的iPSC来源的肝样细胞中肝特异性标记物(图9B1 AFP,图9B2白蛋白,图9B3和图9B4 CK19)的表达(比例尺:顶行和左底行为200μm,右底行为100μm)。

[0024] 图10A和图10B提供(图10A)代表性流式细胞术的结果和(图10B)表达白蛋白的iPSC来源的肝细胞样细胞(HLC)的相关分析,显示出白蛋白表达的高度均一性(98.5%的门控细胞)。数据是平均值±s.d,n=4。

[0025] 图11提供如通过RT-qPCR测定的与新鲜分离的胎肝细胞(FPHH-浅灰色条)相比,iPSC来源的肝细胞样细胞(HLC-深灰色条)中肝特异性基因(HNF4α、AFP、白蛋白(ALB)、SOX9、ASGPR)的表达。结果显示为所测试的各种基因中的对数倍数变化(在X轴上标识)。数据是平均值±s.d。对于FPHH,n=6;对于HLC,N=10,**p<0.01;ns=不显著。

[0026] 图12A至图12C显示原代人肝细胞(PHH)、人肝癌细胞系(HepG2)、未分化的iPSC(iPSC)、iPSC来源的内胚层细胞(DE)、iPSC来源的腹侧前肠后段细胞(PFG)、iPSC来源的肝祖细胞(HB)和iPSC来源的肝细胞样细胞(HLC)的肝特异性功能。(图12A)CyP3A4活性的比较。结果显示为活性(RLU/1x10^6个细胞)与所测试条件的函数关系。数据是平均值±s.d,对于PHH,n=10;对于HepG2和iPSC,n=3;对于HLC,N=6,*p<0.05。(图12B)白蛋白合成的比较。数据是平均值±s.d,对于iPSC、DE、PFG和HB,n=3;对于HLC,n=6;对于PHH,n=10;**p<0.01。(图12C)尿素的比较。数据是平均值±s.d,对于HepG2,n=3;对于HLC,n=6;对于PHH,n=10。

[0027] 图13提供如通过RT-qPCR测定的与通过标准分化方案获得的iPSC来源的肝细胞样细胞(HLC-A,黑色条)相比,iPSC来源的肝细胞样细胞(HLC-B,灰色条)中肝特异性基因(HNF4α、AFP、白蛋白(ALB)、ASGR1、TAT)的表达。结果显示为所测试的各种基因中的对数倍数变化(在X轴上标识)。数据是平均值±s.d,对于HLC-A,n=8;对于HLC-B,n=4,*p<0.05,***p<0.001,****p<0.0001。

[0028] 图14A至图14C比较了iPSC来源的肝细胞样细胞(HLC-A,黑色条)、iPSC来源的肝细胞样细胞(HLC-B,灰色条)的特征。(图14A)CyP3A4活性的比较。结果显示为活性(RLU/1x10^6个细胞)与所测试条件的函数关系。数据是平均值±s.d,对于HLC-A,N=4;对于HLC-B,N=6,**p<0.01。(图14B)白蛋白合成的比较。数据是平均值(μg/1x10^6个细胞/24h)±s.d,对于HLC-A,N=4;对于HLC-B,N=6,**p<0.01。(图14C)分化结束时的细胞产率:与方法开始时未分化的iPSC数量(白色条)相比,使用新的分化方案(浅灰色条)观察到细胞数量显著增加,而使用标准分化方案(黑色条)则观察到细胞数量减少。数据是平均值±s.d,对于HLC-A,n=3;对于HLC-B,n=4,*p<0.05。

[0029] 图15提供通过Seahorse对耗氧率(OCR)的测量结果,以评估iPSC来源的肝细胞样细胞(HLC)在基线时(浅灰色条)以及不同剂量的胺碘酮(2、4、8、16μM-深灰色条)和对乙酰氨基酚(2、4、8mM-黑色条)后线粒体功能的关键参数。数据是平均值±s.d,n=6。*p<0.05,**p<0.01,***p<0.001,****p<0.0001。

具体实施方式

[0030] 用于制备细胞的方法和包含所述细胞的组合物

[0031] 根据本发明,提供了一种将内胚层细胞分化成有能力的肝谱系细胞(例如,前肠后段细胞、肝祖细胞和/或肝细胞)的方法。肝谱系细胞可以是能够分化成肝细胞或成为肝细胞的细胞。本公开的方法是有利的,因为在一些实施方案中,这些方法允许产生更多和/或更具生物学效力的肝谱系细胞。

[0032] 在一个实施方案中,所述方法可用于由内胚层细胞制备各种细胞群。如在本公开中所使用的,“内胚层细胞”是指具有来自内胚层的细胞的特征的细胞。如胚胎学领域所知,内胚层是三个原胚层的最内层。内胚层的细胞通常是扁平的,注定会产生大多数胃肠道细胞、呼吸道细胞、肝脏细胞、胰腺细胞、内分泌细胞和泌尿细胞。本领域技术人员可使用本领域已知的各种技术来鉴定内胚层细胞。例如,内胚层细胞可通过确定以下基因中的至少一者或任何组合的存在或不存在以及表达水平来鉴定:SOX17、GATA4、FOXA2、CXCRA和/或EOMES或它们编码的多肽。在一个特定实施方案中,内胚层细胞表达以下基因中的至少两者或任何组合:SOX17、GATA4、FOXA2、CXCRA和/或EOMES或它们编码的多肽。在又一个实施方案中,内胚层细胞可通过检测以及任选地测量以下基因中的至少三者或任何组合的表达来鉴定:SOX17、GATA4、FOXA2、CXCRA和/或EOMES或它们编码的多肽。在又一个实施方案中,内胚层细胞表达以下基因中的至少四者或任何组合并且可通过检测以及任选地测量以下基因中的至少三者或任何组合的表达来鉴定:SOX17、GATA4、FOXA2、CXCRA和/或EOMES。在又一个实施方案中,内胚层细胞表达以下基因(或其相关多肽)并且可通过检测以及任选地测量以下基因(或其相关多肽)的表达来鉴定:SOX17、GATA4、FOXA2、CXCRA和EOMES。在一些实施方案中,内胚层细胞表达以下基因或它们编码的多肽并且可通过比较以下基因或它们编码的多肽的表达水平与相同基因/多肽在(未分化)干细胞中的表达水平来鉴定:SOX2、SOX17、GATA4、FOXA2、CXCRA和EOMES。在具体实施方案中,当与未分化的多能(干)细胞中的相应水平相比时,内胚层细胞表达更多的SOX17、GATA4、FOXA2、CXCR4和/或EOMES基因或它们编码的多肽。

[0033] 内胚层细胞可具有任何起源,尤其可源自哺乳动物,并且在一些实施方案中源自人。

[0034] 内胚层细胞可从已经分化成内胚层细胞的多能细胞(例如胚胎或多能干细胞)获得。在一些实施方案中,可通过分化诱导型多能干细胞(iPSC)获得内胚层细胞。多能干细胞可具有任何起源,尤其可源自哺乳动物,并且在一些实施方案中源自人。在一些实施方案中,为了将多能(干)细胞分化成内胚层细胞,可使多能(干)细胞与能够激活Nodal/激活素信号传导途径的化合物例如Nodal/激活素受体激动剂诸如激活素A接触。在一些另外的实施方案中,还可使多能(干)细胞与Wnt信号传导途径的激活剂例如Wnt受体激动剂或能够抑制GSK3的生物活性的化合物例如像CHIR99021接触。

[0035] 可使多能(干)细胞在分化成内胚层细胞之前与APELA/ELABELA信号传导途径的一种或多种激活剂,例如APELA/ELABELA受体的激动剂,诸如APELA/ELABELA多肽或用于诱导、优化和维持其自我更新和/或多能性的功能片段(诸如美国专利序列号9,309,314中描述的那些)接触。

[0036] 本公开提供了由内胚层细胞制备前肠后段细胞的第一方法。所述方法包括在一定条件下使一个或多个内胚层细胞与包含第一组添加剂的第一培养基接触,以便允许内胚层细胞分化成前肠后段细胞。第一方法不包括使培养的细胞与胰岛素信号传导途径的激活剂例如像胰岛素接触。如在本公开中所使用的,“前肠后段细胞”是指具有前肠后段的细胞的生物学特征的细胞。如在胚胎学领域中已知的,前肠后段是内胚层的后续由其形成肝脏的区域。因此,前肠后段的细胞能够进一步分化成肝脏、胰腺、胃和部分小肠。本领域技术人员可使用本领域已知的各种技术来鉴定前肠后段细胞。例如,前肠后段细胞可通过确定以下基因中的至少一者或任何组合的存在或不存在以及表达水平来鉴定:SOX2、FOXA1、FOXA2、HNF4a、AFP和/或白蛋白或它们编码的多肽。在一个具体实施方案中,前肠后段细胞表达以下基因中的至少两者或任何组合:SOX2、FOXA1、FOXA2、HNF4a、AFP和/或白蛋白或它们编码的多肽。在又一个实施方案中,前肠后段细胞表达以下基因中的至少三者或任何组合:SOX2、FOXA1、FOXA2、HNF4a、AFP和/或白蛋白或它们编码的多肽。在又一个实施方案中,前肠后段细胞表达以下基因中的至少四者或任何组合:SOX2、FOXA1、FOXA2、HNF4a、AFP和/或白蛋白或它们编码的多肽。在又一个实施方案中,前肠后段细胞表达以下基因中的至少五者或任何组合:SOX2、FOXA1、FOXA2、HNF4a、AFP和/或白蛋白或它们编码的多肽。在又一个实施方案中,前肠后段细胞表达以下基因:SOX2、FOXA1、FOXA2、HNF4a、AFP和白蛋白或它们编码的多肽。在又一个实施方案中,前肠后段细胞表达以下基因(或其相应多肽)并且可通过检测以及任选地测量以下基因(或其相应多肽)的表达来鉴定:SOX2、FOXA1、FOXA2、HNF4a、AFP和/或白蛋白。在一些实施方案中,前肠后段细胞表达以下基因或它们编码的多肽并且可通过比较以下基因或它们编码的多肽的表达水平与相同基因/多肽在(未分化)多能(干)细胞或内胚层细胞中的表达水平来鉴定:SOX2、FOXA1、FOXA2、HNF4a、AFP和/或白蛋白。在具体实施方案中,当与多能(干)细胞或内胚层细胞中的相应水平相比时,前肠后段细胞表达更多的SOX2、FOXA1、FOXA2、HNF4a、AFP和/或白蛋白基因或它们编码的多肽。在另外的实施方案中,当与内胚层细胞中的相应水平相比时,前肠后段细胞表达更高水平的SOX2基因或其编码的多肽。在另一个实施方案中,当与内胚层细胞中的相应水平相比时,前肠后段细胞表达更多的FOXA1基因或其编码的多肽。在另一个实施方案中,当与内胚层细胞中的相应水平相比时,前肠后段细胞表达更多的FOXA2基因或其编码的多肽。在另一个实施方案中,当与内胚层细胞中的相应水平相比时,前肠后段细胞表达更多的HNF4a基因或其编码的多肽。在另一个实施方案中,当与内胚层细胞中的相应水平相比时,前肠后段细胞表达更多的AFP基因或其编码的多肽。在另一个实施方案中,当与内胚层细胞中的相应水平相比时,前肠后段细胞表达更多的ALB基因或白蛋白其编码的多肽。

[0037] 前肠后段细胞可具有任何起源,尤其可源自哺乳动物,并且在一些实施方案中源自人。

[0038] 在第一方法中使用的第一培养基可以是无血清的(例如,未补充血清)。在替代实施方案中,在第一方法中使用的第一培养基可包含血清,其可以是KnockOut Serum

Replacement™(ThermoFisher Scientific)。在一个实施方案中,第一培养基包含介于约0.1%与约5%(v/v)之间的血清。在又一个实施方案中,第一培养基包含至少约0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.6%、0.7%、0.8%、0.9%、1%、1.5%、2%、2.5%、3%、3.5%、4%、4.5%或更多的血清。在另一个实施方案中,第一培养基包含少于约5%、4.5%、4%、3.5%、3%、2.5%、2%、1.5%、1%、0.9%、0.8%、0.7%、0.6%、0.5%、0.4%、0.3%、0.2%或更少的血清。在又一个实施方案中,第一培养基包含介于约0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.6%、0.7%、0.8%、0.9%、1%、1.5%、2%、2.5%、3%、3.5%、4%或4.5%与约5%、4.5%、4%、3.5%、3%、2.5%、2%、1.5%、1%、0.9%、0.8%、0.7%、0.6%、0.5%、0.4%、0.3%或0.2%之间的血清。在一个实施方案中,第一培养基包含约1%的血清。

[0039] 第一培养基包含第一组添加剂,所述第一组添加剂包含以下或基本上由以下组成:骨形态发生蛋白(BMP)信号传导途径的激活剂;成纤维细胞生长因子(FGF)信号传导途径的激活剂;Wnt信号传导途径的抑制剂;和转化生长因子β(TGFβ)信号传导途径的抑制剂。第一组添加剂不包括胰岛素信号传导途径的激活剂,诸如胰岛素。如在本公开的上下文中所使用的,表述"第一培养基基本上由第一组添加剂组成"是指第一培养基包含另外的添加剂,这些添加剂对于内胚层细胞向前肠后段细胞的分化不是必需的,但是仍然能促进分化。这些另外的添加剂包括但不限于例如视黄酸、维生素和矿物质。

[0040] 第一培养基包含骨形态发生蛋白(BMP)信号传导途径的激活剂。在发育期间,BMP信号传导途径的激活剂通常由心脏中胚层提供,并且有助于将内胚层细胞分化成前肠后段细胞。如在本公开的上下文中所使用的,"BMP信号传导途径的激活剂"是指能够激活与BMP同其同源受体(例如BMPR1和/或BMPR2)的结合相关的信号传导途径的化合物。BMP受体的信号传导经由SMAD和MAP激酶途径发生,以实现BMP靶基因的转录。所述化合物可以是BMP受体的激动剂(对BMPR1或BMPR2具有特异性,或者能够结合并激活这两个受体),已知在BMP信号传导途径中被激活的多肽的激活剂,和/或已知在BMP信号传导途径中被抑制的多肽的抑制剂。已知的BMP包括但不限于BMP1、BMP2、BMP3、BMP4、BMP5、BMP6、BMP7、BMP8a、BMP8b、BMP9、BMP10、BMP11和BMP15。在一个实施方案中,激活剂是DM3189。在另一个实施方案中,激活剂是BMP4(其可以按重组或纯化形式提供)。BMP4是转化生长因子-β(TGF-β)家族的成员,可结合至两种不同类型的丝氨酸-苏氨酸激酶受体(称为BMPR1和BMPR2)。在提供BMP4作为BMP信号传导途径的激活剂的实施方案中,所述BMP4可以至少约10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或更高ng/mL第一培养基的浓度提供。在提供BMP4作为BMP信号传导途径的激活剂的实施方案中,所述BMP4可以不超过约30、29、28、27、26、25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11或更低ng/mL第一培养基的浓度提供。在提供BMP4作为BMP信号传导途径的激活剂的实施方案中,所述BMP4可以介于约10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28或29与约30、29、28、27、26、25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12或11ng/mL第一培养基之间的浓度提供。在一些特定实施方案中,BMP4可以约20ng/mL第一培养基的浓度提供。

[0041] 第一培养基还包含成纤维细胞生长因子(FGF)信号传导途径的激活剂。在发育期间,FGF信号传导途径的激活剂通常由心脏中胚层提供,并且有助于将内胚层细胞分化成前肠后段细胞。如在本公开的上下文中所使用的,"FGF信号传导途径的激活剂"是指能够激活

与FGF同其同源受体(例如FGFR1、FGFR2、FGFR3和/或FGFR4)的结合相关的信号传导途径的化合物。所述化合物可以是FGF受体的激动剂(对FGFR1、FGFR2、FGFR3和/或FGFR4具有特异性,或者能够结合并激活超过一个受体),已知在FGF信号传导途径中被激活的多肽的激活剂,和/或已知在FGF信号传导途径中被抑制的多肽的抑制剂。已知的FGF包括但不限于FGF1、FGF2、FGF3、FGF4、FGF5、FGF6、FGF7、FGF8a、FGF8b、FGF9、FGF10、FGF11、FGF12、FGF13、FGF14、FGF15/19、FGF16、FGF17、FGF18、FGF20、FGF21、FGF22和FGF23。在一个实施方案中,激活剂是碱性FGF或FGF2(其可以按重组或纯化形式提供)。FGF2结合至两种不同类型的受体,即FGFR2(也称为CD332)和FGFR3。在提供碱性FGF作为FGF信号传导途径的激活剂的实施方案中,所述碱性FGF可以至少约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或更高ng/mL第一培养基的浓度提供。在提供碱性FGF作为FGF信号传导途径的激活剂的实施方案中,所述碱性FGF可以不超过约20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或更低ng/mL第一培养基的浓度提供。在提供碱性FGF作为FGF信号传导途径的激活剂的实施方案中,所述碱性FGF可以介于约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18或19与约20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2ng/ml第一培养基之间的浓度提供。在一些特定实施方案中,碱性FGF可以约5ng/mL第一培养基的浓度提供。

[0042] 第一培养基还包含Wnt信号传导途径的抑制剂。Wnt信号传导途径的抑制剂结合TGFβ信号传导途径的抑制剂的存在,有利于HEX和PROX1基因的表达,这些基因编码肝脏发育所需的多肽。如在本公开的上下文中所使用的,"Wnt信号传导途径的抑制剂"是指能够抑制与Wnt蛋白受体同其同源卷曲受体(例如FZD1、FZD2、FZD3、FZD4、FZD5、FZD6、FZD7、FZD8、FZD9或FZD10)的结合相关的信号传导途径的化合物。卷曲受体家族是G蛋白偶联受体蛋白。所述化合物可以是卷曲受体的拮抗剂(对FZD1、FZD2、FZD3、FZD4、FZD5、FZD6、FZD7、FZD8、FZD9或FZD10具有特异性,或者能够结合并抑制超过一个受体),已知在Wnt信号传导途径中被激活的多肽的抑制剂,和/或已知在Wnt信号传导途径中被抑制的多肽的激活剂。已知的Wnt蛋白包括但不限于WNT1、WNT2、WNT2B、WNT3、WNT3A、WNT4、WNT5A、WNT5B、WNT6、WNT7A、WNT7B、WNT8A、WNT8B、WNT9A、WNT9B、WNT10A、WNT10B、WNT11和WNT16。在一个实施方案中,所述抑制剂能够抑制一种或多种卷曲受体的生物活性。在另一个实施方案中,所述抑制剂能够抑制Porcupine蛋白的生物活性。例如,能够抑制Porcupine蛋白的生物活性的抑制剂可以是IWP2。在使用IWP2作为Wnt信号传导途径的抑制剂的实施方案中,所述IWP2可以在第一培养基中至少0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、8.5、9、9.5μM或更高的浓度提供。在使用IWP2作为Wnt信号传导途径的抑制剂的实施方案中,所述IWP2可以在第一培养基中不超过10、9.5、9、8.5、8、7.5、7、6.5、6、5.5、5、4.5、4、3.5、3、2.5、2、1.5、1、0.9、0.8、0.7、0.6、0.5、0.4、0.3、0.2μM或更低的浓度提供。在使用IWP2作为Wnt信号传导途径的抑制剂的实施方案中,所述IWP2可以在第一培养基中介于约0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、8.5、9或9.5与约10、9.5、9、8.5、8、7.5、7、6.5、6、5.5、5、4.5、4、3.5、3、2.5、2、1.5、1、0.9、0.8、0.7、0.6、0.5、0.4、0.3或0.2μM之间的浓度提供。在使用IWP2作为Wnt信号传导途径的抑制剂的实施方案中,所述IWP2可以在第一培养基中约4μM的浓度提供。

[0043] 第一培养基还包含转化生长因子β(TGFβ)信号传导途径的抑制剂。TGFβ信号传导途径的抑制剂存在结合Wnt信号传导途径的抑制剂的存在,有利于HEX和PROX1基因的表达,

这些基因编码肝脏发育所需的多肽。如在本公开的上下文中所使用的，“TGFβ信号传导途径的抑制剂”是指能够抑制与TGFβ同其同源受体的结合相关的信号传导途径的化合物。TGFβ受体家族经由SMAD蛋白介导信号传导。所述化合物可以是TGFβ受体的拮抗剂，已知在TGFβ信号传导途径中被激活的多肽的抑制剂，和/或已知在TGFβ信号传导途径中被抑制的多肽的激活剂。已知的TGFβ蛋白包括但不限于TGFB1、TGFB2、TGFB3和TGFB4。在一个实施方案中，所述抑制剂能够抑制ALK4、ALK5或ALK7多肽中的至少一者的生物活性。在一些实施方案中，所述抑制剂能够抑制ALK4、ALK5和ALK7多肽的生物活性。例如，能够抑制ALK4、ALK5和ALK7多肽的生物活性的抑制剂可以是A83-01。替代地或组合地，抑制剂可以是SB431542和/或LY364947。在使用A83-01作为TGFβ信号传导途径的抑制剂的实施方案中，所述A83-01可以在第一培养基中至少0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、2.5、3、3.5、4、4.5μM或更高的浓度提供。在使用A83-01作为TGFβ信号传导途径的抑制剂的实施方案中，所述A83-01可以在第一培养基中不超过5、4.5、4、3.5、3、2.5、2、1.9、1.8、1.7、1.6、1.5、1.4、1.3、1.2、1.1、1、0.9、0.8、0.7、0.6、0.5、0.4、0.3、0.2μM或更低的浓度提供。在使用A83-01作为TGFβ信号传导途径的抑制剂的实施方案中，所述A83-01可以在第一培养基中介于约0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、2.5、3、3.5、4或4.5与约5、4.5、4.、3.5、3、2.5、2、1.9、1.8、1.7、1.6、1.5、1.4、1.3、1.2、1.1、1、0.9、0.8、0.7、0.6、0.5、0.4、0.3或0.2μM之间的浓度提供。在使用A83-01作为TGFβ信号传导途径的抑制剂的实施方案中，所述A83-01可以在第一培养基中约1μM的浓度提供。

[0044] 第一培养基保持与内胚层细胞和前肠后段细胞接触至少一天或更长时间，直至发生分化。如果要使第一培养基与培养的细胞接触超过一天，则可每天更换一次所述第一培养基。在本公开方法的一些实施方案中，第一培养基保持与培养的细胞接触至少1、2、3、4或更多天。在另一个实施方案中，第一培养基保持与培养的细胞接触不超过5、4、3、2或更少天。在另一个实施方案中，第一培养基保持与培养的细胞接触至少1、2、3、4或更多天并且不超过5、4、3、2或更少天。在又一个实施方案中，第一培养基保持与培养的细胞接触约1与5天之间。

[0045] 将第一培养基与内胚层细胞一起使用可使内胚层细胞分化成前肠后段细胞。因此，本公开提供了从本文所描述的方法获得的前肠后段细胞群。在本公开的前肠后段细胞群中，大多数细胞被认为是前肠后段细胞，并且在一些实施方案中，可包括一些内胚层细胞。

[0046] 本公开提供了由前肠后段细胞制备肝祖细胞(本文中也称为成肝细胞)的第二方法。所述方法包括在一定条件下使一个或多个前肠后段细胞与包含第二组添加剂的第二培养基接触，以便使前肠后段细胞分化成前肠后段细胞。可通过执行第一方法来获得在第二方法中使用的前肠后段细胞。

[0047] 如在本公开中所使用的，“肝祖细胞”或“成肝细胞”是指能够在胆管细胞和肝细胞中分化的双能祖细胞。本领域技术人员可使用本领域已知的各种技术来鉴定肝祖细胞。例如，肝祖细胞可通过确定以下基因中的至少一者或任何组合的存在或不存在以及表达水平来鉴定：α-胎蛋白(AFP)、白蛋白(ALB)、细胞角蛋白7(CK7)、细胞角蛋白19(CK19)、SOX9、PDX1、PROX1、EpCAM、HHEX基因和/或HNF4a或它们编码的多肽。在一个具体实施方案中，肝祖

细胞表达以下基因中的至少一者或任何组合:α-胎蛋白(AFP)、白蛋白(ALB)、细胞角蛋白7(CK7)、细胞角蛋白19(CK19)、SOX9、PDX1、PROX1、EpCAM、HHEX或HNF4a或它们编码的多肽。在又一个实施方案中,肝祖细胞表达以下基因中的至少一者:α-胎蛋白(AFP)、白蛋白(ALB)、细胞角蛋白7(CK7)、细胞角蛋白19(CK19)、SOX9、PDX1、PROX1、EpCAM、HHEX或HNF4a或它们编码的多肽。在又一个实施方案中,肝祖细胞表达以下基因中的至少两者或任何组合:α-胎蛋白(AFP)、白蛋白(ALB)、细胞角蛋白7(CK7)、细胞角蛋白19(CK19)、SOX9、PDX1、PROX1、EpCAM、HHEX和/或HNF4a或它们编码的多肽。在又一个实施方案中,肝祖细胞表达以下基因中的至少三者或任何组合:α-胎蛋白(AFP)、白蛋白(ALB)、细胞角蛋白7(CK7)、细胞角蛋白19(CK19)、SOX9、PDX1、PROX1、EpCAM、HHEX和/或HNF4a或它们编码的多肽。在又一个实施方案中,肝祖细胞表达以下基因中的至少四者或任何组合:α-胎蛋白(AFP)、白蛋白(ALB)、细胞角蛋白7(CK7)、细胞角蛋白19(CK19)、SOX9、PDX1、PROX1、EpCAM、HHEX和/或HNF4a或它们编码的多肽。在又一个实施方案中,肝祖细胞表达以下基因中的至少五者或任何组合:α-胎蛋白(AFP)、白蛋白(ALB)、细胞角蛋白7(CK7)、细胞角蛋白19(CK19)、SOX9、PDX1、PROX1、EpCAM、HHEX和/或HNF4a。在又一个实施方案中,肝祖细胞表达至少六个或更多个由以下基因的任何组合编码的多肽:α-胎蛋白(AFP)、白蛋白(ALB)、细胞角蛋白7(CK7)、细胞角蛋白19(CK19)、SOX9、PDX1、PROX1、EpCAM、HHEX和/或HNF4a。在又一个实施方案中,肝祖细胞表达至少七个或更多个由以下基因的任何组合编码的多肽:α-胎蛋白(AFP)、白蛋白(ALB)、细胞角蛋白7(CK7)、细胞角蛋白19(CK19)、SOX9、PDX1、PROX1、EpCAM、HHEX和/或HNF4a。在又一个实施方案中,肝祖细胞表达至少八个或更多个由以下基因的任何组合编码的多肽:α-胎蛋白(AFP)、白蛋白(ALB)、细胞角蛋白7(CK7)、细胞角蛋白19(CK19)、SOX9、PDX1、PROX1、EpCAM、HHEX和/或HNF4a。在又一个实施方案中,肝祖细胞表达至少九个或更多个由以下基因的任何组合编码的多肽:α-胎蛋白(AFP)、白蛋白(ALB)、细胞角蛋白7(CK7)、细胞角蛋白19(CK19)、SOX9、PDX1、PROX1、EpCAM、HHEX和/或HNF4a。在又一个实施方案中,肝祖细胞表达以下基因(或它们编码的多肽):α-胎蛋白(AFP)、白蛋白(ALB)、细胞角蛋白7(CK7)、细胞角蛋白19(CK19)、SOX9、PDX1、PROX1、EpCAM、HHEX和HNF4a。在一些实施方案中,肝祖细胞表达以下基因或它们编码的多肽并且可通过比较以下基因或它们编码的多肽的表达水平与相同基因/多肽在前肠后段细胞中的表达水平来鉴定:α-胎蛋白(AFP)、白蛋白(ALB)、细胞角蛋白7(CK7)、细胞角蛋白19(CK19)、SOX9、PDX1、PROX1和/或HNF4a。在一个实施方案中,肝祖细胞与前肠后段细胞表达基本上相同量的白蛋白。在一个实施方案中,肝祖细胞与前肠后段细胞表达基本上相同量的AFP。在一个实施方案中,肝祖细胞比前肠后段细胞表达更多的CK19基因。在一个实施方案中,肝祖细胞比前肠后段细胞表达更多的CK7基因。在一个实施方案中,肝祖细胞比前肠后段细胞表达更多的PDX1基因。在一个实施方案中,肝祖细胞比前肠后段细胞表达更多的SOX9基因。在一个实施方案中,肝祖细胞比前肠后段细胞表达更多的PROX1基因。在一个实施方案中,肝祖细胞表达HHEX基因,但量少于前肠后段细胞。在一个实施方案中,当与未分化的多能细胞(诸如iPSC)相比时,肝子代细胞基本上不表达TRA-1-60和/或Nanog基因或者以非常低的水平表达这些基因。

[0048] 肝祖细胞可以是任何起源,尤其可源自哺乳动物,并且在一些实施方案中源自人。

[0049] 在第二方法中使用的第二培养基可以是无血清的(例如,未补充血清)。在替代实施方案中,在第二方法中使用的第二培养基可包含血清,其可以是KnockOut Serum

Replacement™(ThermoFisher Scientific)。在一个实施方案中,第二培养基包含介于约0.1%与约5%(v/v)之间的血清。在又一个实施方案中,第二培养基包含至少约0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.6%、0.7%、0.8%、0.9%、1%、1.5%、2%、2.5%、3%、3.5%、4%、4.5%或更多的血清。在另一个实施方案中,第二培养基包含少于约5%、4.5%、4%、3.5%、3%、2.5%、2%、1.5%、1%、0.9%、0.8%、0.7%、0.6%、0.5%、0.4%、0.3%、0.2%或更少的血清。在又一个实施方案中,第一培养基包含介于约0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.6%、0.7%、0.8%、0.9%、1%、1.5%、2%、2.5%、3%、3.5%、4%或4.5%与约5%、4.5%、4%、3.5%、3%、2.5%、2%、1.5%、1%、0.9%、0.8%、0.7%、0.6%、0.5%、0.4%、0.3%或0.2%之间的血清。在一个实施方案中,第二培养基包含约2%的血清。

[0050] 第二培养基包含第二组添加剂,所述第二组添加剂包含以下或基本上由以下组成:胰岛素信号传导途径的激活剂;骨形态发生蛋白(BMP)信号传导途径的激活剂;成纤维细胞生长因子(FGF)信号传导途径的激活剂;肝细胞生长因子(HGF)信号传导途径的激活剂和Wnt信号传导途径的激活剂。如在本公开的上下文中所使用的,表述"第二培养基基本上由第二组添加剂组成"是指第二培养基包含另外的添加剂,这些添加剂对于前肠后段细胞向肝祖细胞的分化不是必需的,但是仍然能促进分化。这些另外的添加剂包括但不限于B27补充剂、视黄酸、胰岛素、维生素和矿物质。

[0051] 第二培养基还包含胰岛素信号传导途径的激活剂。如在本公开的上下文中所使用的,"胰岛素信号传导途径的激活剂"是指能够激活与胰岛素同其同源胰岛素受体(酪氨酸激酶受体)的结合相关的信号传导途径的化合物。所述化合物可以是胰岛素受体的激动剂(胰岛素,IGF-I或IGF-II),已知在胰岛素信号传导途径中被激活的多肽的激活剂,和/或已知在胰岛素信号传导途径中被抑制的多肽的抑制剂。在一个实施方案中,激活剂是胰岛素(其可以按重组或纯化形式提供)。在提供胰岛素作为胰岛素信号传导途径的激活剂的实施方案中,所述胰岛素可以至少约1、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95或更高ng/mL第二培养基的浓度提供。在提供胰岛素作为胰岛素信号传导途径的激活剂的实施方案中,所述胰岛素可以不超过约100、95、90、85、80、75、70、65、60、55、50、45、40、35、30、25、20、15、10、5或更低ng/mL第二培养基的浓度提供。在提供胰岛素作为胰岛素信号传导途径的激活剂的实施方案中,所述胰岛素可以介于约1、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90或95与约100、95、90、85、80、75、70、65、60、55、50、45、40、35、30、25、20、15、10或5第二培养基之间的浓度提供。在一些特定实施方案中,胰岛素可以约10mg/ml第二培养基的浓度提供。在又一个实施方案中,以B27补充剂,以HBM/HCM Bulletkit™和/或原代肝细胞(PHH)补充剂的形式提供胰岛素。

[0052] 第二培养基包含骨形态发生蛋白(BMP)信号传导途径的激活剂。在发育期间,BMP信号传导途径的激活剂通常由心脏中胚层提供,并且有助于将内胚层细胞分化成前肠后段细胞。如在本公开的上下文中所使用的,"BMP信号传导途径的激活剂"是指能够激活与BMP同其同源受体(例如BMPR1和/或BMPR2)的结合相关的信号传导途径的化合物。BMP受体的信号传导经由SMAD和MAP激酶途径发生,以实现BMP靶基因的转录。所述化合物可以是BMP受体的激动剂(对BMPR1或BMPR2具有特异性,或者能够结合并激活这两个受体),已知在BMP信号传导途径中被激活的多肽的激活剂,和/或已知在BMP信号传导途径中被抑制的多肽的抑制

剂。已知的BMP包括但不限于BMP1、BMP2、BMP3、BMP4、BMP5、BMP6、BMP7、BMP8a、BMP8b、BMP9、BMP10、BMP11和BMP15。在一个实施方案中，激活剂是DM3189。在另一个实施方案中，激活剂是BMP4(其可以按重组或纯化形式提供)。BMP4是转化生长因子-β(TGF-β)家族的成员，可结合至两种不同类型的丝氨酸-苏氨酸激酶受体(称为BMPR1和BMPR2)。在提供BMP4作为BMP信号传导途径的激活剂的实施方案中，所述BMP4可以至少约10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或更高ng/mL第二培养基的浓度提供。在提供BMP4作为BMP信号传导途径的激活剂的实施方案中，所述BMP4可以不超过约30、29、28、27、26、25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11或更低ng/mL第二培养基的浓度提供。在提供BMP4作为BMP信号传导途径的激活剂的实施方案中，所述BMP4可以介于约10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28或29与约30、29、28、27、26、25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12或11ng/mL第二培养基之间的浓度提供。在一些特定实施方案中，BMP4可以约20ng/mL第二培养基的浓度提供。在另外的实施方案中，可在第一组添加剂和第二组添加剂中提供BMP4作为激活剂。

[0053] 第二培养基还包含成纤维细胞生长因子(FGF)信号传导途径的激活剂。在发育期间，FGF信号传导途径的激活剂通常由心脏中胚层提供，并且有助于将内胚层细胞分化成前肠后段细胞。如在本公开的上下文中所使用的，“FGF信号传导途径的激活剂”是指能够激活与FGF同其同源受体(例如FGFR1、FGFR2、FGFR3和/或FGFR4)的结合相关的信号传导途径的化合物。所述化合物可以是FGF受体的激动剂(对FGFR1、FGFR2、FGFR3和/或FGFR4具有特异性，或者能够结合并激活超过一个受体)，已知在FGF信号传导途径中被激活的多肽的激活剂，和/或已知在FGF信号传导途径中被抑制的多肽的抑制剂。已知的FGF包括但不限于FGF1、FGF2、FGF3、FGF4、FGF5、FGF6、FGF7、FGF8a、FGF8b、FGF9、FGF10、FGF11、FGF12、FGF13、FGF14、FGF15/19、FGF16、FGF17、FGF18、FGF20、FGF21、FGF22和FGF23。在一个实施方案中，激活剂是碱性FGF或FGF2(其可以按重组或纯化形式提供)。FGF2结合至两种不同类型的受体，即FGFR2(也称为CD332)和FGFR3。在提供碱性FGF作为FGF信号传导途径的激活剂的实施方案中，所述碱性FGF可以至少约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或更高ng/mL第二培养基的浓度提供。在提供碱性FGF作为FGF信号传导途径的激活剂的实施方案中，所述碱性FGF可以不超过约20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或更低ng/mL第二培养基的浓度提供。在提供碱性FGF作为FGF信号传导途径的激活剂的实施方案中，所述碱性FGF可以介于约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18或19与约20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2ng/ml第二培养基之间的浓度提供。在一些特定实施方案中，碱性FGF可以约10ng/mL第二培养基的浓度提供。在另外的实施方案中，可在第二组添加剂和第二组添加剂中提供碱性FGF作为激活剂。

[0054] 第二培养基还包含肝细胞生长因子(HGF)信号传导途径的激活剂。在发育期间，HGF信号传导途径的激活剂有助于将内胚层细胞分化成肝祖细胞。如在本公开的上下文中所使用的，“HGF信号传导途径的激活剂”是指能够激活与HGF同其同源受体(例如c-Met)的结合相关的信号传导途径的化合物。所述化合物可以是HGF受体的激动剂，已知在HGF信号传导途径中被激活的多肽的激活剂，和/或已知在HGF信号传导途径中被抑制的多肽的抑制剂。在一个实施方案中，激活剂是HGF(其可以按重组或纯化形式提供)。在提供HGF作为HGF信号传导途径的激活剂的实施方案中，所述HGF可以至少约10、11、12、13、14、15、16、17、18、

19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39或更高ng/mL第二培养基的浓度提供。在提供HGF作为HGF信号传导途径的激活剂的实施方案中，所述HGF可以不超过约40、39、38、37、36、35、34、33、32、31、30、29、28、27、26、25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11或更低ng/mL第二培养基的浓度提供。在提供HGF作为HGF信号传导途径的激活剂的实施方案中，所述HGF可以介于约10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38或39与约40、39、38、37、36、35、34、33、32、31、30、29、28、27、26、25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12或11ng/mL第二培养基之间的浓度提供。在一些特定实施方案中，HGF可以约20ng/mL第二培养基的浓度提供。

[0055] 第二培养基还包含Wnt信号传导途径的激活剂。在一些实施方案中，重要的是仅在前肠后段细胞中的Wnt信号传导途径先前被抑制之后才进行激活(例如，如在第一方法中所指示)。如在本公开的上下文中所使用的，“Wnt信号传导途径的激活剂”是指能够激活与Wnt蛋白受体同其同源卷曲受体(例如FZD1、FZD2、FZD3、FZD4、FZD5、FZD6、FZD7、FZD8、FZD9或FZD10)的结合相关的信号传导途径的化合物。卷曲受体家族是G蛋白偶联受体蛋白。所述化合物可以是卷曲受体的激动剂(对FZD1、FZD2、FZD3、FZD4、FZD5、FZD6、FZD7、FZD8、FZD9或FZD10具有特异性，或者能够结合并激活超过一个受体)，已知在Wnt信号传导途径中被激活的多肽的激活剂，和/或已知在Wnt信号传导途径中被抑制的多肽的抑制剂。已知的Wnt蛋白包括但不限于WNT1、WNT2、WNT2B、WNT3、WNT3A、WNT4、WNT5A、WNT5B、WNT6、WNT7A、WNT7B、WNT8A、WNT8B、WNT9A、WNT9B、WNT10A、WNT10B、WNT11和WNT16。在一个实施方案中，激活剂是Wnt3a、SB-216763和/或LY2090314。在一个实施方案中，所述激活剂能够抑制GSK3蛋白的生物活性。例如，能够抑制GSK3蛋白的生物活性的激活剂可以是CHIR99021。在使用CHIR99021作为Wnt信号传导途径的激活剂的实施方案中，所述CHIR99021可以在第二培养基中至少0.5、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5μM或更高的浓度提供。在使用CHIR99021作为Wnt信号传导途径的激活剂的实施方案中，所述CHIR99021可以在第二培养基中不超过8、7.5、7、6.5、6、5.5、5、4.5、4、3.5、3、2.5、2、1.5、1μM或更低的浓度提供。在使用CHIR99021作为Wnt信号传导途径的激活剂的实施方案中，所述CHIR99021可以在第二培养基中介于约0.5、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7或7.5与约8、7.5、7、6.5、6、5.5、5、4.5、4、3.5、3、2.5、2、1.5或1μM之间的浓度提供。在使用CHIR99021作为Wnt信号传导途径的抑制剂的实施方案中，所述CHIR99021可以在第二培养基中约3μM的浓度提供。

[0056] 第二培养基保持与前肠后段细胞和肝祖细胞接触至少一天或更长时间以允许分化。如果要使第二培养基与培养的细胞接触超过一天，则可每天更换一次所述第二培养基。在本公开方法的一些实施方案中，第二培养基保持与培养的细胞接触至少1、2、3、4或更多天。在另一个实施方案中，第二培养基保持与培养的细胞接触不超过5、4、3、2或更少天。在另一个实施方案中，第二培养基保持与培养的细胞接触至少1、2、3、4或更多天并且不超过5、4、3、2或更少天。在又一个实施方案中，第二培养基保持与培养的细胞接触约1与5天之间。

[0057] 将第二培养基与前肠后段细胞一起使用可使前肠后段细胞分化成肝祖细胞。因此，本公开提供了从本文所描述的方法获得的肝祖细胞群。在本公开的肝祖细胞群中，大多数细胞被认为是肝祖细胞，并且在一些实施方案中，可包括一些前肠后段细胞。在一个实施

方案中，从第二方法获得的肝祖细胞群包含至少60％、65％、70％、75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％的肝祖细胞(例如可通过确定CK19或EpCAM的表达来鉴定)。

[0058] 本公开提供了由肝祖细胞制备肝细胞样细胞的第三方法。所述方法包括在一定条件下使一个或多个肝祖细胞与包含第三组添加剂的第三培养基接触(以促进肝祖细胞分化成肝细胞谱系细胞)，接着与包含第四组添加剂的第四培养基接触(以促进肝谱系细胞分化成未成熟肝细胞)，接着与包含第五组添加剂的第五培养基接触(以促进未成熟肝细胞分化成成熟肝细胞)，以便使肝祖细胞分化成肝细胞。可通过执行如本文所描述的第一方法和/或第二方法来获得在第三方法中使用的肝祖细胞。

[0059] 如在本公开中所使用的，“肝细胞样细胞”统指肝细胞谱系细胞、未成熟的肝细胞样细胞和成熟的肝细胞样细胞。肝谱系细胞不能够分化成胆管细胞，而能够分化成肝细胞。在一些实施方案中，肝细胞样细胞(特别是成熟的肝细胞样细胞)是能够执行肝特异性功能的细胞，这些功能诸如为产生特异性蛋白质(白蛋白、凝血因子、α-1-抗胰蛋白酶等)，将氨解毒成尿素，代谢药物，储存糖原，缀合胆红素，合成胆汁等。本领域技术人员可使用本领域已知的各种技术来鉴定肝细胞样细胞。例如，肝细胞样细胞可通过确定以下基因中的至少一者或任何组合的存在或不存在以及表达水平来鉴定：α-胎蛋白(AFP)、白蛋白(ALB)、ASGR1、ASGPR、HNF4a或SOX9或它们编码的多肽。在一个具体实施方案中，肝细胞样细胞表达以下基因中的至少一者或任何组合：α-胎蛋白(AFP)、白蛋白(ALB)、ASGR1(ASGPR)、HNF4a和/或SOX9或它们编码的多肽。在一个具体实施方案中，肝细胞样细胞表达以下基因中的至少两者或任何组合：α-胎蛋白(AFP)、白蛋白(ALB)、ASGR1(ASGPR)、HNF4a和/或SOX9或它们编码的多肽。在一个具体实施方案中，肝细胞样细胞表达以下基因中的至少三者或任何组合：α-胎蛋白(AFP)、白蛋白(ALB)、ASGR1(ASGPR)、HNF4a和/或SOX9或它们编码的多肽。在一个具体实施方案中，肝细胞样细胞表达以下基因中的至少四者或任何组合：α-胎蛋白(AFP)、白蛋白(ALB)、ASGR1(ASGPR)、HNF4a和/或SOX9或它们编码的多肽。在一个具体实施方案中，肝细胞样细胞表达以下基因：α-胎蛋白(AFP)、白蛋白(ALB)、ASGR1(ASGPR)、HNF4a和/或SOX9或它们编码的多肽。在又一个实施方案中，肝细胞样细胞可通过检测以及任选地测量以下基因中的至少一者或任何组合的表达来鉴定：α-胎蛋白(AFP)、白蛋白(ALB)、ASGR1(ASGPR)、HNF4a和/或SOX9或它们编码的多肽。在又一个实施方案中，肝细胞样细胞表达一种或多种由以下基因中的至少一者或任何组合编码的多肽并且可通过检测以及任选地测量一种或多种由以下基因中的至少一者或任何组合编码的多肽的表达来鉴定：α-胎蛋白(AFP)、白蛋白(ALB)、ASGR1、HNF4a和/或SOX9。在一些实施方案中，肝细胞样细胞表达以下基因或它们编码的多肽并且可通过比较以下基因或它们编码的多肽的表达水平与相同基因/多肽在肝细胞(例如像胎肝细胞)中的表达水平来鉴定：α-胎蛋白(AFP)、白蛋白(ALB)、ASGR1、HNF4a和/或SOX9。在一个具体实施方案中，当与胎肝细胞中的相应水平相比时，肝细胞样细胞表达更多的SOX9基因或它们编码的多肽。在一个具体实施方案中，当与胎肝细胞相比时，肝细胞样细胞以基本上相同的水平表达HNF4a、AFP、ALB和ASGPR基因。成熟的肝细胞样细胞可具有可检测水平的CyP3A4，例如像相对活性为每百万个细胞至少10000个单位。在又一个实施方案中，成熟的肝细胞样细胞可具有比未成熟的肝细胞样细胞更高的CyP3A4活性。成熟的肝细胞样细胞可产生可检测水平的白蛋白，例如像至少约5、6、7、8、

9、10、11、12μg/L/10^6/24h或更高。成熟的肝细胞样细胞可产生可检测水平的白蛋白，例如像至少约10、100或1 000μg/L/10^6/24h或更高。

[0060] 肝细胞样细胞可具有任何起源，尤其可源自哺乳动物，并且在一些实施方案中源自人。

[0061] 在第三方法中使用的第三培养基、第四培养基和第五培养基可以是无血清的(例如，未补充血清)。在替代实施方案中，在第三方法中使用的第三培养基、第四培养基和第五培养基可包含血清，其可以是KnockOut Serum Replacement™(ThermoFisher Scientific)。在一个实施方案中，第三培养基、第四培养基和第五培养基包含介于约0.1%与约5%(v/v)之间的血清。在又一个实施方案中，第三培养基、第四培养基和第五培养基包含至少约0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.6%、0.7%、0.8%、0.9%、1%、1.5%、2%、2.5%、3%、3.5%、4%、4.5%或更多的血清。在另一个实施方案中，第三培养基、第四培养基和第五培养基包含少于约5%、4.5%、4%、3.5%、3%、2.5%、2%、1.5%、1%、0.9%、0.8%、0.7%、0.6%、0.5%、0.4%、0.3%、0.2%或更少的血清。在又一个实施方案中，第一培养基包含介于约0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.6%、0.7%、0.8%、0.9%、1%、1.5%、2%、2.5%、3%、3.5%、4%或4.5%与约5%、4.5%、4%、3.5%、3%、2.5%、2%、1.5%、1%、0.9%、0.8%、0.7%、0.6%、0.5%、0.4%、0.3%或0.2%之间的血清。在一个实施方案中，第三培养基包含约2%的血清。在另一个实施方案中，第三培养基包含约1%的血清。在另一个实施方案中，第四培养基包含约1%的血清。在另一个实施方案中，第五培养基包含约1%的血清。

[0062] 第三培养基包含第三组添加剂，所述第三组添加剂包含以下或基本上由以下组成：胰岛素信号传导途径的激活剂；骨形态发生蛋白(BMP)信号传导途径的激活剂；成纤维细胞生长因子(FGF)信号传导途径的激活剂；肝细胞生长因子(HGF)信号传导途径的激活剂；Wnt信号传导途径的激活剂；TGFβ信号传导途径的抑制剂；细胞因子和糖皮质激素。如在本公开的上下文中所使用的，表述“第三培养基基本上由第三组添加剂组成”是指第三培养基包含另外的添加剂，这些添加剂对于肝祖细胞向肝细胞样细胞的分化不是必需的，但是仍然能促进分化。这些另外的添加剂包括但不限于B27补充剂、原代肝细胞补充剂(PHH)、HBM/HCM Bulletkit™视黄酸、胰岛素、维生素和矿物质。

[0063] 第三培养基还包含胰岛素信号传导途径的激活剂。如在本公开的上下文中所使用的，“胰岛素信号传导途径的激活剂”是指能够激活与胰岛素同其同源胰岛素受体(酪氨酸激酶受体)的结合相关的信号传导途径的化合物。所述化合物可以是胰岛素受体的激动剂(胰岛素，IGF-I或IGF-II)，已知在胰岛素信号传导途径中被激活的多肽的激活剂，和/或已知在胰岛素信号传导途径中被抑制的多肽的抑制剂。在一个实施方案中，激活剂是胰岛素(其可以按重组或纯化形式提供)。在提供胰岛素作为胰岛素信号传导途径的激活剂的实施方案中，所述胰岛素可以至少约1、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95或更高ng/mL第三培养基的浓度提供。在提供胰岛素作为胰岛素信号传导途径的激活剂的实施方案中，所述胰岛素可以不超过约100、95、90、85、80、75、70、65、60、55、50、45、40、35、30、25、20、15、10、5或更低ng/mL第三培养基的浓度提供。在提供胰岛素作为胰岛素信号传导途径的激活剂的实施方案中，所述胰岛素可以介于约1、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90或95与约100、95、90、85、80、75、70、65、60、55、50、45、

40、35、30、25、20、15、10或5第三培养基之间的浓度提供。在一些特定实施方案中，胰岛素可以约10mg/ml第三培养基的浓度提供。在又一个实施方案中，以B27补充剂，以HBM/HCM Bulletkit™和/或原代肝细胞(PHH)补充剂的形式提供胰岛素。

[0064] 第三培养基包含骨形态发生蛋白(BMP)信号传导途径的激活剂。在发育期间，BMP信号传导途径的激活剂通常由心脏中胚层提供，并且有助于将内胚层细胞分化成前肠后段细胞。如在本公开的上下文中所使用的，“BMP信号传导途径的激活剂”是指能够激活与BMP同其同源受体(例如BMPR1和/或BMPR2)的结合相关的信号传导途径的化合物。BMP受体的信号传导经由SMAD和MAP激酶途径发生，以实现BMP靶基因的转录。所述化合物可以是BMP受体的激动剂(对BMPR1或BMPR2具有特异性，或者能够结合并激活这两个受体)，已知在BMP信号传导途径中被激活的多肽的激活剂，和/或已知在BMP信号传导途径中被抑制的多肽的抑制剂。已知的BMP包括但不限于BMP1、BMP2、BMP3、BMP4、BMP5、BMP6、BMP7、BMP8a、BMP8b、BMP9、BMP10、BMP11和BMP15。在一个实施方案中，激活剂是DM3189。在另一个实施方案中，激活剂是BMP4(其可以按重组或纯化形式提供)。BMP4是转化生长因子-β(TGF-β)家族的成员，可结合至两种不同类型的丝氨酸-苏氨酸激酶受体(称为BMPR1和BMPR2)。在提供BMP4作为BMP信号传导途径的激活剂的实施方案中，所述BMP4可以至少约10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或更高ng/mL第三培养基的浓度提供。在提供BMP4作为BMP信号传导途径的激活剂的实施方案中，所述BMP4可以不超过约30、29、28、27、26、25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11或更低ng/mL第三培养基的浓度提供。在提供BMP4作为BMP信号传导途径的激活剂的实施方案中，所述BMP4可以介于约10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28或29与约30、29、28、27、26、25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12或11ng/mL第三培养基之间的浓度提供。在一些特定实施方案中，BMP4可以约20ng/mL第三培养基的浓度提供。在另外的实施方案中，可在第一组添加剂、第二组添加剂和第三组添加剂中提供BMP4作为激活剂。

[0065] 第三培养基还包含成纤维细胞生长因子(FGF)信号传导途径的激活剂。在发育期间，FGF信号传导途径的激活剂通常由心脏中胚层提供，并且有助于将内胚层细胞分化成前肠后段细胞。如在本公开的上下文中所使用的，“FGF信号传导途径的激活剂”是指能够激活与FGF同其同源受体(例如FGFR1、FGFR2、FGFR3和/或FGFR4)的结合相关的信号传导途径的化合物。所述化合物可以是FGF受体的激动剂(对FGFR1、FGFR2、FGFR3和/或FGFR4具有特异性，或者能够结合并激活超过一个受体)，已知在FGF信号传导途径中被激活的多肽的激活剂，和/或已知在FGF信号传导途径中被抑制的多肽的抑制剂。已知的FGF包括但不限于FGF1、FGF2、FGF3、FGF4、FGF5、FGF6、FGF7、FGF8a、FGF8b、FGF9、FGF10、FGF11、FGF12、FGF13、FGF14、FGF15/19、FGF16、FGF17、FGF18、FGF20、FGF21、FGF22和FGF23。在一个实施方案中，激活剂是碱性FGF或FGF2(其可以按重组或纯化形式提供)。FGF2结合至两种不同类型的受体，即FGFR2(也称为CD332)和FGFR3。在提供碱性FGF作为FGF信号传导途径的激活剂的实施方案中，所述碱性FGF可以至少约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或更高ng/mL第一培养基的浓度提供。在提供碱性FGF作为FGF信号传导途径的激活剂的实施方案中，所述碱性FGF可以不超过约20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或更低ng/mL第一培养基的浓度提供。在提供碱性FGF作为FGF信号传导途径的激活剂的实施方案中，所述碱性FGF可以介于约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18或

19与约20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2ng/ml第一培养基之间的浓度提供。在一些特定实施方案中，碱性FGF可以约10ng/mL第三培养基的浓度提供。在另外的实施方案中，可在第二组添加剂和第三组添加剂中提供碱性FGF作为激活剂。

[0066] 第三培养基还包含肝细胞生长因子(HGF)信号传导途径的激活剂。在发育期间，HGF信号传导途径的激活剂有助于将内胚层细胞分化成肝谱系细胞。如在本公开的上下文中所使用的，“HGF信号传导途径的激活剂”是指能够激活与HGF同其同源受体(例如c-Met)的结合相关的信号传导途径的化合物。所述化合物可以是HGF受体的激动剂，已知在HGF信号传导途径中被激活的多肽的激活剂，和/或已知在HGF信号传导途径中被抑制的多肽的抑制剂。在一个实施方案中，激活剂是HGF(其可以按重组或纯化形式提供)。在提供HGF作为HGF信号传导途径的激活剂的实施方案中，所述HGF可以至少约10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39或更高ng/mL第三培养基的浓度提供。在提供HGF作为HGF信号传导途径的激活剂的实施方案中，所述HGF可以不超过约40、39、38、37、36、35、34、33、32、31、30、29、28、27、26、25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11或更低ng/mL第三培养基的浓度提供。在提供HGF作为HGF信号传导途径的激活剂的实施方案中，所述HGF可以介于约10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38或39与约40、39、38、37、36、35、34、33、32、31、30、29、28、27、26、25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12或11ng/mL第三培养基之间的浓度提供。在一些特定实施方案中，HGF可以约20ng/mL第三培养基的浓度提供。激活剂可以是第二组添加剂和第三组添加剂中的HGF。

[0067] 第三培养基还包含Wnt信号传导途径的激活剂。如在本公开的上下文中所使用的，“Wnt信号传导途径的激活剂”是指能够激活与Wnt蛋白受体同其同源卷曲受体(例如FZD1、FZD2、FZD3、FZD4、FZD5、FZD6、FZD7、FZD8、FZD9或FZD10)的结合相关的信号传导途径的化合物。卷曲受体家族是G蛋白偶联受体蛋白。所述化合物可以是卷曲受体的激动剂(对FZD1、FZD2、FZD3、FZD4、FZD5、FZD6、FZD7、FZD8、FZD9或FZD10具有特异性，或者能够结合并激活超过一个受体)，已知在Wnt信号传导途径中被激活的多肽的激活剂，和/或已知在Wnt信号传导途径中被抑制的多肽的抑制剂。已知的Wnt蛋白包括但不限于WNT1、WNT2、WNT2B、WNT3、WNT3A、WNT4、WNT5A、WNT5B、WNT6、WNT7A、WNT7B、WNT8A、WNT8B、WNT9A、WNT9B、WNT10A、WNT10B、WNT11和WNT16。在一个实施方案中，激活剂是Wnt3a、SB-216763和/或LY2090314。在一个实施方案中，所述激活剂能够抑制GSK3蛋白的生物活性。例如，能够抑制GSK3蛋白的生物活性的激活剂可以是CHIR99021。在使用CHIR99021作为Wnt信号传导途径的激活剂的实施方案中，所述CHIR99021可以在第三培养基中至少0.5、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5μM或更高的浓度提供。在使用CHIR99021作为Wnt信号传导途径的激活剂的实施方案中，所述CHIR99021可以在第三培养基中不超过8、7.5、7、6.5、6、5.5、5、4.5、4、3.5、3、2.5、2、1.5、1μM或更低的浓度提供。在使用CHIR99021作为Wnt信号传导途径的激活剂的实施方案中，所述CHIR99021可以在第三培养基中介于约0.5、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7或7.5与约8、7.5、7、6.5、6、5.5、5、4.5、4、3.5、3、2.5、2、1.5或1μM之间的浓度提供。在使用CHIR99021作为Wnt信号传导途径的抑制剂的实施方案中，所述CHIR99021可以在第三培养基中约3μM的浓度提供。在一个实施方案中，激活剂可以是第二组添加剂和第三组添加剂中的CHIR99021。

[0068] 第三培养基还包含转化生长因子β(TGFβ)信号传导途径的抑制剂。TGFβ信号传导途径的抑制剂存在结合Wnt信号传导途径的抑制剂的存在,有利于HEX和PROX1基因的表达,这些基因编码肝脏发育所需的多肽。如在本公开的上下文中所使用的,"TGFβ信号传导途径的抑制剂"是指能够抑制与TGFβ同其同源受体的结合相关的信号传导途径的化合物。TGFβ受体家族经由SMAD蛋白介导信号传导。所述化合物可以是TGFβ受体的拮抗剂,已知在TGFβ信号传导途径中被激活的多肽的抑制剂,和/或已知在TGFβ信号传导途径中被抑制的多肽的激活剂。已知的TGFβ蛋白包括但不限于TGFB1、TGFB2、TGFB3和TGFB4。在一个实施方案中,所述抑制剂能够抑制ALK4、ALK5或ALK7多肽中的至少一者的生物活性。在一些实施方案中,所述抑制剂能够抑制ALK4、ALK5和ALK7多肽的生物活性。例如,能够抑制ALK4、ALK5和ALK7多肽的生物活性的抑制剂可以是A83-01。替代地或组合地,抑制剂可以是SB431542和/或LY364947。在使用A83-01作为TGFβ信号传导途径的抑制剂的实施方案中,所述A83-01可以在第三培养基中至少0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、2.5、3、3.5、4、4.5μM或更高的浓度提供。在使用A83-01作为TGFβ信号传导途径的抑制剂的实施方案中,所述A83-01可以在第三培养基中不超过5、4.5、4、3.5、3、2.5、2、1.9、1.8、1.7、1.6、1.5、1.4、1.3、1.2、1.1、1、0.9、0.8、0.7、0.6、0.5、0.4、0.3、0.2μM或更低的浓度提供。在使用A83-01作为TGFβ信号传导途径的抑制剂的实施方案中,所述A83-01可以在第三培养基中介于约0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、2.5、3、3.5、4或4.5与约5、4.5、4.、3.5、3、2.5、2、1.9、1.8、1.7、1.6、1.5、1.4、1.3、1.2、1.1、1、0.9、0.8、0.7、0.6、0.5、0.4、0.3或0.2μM之间的浓度提供。在使用A83-01作为TGFβ信号传导途径的抑制剂的实施方案中,所述A83-01可以在第二培养基中约1μM的浓度提供。在一些实施方案中,A83-01可以是第一组添加剂和第三组添加剂中的抑制剂。

[0069] 第三培养基还包含细胞因子,例如像制瘤素M(OSM)。在使用抑癌素M作为细胞因子的实施方案中,所述抑癌素M可以在第三培养基中以至少10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29ng/ml的浓度存在。在使用抑癌素M作为细胞因子的实施方案中,所述抑癌素M可以在第三培养基中以不超过30、29、28、27、26、25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11ng/ml或更低的浓度存在。在使用抑癌素M作为细胞因子的实施方案中,所述抑癌素M可以在第三培养基中介于约10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28或29与约30、29、28、27、26、25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12或11ng/ml之间的浓度存在。在一个具体实施方案中,抑癌素M在第三培养基中以约20ng/ml的浓度存在。

[0070] 第三培养基还包含糖皮质激素,例如像地塞米松。在使用地塞米松作为糖皮质激素的实施方案中,所述地塞米松可以在第三培养基中以至少5、6、7、8、9、10、11、12、13、14μM或更高的浓度存在。在使用地塞米松作为糖皮质激素的实施方案中,所述地塞米松可以在第三培养基中以不超过15、14、13、12、11、10、9、8、7、6μM或更低的浓度存在。在使用地塞米松作为糖皮质激素的实施方案中,所述地塞米松可以在第三培养基中介于约5、6、7、8、9、10、11、12、13或14与约15、14、13、12、11、10、9、8、7或6μM之间的浓度存在。在一个具体实施方案中,地塞米松在第三培养基中以约10μM的浓度存在。

[0071] 第三培养基保持与肝祖细胞和肝细胞谱系细胞接触至少一天或更长时间以允许

分化。如果要使第三培养基与培养的细胞接触超过一天，则可每天更换一次所述第三培养基。在本公开方法的一些实施方案中，第三培养基保持与培养的细胞接触至少1、2、3、4或更多天。在另一个实施方案中，第三培养基保持与培养的细胞接触不超过5、4、3、2或更少天。在另一个实施方案中，第三培养基保持与培养的细胞接触至少1、2、3、4或更多天并且不超过5、4、3、2或更少天。在又一个实施方案中，第三培养基保持与培养的细胞接触约1与5天之间。

[0072] 将第三培养基与前肠后段细胞一起使用可使肝祖细胞分化成肝细胞谱系细胞。因此，本公开提供了从本文所描述的方法获得的肝细胞谱系细胞群。在本公开的肝细胞谱系细胞群中，大多数细胞被认为是肝细胞谱系细胞，并且在一些实施方案中，可包括一些肝祖细胞和/或内胚层细胞。

[0073] 第四培养基包含第四组添加剂，所述第四组添加剂包含以下或基本上由以下组成：胰岛素信号传导途径的激活剂、细胞因子和糖皮质激素。如在本公开的上下文中所使用的，表述“第四培养基基本上由第四组添加剂组成”是指第四培养基包含另外的添加剂，这些添加剂对于肝细胞谱系细胞向成熟肝细胞样细胞的分化不是必需的，但是仍然能促进分化。这些另外的添加剂包括但不限于B27补充剂、原代肝细胞补充剂(PHH)、胰岛素、HBM/HCM Bulletkit™视黄酸、维生素和矿物质。

[0074] 第四培养基还包含胰岛素信号传导途径的激活剂。如在本公开的上下文中所使用的，“胰岛素信号传导途径的激活剂”是指能够激活与胰岛素同其同源胰岛素受体(酪氨酸激酶受体)的结合相关的信号传导途径的化合物。所述化合物可以是胰岛素受体的激动剂(胰岛素，IGF-I或IGF-II)，已知在胰岛素信号传导途径中被激活的多肽的激活剂，和/或已知在胰岛素信号传导途径中被抑制的多肽的抑制剂。在一个实施方案中，激活剂是胰岛素(其可以按重组或纯化形式提供)。在提供胰岛素作为胰岛素信号传导途径的激活剂的实施方案中，所述胰岛素可以至少约1、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95或更高ng/mL第四培养基的浓度提供。在提供胰岛素作为胰岛素信号传导途径的激活剂的实施方案中，所述胰岛素可以不超过约100、95、90、85、80、75、70、65、60、55、50、45、40、35、30、25、20、15、10、5或更低ng/mL第四培养基的浓度提供。在提供胰岛素作为胰岛素信号传导途径的激活剂的实施方案中，所述胰岛素可以介于约1、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90或95与约100、95、90、85、80、75、70、65、60、55、50、45、40、35、30、25、20、15、10或5第四培养基之间的浓度提供。在一些特定实施方案中，胰岛素可以约10mg/ml第四培养基的浓度提供。在又一个实施方案中，以B27补充剂，以HBM/HCM Bulletkit™和/或原代肝细胞(PHH)补充剂的形式提供胰岛素。

[0075] 第四培养基还包含细胞因子，例如像制瘤素M(OSM)。在使用抑癌素M作为细胞因子的实施方案中，所述抑癌素M可以在第四培养基中以至少10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29ng/ml的浓度存在。在使用抑癌素M作为细胞因子的实施方案中，所述抑癌素M可以在第四培养基中以不超过30、29、28、27、26、25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11ng/ml或更低的浓度存在。在使用抑癌素M作为细胞因子的实施方案中，所述抑癌素M可以在第四培养基中介于约10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28或29与约30、29、28、27、26、25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12或11ng/ml之间的浓度存在。在一个具体实施方案中，抑癌素M在第四培

养基中以约20ng/ml的浓度存在。

[0076] 第四培养基还包含糖皮质激素，例如像地塞米松。在使用地塞米松作为糖皮质激素的实施方案中，所述地塞米松可以在第四培养基中以至少5、6、7、8、9、10、11、12、13、14μM或更高的浓度存在。在使用地塞米松作为糖皮质激素的实施方案中，所述地塞米松可以在第四培养基中以不超过15、14、13、12、11、10、9、8、7、6μM或更低的浓度存在。在使用地塞米松作为糖皮质激素的实施方案中，所述地塞米松可以在第四培养基中介于约5、6、7、8、9、10、11、12、13或14与约15、14、13、12、11、10、9、8、7或6μM之间的浓度存在。在一个具体实施方案中，地塞米松在第四培养基中以约10μM的浓度存在。

[0077] 第四培养基保持与肝细胞谱系细胞和未成熟肝细胞样细胞接触至少一天或更长时间以允许分化。如果要使第四培养基与培养的细胞接触超过一天，则可每天更换一次所述第四培养基。在本公开方法的一些实施方案中，第四培养基保持与培养的细胞接触至少1、2、3、4或更多天。在另一个实施方案中，第四培养基保持与培养的细胞接触不超过5、4、3、2或更少天。在另一个实施方案中，第四培养基保持与培养的细胞接触至少1、2、3、4或更多天并且不超过5、4、3、2或更少天。在又一个实施方案中，第四培养基保持与培养的细胞接触约1与5天之间。

[0078] 将第四培养基与前肠后段细胞一起使用可使肝细胞谱系细胞分化成未成熟的肝细胞样细胞。因此，本公开提供了从本文所描述的方法获得的未成熟肝细胞样细胞群。在本公开的未成熟肝细胞样细胞群中，大多数细胞被认为是未成熟肝细胞样细胞，并且在一些实施方案中，可包括肝细胞谱系的一些细胞、肝祖细胞和/或内胚层细胞。

[0079] 第五培养基包含第五组添加剂，所述第五组添加剂包含以下或基本上由以下组成：胰岛素信号传导途径的激活剂和糖皮质激素。第五培养基和第五组添加剂不包括细胞因子，例如像制瘤素M。如在本公开的上下文中所使用的，表述“第五培养基基本上由第五组添加剂组成”是指第五培养基包含另外的添加剂，这些添加剂对于未成熟肝细胞样细胞向成熟肝细胞样细胞的分化不是必需的，但是仍然能促进分化。这些另外的添加剂包括但不限于B27补充剂、原代肝细胞补充剂、视黄酸、胰岛素、维生素、HBM/HCM Bulletkit™和矿物质。

[0080] 第五培养基还包含胰岛素信号传导途径的激活剂。如在本公开的上下文中所使用的，“胰岛素信号传导途径的激活剂”是指能够激活与胰岛素同其同源胰岛素受体(酪氨酸激酶受体)的结合相关的信号传导途径的化合物。所述化合物可以是胰岛素受体的激动剂(胰岛素，IGF-I或IGF-II)，已知在胰岛素信号传导途径中被激活的多肽的激活剂，和/或已知在胰岛素信号传导途径中被抑制的多肽的抑制剂。在一个实施方案中，激活剂是胰岛素(其可以按重组或纯化形式提供)。在提供胰岛素作为胰岛素信号传导途径的激活剂的实施方案中，所述胰岛素可以至少约1、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95或更高ng/mL第五培养基的浓度提供。在提供胰岛素作为胰岛素信号传导途径的激活剂的实施方案中，所述胰岛素可以不超过约100、95、90、85、80、75、70、65、60、55、50、45、40、35、30、25、20、15、10、5或更低ng/mL第五培养基的浓度提供。在提供胰岛素作为胰岛素信号传导途径的激活剂的实施方案中，所述胰岛素可以介于约1、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90或95与约100、95、90、85、80、75、70、65、60、55、50、45、40、35、30、25、20、15、10或5第五培养基之间的浓度提供。在一些特定实施方案中，胰岛素可

以约10mg/ml第五培养基的浓度提供。在又一个实施方案中，以B27补充剂，以HBM/HCM Bulletkit™和/或原代肝细胞(PHH)补充剂的形式提供胰岛素。

[0081] 第五培养基还包含糖皮质激素，例如像地塞米松。在使用地塞米松作为糖皮质激素的实施方案中，所述地塞米松可以在第五培养基中以至少5、6、7、8、9、10、11、12、13、14μM或更高的浓度存在。在使用地塞米松作为糖皮质激素的实施方案中，所述地塞米松可以在第五培养基中以不超过15、14、13、12、11、10、9、8、7、6μM或更低的浓度存在。在使用地塞米松作为糖皮质激素的实施方案中，所述地塞米松可以在第五培养基中介于约5、6、7、8、9、10、11、12、13或14与约15、14、13、12、11、10、9、8、7或6μM之间的浓度存在。在一个具体实施方案中，地塞米松在第五培养基中以约10μM的浓度存在。在一个具体实施方案中，地塞米松在第五培养基中以约10μM的浓度存在。

[0082] 第五培养基保持与未成熟肝细胞样细胞和成熟肝细胞样细胞接触至少一天或更长时间以允许分化。如果要使第五培养基与培养的细胞接触超过一天，则可每天更换一次所述第五培养基。在本公开方法的一些实施方案中，第五培养基保持与培养的细胞接触至少1、2、3、4或更多天。在另一个实施方案中，第五培养基保持与培养的细胞接触不超过5、4、3、2或更少天。在另一个实施方案中，第五培养基保持与培养的细胞接触至少1、2、3、4或更多天并且不超过5、4、3、2或更少天。在又一个实施方案中，第五培养基保持与培养的细胞接触约1与5天之间。

[0083] 将第五培养基与前肠后段细胞一起使用可使未成熟肝细胞样细胞分化成成熟肝细胞样细胞。因此，本公开提供了从本文所描述的方法获得的成熟肝细胞样细胞群。在本公开的成熟肝细胞样细胞群中，大多数细胞被认为是成熟肝细胞样细胞，并且在一些实施方案中，可包括一些未成熟肝细胞样细胞、肝谱系细胞、肝祖细胞和/或内胚层细胞。

[0084] 本文所描述的培养基明确排除具有EGF，因为它可促进胆管细胞的形成。

[0085] 本公开提供了本文所描述的第一方法、第二方法和/或第三方法的结合。例如，可将第一方法与第二方法组合以由内胚层细胞制备肝祖细胞。在另一个实例中，可将第二方法与第三方法组合以由前肠后段细胞制备肝细胞样细胞。在另一个实例中，可将第一方法、第二方法和第三方法组合以由内胚层细胞制备肝细胞样细胞。本文所描述的方法产生大量肝细胞样细胞和/或具有更强的生物活性(例如，更高的Cyp3A4活性，更高的白蛋白表达水平和/或更高的尿素生产水平)并且/或者能够代谢治疗剂(或潜在治疗剂)的肝细胞样细胞。该特定实施方案对于制备意欲包括在如下文所指示的包封肝组织中的肝细胞样细胞特别有用，因为它提供了

[0086] 本公开还提供了用于制备前肠后段细胞、肝祖细胞和/或肝细胞样细胞的试剂盒的部件。广泛地，所述试剂盒包含至少一组如本文所描述的添加剂或至少一种如本文所描述的培养基，任选的细胞以及用以执行本文所描述的方法的说明书。用于制备前肠后段细胞的试剂盒可包括例如第一组添加剂或第一培养基，任选的内胚层细胞以及用于执行第一方法的说明书。用于制备肝祖细胞的试剂盒可包括例如第二组添加剂或第二培养基，任选的前肠后段细胞以及用于执行第二方法的说明书。用于制备肝细胞样细胞的试剂盒可包括例如第三组添加剂或第三培养基，第四组添加剂或第四培养基，第五组添加剂或第五培养基，任选的肝祖细胞、肝谱系细胞或未成熟肝细胞样细胞以及用于执行第三方法的说明书。

[0087] 包封的肝组织

[0088] 所述包封的肝组织包含至少一个(并且在一个实施方案中包含多个)肝类器官,所述肝类器官至少部分地被生物相容性交联聚合物覆盖。如在本公开的上下文中所使用的,“肝类器官”是指培养的肝细胞、间充质细胞和任选的内皮细胞的混合物,其中已经使用本文所描述的方法获得了肝细胞。在一些实施方案中,肝类器官包含培养的肝细胞、间充质细胞和内皮细胞的混合物。肝类器官通常为球形的形状并且其表面可以是不规则的。肝类器官的相对直径介于约50与约500μm之间。肝的细胞核心由肝细胞、间充质细胞和任选的内皮细胞组成,并且在一些实施方案中,细胞外基质、肝细胞、间充质细胞和任选的内皮细胞在培养时已经产生和组装。可通过在悬浮液中培养所述细胞来获得肝类器官。在一些实施方案中,特别是在包封的肝组织的培养/分化之前,所述肝类器官的表面至少部分地被(并且在一些实施方案中基本上被)肝细胞例如像肝细胞和/或胆管上皮细胞覆盖。在另一个实施方案中,肝细胞分散在整个细胞核心中(但不必是均匀的)。存在于包封的肝组织中的类器官至少部分地被(并且在一些实施方案中基本上被)第一生物相容性交联聚合物覆盖。

[0089] 在被包封之前,肝类器官不含外源性细胞外基质。肝类器官基本上由培养的肝细胞、间充质细胞和任选的内皮细胞组成。此外,肝类器官(包封或未包封在第一生物相容性聚合物中)表现出肝功能,例如,所述肝类器官能够合成白蛋白以及凝血因子,表现出CyP3A4活性,将氨解毒成尿素并执行药物(即他克莫司或利福平)的肝特异性代谢。

[0090] 本公开的肝类器官基本上是球形的形状并且具有在微米范围内的相对直径(例如,直径小于1mm)。在一个实施方案中,所述肝类器官在其包封之前具有至少约50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、410、420、430、440、450、460、470、480或490μm的相对直径。在又一个实施方案中,所述肝类器官在其包封之前具有等于或小于约500、490、480、470、460、450、440、430、420、410、400、390、380、370、360、350、340、330、320、310、300、290、280、270、260、250、240、230、220、210、200、190、180、170、160、150、140、130、120、110、100、90、80、70或60μm的相对直径。在另一个实施方案中,所述肝类器官在其包封之前具有介于至少约50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、410、420、430、440、450、460、470、480或490μm与等于或小于约500、490、480、470、460、450、440、430、420、410、400、390、380、370、360、350、340、330、320、310、300、290、280、270、260、250、240、230、220、210、200、190、180、170、160、150、140、130、120、110、100、90、80、70或60μm之间的相对直径。在一些实施方案中,所述肝类器官在其包封之前具有介于至少约100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280或290μm与等于或小于约300、290、280、270、260、250、240、230、220、210、200、190、180、170、160、150、140、130、120、110、100、90、80、70或60μm之间的相对直径。在又一个实施方案中,所述肝类器官在其包封之前具有至少约100μm且等于或小于约300μm的相对直径。例如,所述肝类器官在其包封之前具有至少约150、160、170、180或190μm且低于200、190、180、170或160μm的相对直径。在又一个实施方案中,所述肝类器官在其包封之前具有至少约150μm且等于或小于约200μm的相对直径。所述肝类器官的大小允许其包含的细胞增加对各种营养物以及与包封的肝组织接触的生物流体/细胞的暴露。在一些实施方案中,这允许肝类器官能够在体内保持活力和生物活性,而不需要用宿主的血管系统使它们血管化

(例如,宿主的血管系统已经接受了包封的肝组织)。

[0091] 所述肝类器官的肝细胞可分散在整个类器官中,并且在一些实施方案中,它们中的一些可位于肝类器官的细胞核心的表面处。所述肝类器官的肝细胞可以是例如来自定形内胚层、前肠后段细胞、肝细胞谱系细胞或肝祖细胞或肝细胞样细胞的细胞。所述肝类器官的肝细胞可以是肝细胞样细胞和/或胆管上皮细胞。所述肝类器官的肝细胞可来自单一细胞类型(例如,定形内胚层细胞、前肠后段细胞、肝细胞谱系细胞、肝细胞样细胞或胆管上皮细胞)或来自多种细胞类型的混合物(例如,以下细胞类型中的至少两种的混合物:定形内胚层细胞、前肠后段细胞、肝细胞谱系细胞、肝细胞样细胞和/或胆管上皮细胞)。在肝类器官的体外细胞培养期间或甚至当肝类器官置于体内时,所述一种或多种肝细胞类型的表型可改变或者所述肝细胞可分化。例如,在与间充质细胞和任选的内皮细胞共培养期间或置于体内时,所述肝类器官的肝细胞可分化(从定形内胚层细胞、前肠后段细胞或肝细胞谱系细胞至肝细胞样细胞或胆管上皮细胞)。为了确定肝类器官中是否存在肝细胞样细胞,可通过本领域中已知的方法来测定细胞色素P450家族3亚家族A成员4(CyP3A4)的活性。还可监测白蛋白、凝血因子和尿素的合成/产生以及CyP3A4的活性,以确定所述肝类器官中是否存在肝细胞样细胞。为了确定肝类器官中是否存在定形内胚层细胞或前肠后段细胞,可通过本领域中已知的方法来测定SOX17、FOXA2、CXCR4、GATA4的表达。

[0092] 肝类器官的间充质细胞可以是例如不同起源(骨髓(包括血液)、脐带或脂肪组织)的间充质干细胞/祖细胞、脂肪细胞、肌细胞、肝星状细胞、成肌纤维细胞和/或成纤维细胞。肝类器官的间充质细胞可来自单一细胞类型(例如,间充质干细胞/祖细胞、脂肪细胞、肌细胞或成纤维细胞)或来自多种细胞类型的混合物(例如,以下细胞类型中的至少两种的混合物:间充质干细胞/祖细胞、脂肪细胞、肌细胞、肝星状细胞、成肌纤维细胞和/或成纤维细胞)。在与肝细胞和任选的内皮细胞共培养期间或置于体内时,肝类器官的间充质细胞的类型可分化(从间充质干细胞/祖细胞至成纤维细胞、脂肪细胞或肌细胞)。已知间充质干细胞/祖细胞除了其他基因外还表达α平滑肌肌动蛋白(αSMA)、纤连蛋白、CD90和CD73。为了确定肝类器官中间充质细胞的位置或存在,尤其可能确定对间充质谱系具有特异性或与间充质谱系相关的基因或蛋白质的表达。

[0093] 当存在时,肝类器官的内皮细胞可以是例如内皮祖细胞和/或各种起源的内皮细胞。肝类器官的内皮细胞可来自单一细胞类型(例如,内皮祖细胞或内皮细胞)或来自多种细胞类型的混合物(例如,内皮祖细胞和内皮细胞的混合物)。在与内胚层细胞和间充质细胞体外共培养期间或置于体内时,肝类器官的内皮细胞的类型可分化(从内皮祖细胞至内皮细胞)。在一些实施方案中,肝类器官的内皮细胞可以毛细血管或毛细血管样构型组构,其中内皮细胞排列在管腔的内表面(其可以是部分的)。

[0094] 如上所述,肝类器官的细胞核心由肝细胞、间充质细胞和任选的内皮细胞组成,并且在一些实施方案中,由在培养期间由所述细胞产生和假定的细胞外基质组成。肝类器官的细胞核心在坏死/凋亡细胞中基本上较差(例如,当通过组织学进行检查时它没有坏死区域),因为来自培养肝类器官的培养基的营养物可扩散跨过细胞核心,并且因此可递送至所述细胞核心内的细胞,并且所述细胞核心的细胞的代谢废物可扩散出肝类器官。肝类器官本身(在封装前)不包含(例如,不含)外源性细胞外基质或合成聚合物材料。在一些实施方案中,肝细胞可存在于细胞核心的表面上。在另一个实施方案中,肝细胞可与细胞核心的细

胞组合产生并组装细胞外基质材料(例如胶原蛋白和纤连蛋白),并且在一些实施方案中产生并组装基底膜材料。

[0095] 如上所述,肝细胞可至少部分地覆盖肝类器官的细胞核心的表面。在本公开的上下文中,表述"肝细胞至少部分地覆盖细胞核心的表面"表示肝细胞占据细胞核心的表面的至少约10%、20%、30%或40%。在一些实施方案中,肝细胞基本上覆盖细胞核心的表面。在本公开的上下文中,表述"肝细胞基本上覆盖细胞核心的表面"表示肝细胞占据细胞核心的表面的大部分,例如细胞核心的表面的至少约50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%。在一个实施方案中,肝细胞完全覆盖细胞核心的表面(例如,细胞核心的超过99%的表面被肝细胞覆盖)。

[0096] 在一个实施方案中,本公开的肝类器官在包封于第一交联的生物相容性聚合物中之前具有比在哺乳动物肝脏中观察到的肝细胞样细胞和/或胆管上皮细胞更高比例的间充质细胞(和当存在时内皮细胞)。然而,在包封于第一交联的生物相容性聚合物中之后,与间充质细胞(和当存在时内皮细胞)相比时,本公开的肝类器官具有更高比例的肝细胞。已知哺乳动物肝脏由约90%的肝细胞组成。因此,在本公开的一些实施方案中,肝类器官中肝细胞的比例低于约90%、85%、80%或75%(与肝类器官的细胞总数相比)。

[0097] 肝类器官可由不同起源的细胞制成。在一个实施方案中,肝细胞、间充质细胞或内皮细胞中的至少一种是来自哺乳动物,例如人。在另一个实施方案中,肝细胞、间充质细胞或内皮细胞中的至少两种是来自哺乳动物,例如人。在另一个实施方案中,肝细胞、间充质细胞和内皮细胞都来自哺乳动物,例如人。在肝类器官内,可组合来自不同起源的细胞。例如,间充质细胞和内皮细胞可来自鼠或猪起源,而肝细胞可来自人起源。这些组合并非详尽的,并且本领域技术人员将设想可适用于本公开背景下的另外组合。

[0098] 肝类器官的细胞可源自不同来源。例如,肝类器官的细胞可源自原代细胞培养物、已建立的细胞系或分化的干细胞。在肝类器官内,可组合来自不同来源的细胞。例如,肝细胞可来自原代细胞培养物,间充质细胞可来自已建立的细胞系,并且内皮细胞可来自分化的细胞系。或者,在肝类器官内,也可组合来自相同来源(例如分化的干细胞)的细胞。该实施方案是特别有用的,因为它允许从单一细胞来源(例如干细胞)获得用于制备包封的肝组织的细胞。在一个具体实施方案中,肝类器官的细胞源自单一干细胞群,其已在肝细胞、间充质细胞和任选的内皮细胞中分化。干细胞群可来自胚胎干细胞或诱导型多能干细胞。在一个具体实施方案中,肝类器官的细胞源自单一多能干细胞群,其已在肝细胞、间充质细胞和任选的内皮细胞中分化。

[0099] 可用于包封的肝组织中的聚合物(也称为聚合物基质)在一个或多个肝类器官周围形成水凝胶。如本领域已知的,水凝胶是指亲水性的聚合物链,其中水是分散介质。水凝胶可从天然或合成的聚合物网络获得。在本公开的上下文中,包封在水凝胶内防止包埋的肝类器官从聚合物中泄漏,从而消除或降低肝类器官的细胞可能在植入后在受体体内引起免疫反应或肿瘤的风险。在一个实施方案中,每个肝类器官被单独包封,并且在另一个实施方案中,包封的肝类器官可进一步包含在聚合物基质中。在又一个实施方案中,肝类器官被包含在聚合物基质中以包封它们。

[0100] 在本公开的上下文中,当被引入受试者(例如,例如人)时不表现出毒性时,聚合物被认为是"生物相容性的"。在本公开的上下文中,优选的是生物相容性聚合物当置于受试

者(例如,例如人)体内时不表现出对肝类器官的细胞的毒性。可例如通过测定以下来测量肝毒性:肝细胞样细胞凋亡死亡率(例如,其中细胞凋亡增加指示肝毒性)、转氨酶水平(例如,其中转氨酶水平增加指示肝毒性)、肝细胞样细胞膨胀(例如,其中膨胀增加指示肝毒性)、肝细胞样细胞中的微泡性脂肪变性(例如,其中脂肪变性增加指示肝毒性)、胆管细胞死亡率(例如,其中胆管细胞死亡率增加指示肝毒性)、γ-谷氨酰转肽酶(GGT)水平(例如,其中GGT水平增加指示肝毒性)。生物相容性聚合物包括但不限于碳水化合物(糖胺聚糖诸如透明质酸(HA)、硫酸软骨素、硫酸皮肤素、硫酸角质素、硫酸乙酰肝素、藻酸盐、壳聚糖、肝素、琼脂糖、葡聚糖、纤维素和/或其衍生物)、蛋白质(胶原蛋白、弹性蛋白、纤维蛋白、白蛋白、聚(氨基酸)、糖蛋白、抗体和/或其衍生物)和/或合成聚合物(例如,基于聚(乙二醇)(PEG)、聚(甲基丙烯酸羟乙酯)(PHEMA)和/或聚(乙烯醇)(PVA))。生物相容性聚合物可以是单一聚合物或不同聚合物的混合物(例如US2012/0142069中描述的那些)。示例性生物相容性聚合物包括但不限于聚(乙)二醇、聚乳酸(PLA)、聚乙醇酸(PGA)、聚己内酯(PCL)、纤维蛋白、多糖材料(如壳聚糖、蛋白聚糖或糖胺聚糖(GAG))、藻酸盐、胶原蛋白、硫醇化肝素以及它们的混合物。在一些实施方案中,生物相容性聚合物可以是线性的、支化的并且任选地与肽(例如,RGD)、生长因子、整联蛋白或药物接枝。

[0101] 在一些实施方案中,所述聚合物是“低免疫原性聚合物”,并且在接受者中不会引发免疫应答或仅引发最小的免疫应答(即不导致聚合物的降解、修饰或功能丧失)。当将这种抗原决定簇引入同种异体受试者时,这种低免疫原性聚合物还能够掩蔽细胞的一种或多种抗原决定簇并降低或甚至防止对抗原决定簇的免疫应答。

[0102] 存在于本公开的包封的肝组织中的聚合物优选地是可交联的,例如,能够交联。所述聚合物可热交联、化学交联(例如,通过使用一种或多种肽,诸如VPMS、RGD等)或通过使用pH或光(例如,光聚合,例如使用UV光)交联。在一些实施方案中,交联可在肝类器官(被或不被聚合物基质包封)已经分散在聚合物基质中之后进行。

[0103] 本公开的聚合物可以是完全或部分地可生物降解的(例如,易于通过活生物体的代谢水解)或完全或部分地抗生物降解(例如,当经受活生物体的代谢时抗水解)。示例性生物相容性且可生物降解的聚合物包括但不限于聚(乙二醇)-马来酰亚胺(PEG-Mal)8-臂。示例性生物相容性和抗生物降解性聚合物包括但不限于聚(乙二醇)-乙烯基砜(PEG-VS)。

[0104] 包封的肝组织包含第一生物相容性且交联的聚合物,所述聚合物至少部分地(并且在一些情况下基本上)覆盖肝类器官。所述第一生物相容性聚合物与肝类器官的细胞物理接触。在本公开的上下文中,表述“一个或多个肝类器官至少部分地被第一生物相容性且交联的聚合物覆盖”表示第一生物相容性且交联的聚合物占据肝类器官的表面的至少约10%、20%、30%或40%。在一些实施方案中,所述第一生物相容性且交联的聚合物基本上覆盖一个或多个肝类器官的表面。在本公开的上下文中,表述“一个或多个肝类器官基本上被第一生物相容性且交联的聚合物覆盖”表示第一生物相容性且交联的聚合物占据肝类器官的表面的大部分,例如类器官的表面的至少约50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%。在一个实施方案中,所述第一生物相容性且交联的聚合物完全覆盖肝类器官的表面(例如,肝类器官的超过99%的表面被第一生物相容性且交联的聚合物)覆盖。

[0105] 在一些实施方案中,包封的肝组织还可包含第二生物相容性且交联的聚合物,所述第二生物相容性且交联的聚合物至少部分地(并且在一些情况下基本上)覆盖第一生物

相容性且交联的聚合物。第二生物相容性聚合物与第一生物相容性交联聚合物物理接触，并且在多个实施方案中，与肝类器官的细胞物理接触。在本公开的上下文中，表述“第一生物相容性交联聚合物至少部分地被第二生物相容性且交联的聚合物覆盖”表示第二生物相容性且交联的聚合物占据第一生物相容性且交联的第一聚合物的表面的至少约10％、20％、30％或40％。在一些实施方案中，第二生物相容性且交联的聚合物基本上覆盖第一生物相容性且交联的聚合物的表面。在本公开的上下文中，表述“第一生物相容性且交联的聚合物基本上被第二生物相容性且交联的聚合物覆盖”表示第二生物相容性且交联的聚合物占据第一生物相容性且交联的聚合物的表面的大部分，例如，第一生物相容性且交联的第一聚合物的表面的至少约50％、60％、70％、80％、90％、95％、99％。在一个实施方案中，所述第二生物相容性且交联的聚合物完全覆盖第一生物相容性且交联的聚合物的表面(例如，第一生物相容性且交联的聚合物的超过99％的表面被第二生物相容性且交联的聚合物覆盖)。在又一个实施方案中，第二生物相容性且交联的聚合物形成基质，肝类器官(其至少部分地被第一生物相容性且交联的聚合物覆盖)散布在所述基质中。在这样的实施方案中，肝类器官(其至少部分地被第一生物相容性且交联的聚合物覆盖)可被第二生物相容性且交联的基质包围或可与另一个肝类器官(其至少部分地被第一生物相容性且交联的聚合物覆盖)物理接触。包封的肝组织可包含另一种生物相容性且交联的聚合物，以覆盖第二生物相容性且交联的聚合物。

[0106] 第一和第二生物相容性且交联的聚合物可相同或不同。在一个实施方案中，第一生物相容性且交联的聚合物是至少部分(并且在一些实施方案中完全)可生物降解的聚合物。组合地或替代地，第二生物相容性且交联的聚合物至少部分(并且在一些实施方案中完全)抗生物降解。在又一个实施方案中，第一生物相容性且交联的聚合物是可生物降解的聚合物，并且第二生物相容性且交联的聚合物抗生物降解。在这样的实施方案中，第一生物相容性交联聚合物可比第二生物相容性交联聚合物更可生物降解(例如，抗生物降解性更低)。

[0107] 在一些实施方案中，第一生物相容性且交联的聚合物包含多个肝类器官。在这样的实施方案中，包封的肝组织可包含每cm^2至少约50、60、70、80、90、100、125、150、175、200、250、300、350、400、450或500个肝类器官。在又一个实施方案中，包封的肝组织可包含每cm^2至多约500、450、400、350、300、250、200、175、150、125、100、90、80、70、60或50个肝类器官。在又一个实施方案中，包封的肝组织包含每cm^2介于约50、60、70、80、90、100、125、150、175、200、250、300、350、400或450与约500、450、400、350、300、250、200、175、150、125、100、90、80、70或60个之间的肝类器官。在又一个实施方案中，包封的肝组织包含每cm^2介于约50与500个之间的肝类器官。在另一个实施方案中，包封的肝组织包含每cm^3至少约250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000、1100、1200、1300、1400、1500、1600、1700、1800、1900、2000、2100、2200、2300、2400或2500个肝类器官。在又一个实施方案中，包封的肝组织包含每cm^3至多约2500、2400、2300、2200、2100、2000、1900、1800、1700、1600、1500、1400、1300、1200、1100、1000、950、900、850、800、750、700、650、600、550、500、450、400、350、300或250个肝类器官。在又一个实施方案中，包封的肝组织包含每cm^3介于约250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000、1100、1200、1300、1400、1500、1600、1700、1800、1900、2000、2100、2200、2300或2400与约2500、

2400、2300、2200、2100、2000、1900、1800、1700、1600、1500、1400、1300、1200、1100、1000、950、900、850、800、750、700、650、600、550、500、450、400、350或300个之间的肝类器官。在又一个实施方案中，包封的肝组织包含每cm^3介于约250与2500个之间的肝类器官。

[0108] 在一个实施方案中，在培养中或在植入体内时包封的肝组织能够表达与肝细胞、间充质细胞和任选的内皮细胞相关的基因和蛋白质。在另一个实施方案中，包封的肝组织(体外或体内)能够产生白蛋白，由氨制备尿素，表现出CyP3A4活性和/或代谢药物(已知由肝代谢，诸如他克莫司和/或利福平)。在一些实施方案中，包封的肝组织能够产生所述组织中的每g肝类器官1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20mg的白蛋白。在另一个实施方案中，在一个或多个冻融循环后，包封的肝组织能够表达与肝细胞、间充质细胞和任选的内皮细胞相关的基因和蛋白质，产生白蛋白，从氨制备尿素，表现出CyP3A4活性和/或药物(诸如他克莫司和/或利福平)的肝特异性代谢。在一些实施方案中，在冷冻后，包封的肝组织能够产生所述组织中的每g肝类器官1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20mg的白蛋白。

[0109] 用于制备包封的肝组织的方法

[0110] 用于制备包封的肝组织的方法首先需要制备一个或多个肝类器官，且然后将它(它们)(至少部分地)包封在第一生物相容性且交联的聚合物中(并且任选地包封在第二和另一种生物相容性交联聚合物中)。

[0111] 所述肝类器官可通过在获得肝类器官所需的条件下共培养肝细胞、间充质细胞和任选的内皮细胞(全部如上所述)来制备，所述肝类器官具有(i)包含肝细胞、间充质细胞和任选的内皮细胞的细胞核心，(ii)基本上球形的形状，以及(iii)介于约50与约500μm之间的相对直径。在一些实施方案中，这些条件包括在悬浮液中(例如，超低粘附条件)培养细胞，从而促进肝类器官的形成。

[0112] 待包含在包封的肝组织中的肝细胞可从不同起源(例如哺乳动物)和来源(原代细胞培养物、细胞系、分化的干细胞)获得，前提条件是它们已经经受至少一种如本文所描述的方法。肝细胞可来自不同类型，诸如定形内胚层细胞、前肠后段细胞、肝细胞谱系细胞、肝细胞样细胞和/或胆管上皮细胞。来自单个类器官的肝细胞可来自相同或不同的起源、相同或不同的来源以及相同或不同的类型。

[0113] 待包含在包封的肝组织中的间充质细胞可从不同起源(例如哺乳动物)和来源(原代细胞培养物、细胞系、分化的干细胞)获得。间充质细胞可来自不同类型，诸如间充质干细胞、脂肪细胞、肌细胞或成纤维细胞。来自单个类器官的间充质细胞可来自相同或不同的起源、相同或不同的来源以及相同或不同的类型。在一个实施方案中，使用间充质干细胞/祖细胞。在又一个实施方案中，间充质干细胞/祖细胞通过分化干细胞(诸如多能干细胞)获得。在又一个实施方案中，间充质干细胞/祖细胞从分化多能干细胞(例如通过在塑料上培养多能干细胞而不包被在补充有剔除血清替代物的DMEM高葡萄糖中)获得。在形成肝类器官之前，间充质细胞可新鲜使用或冷冻保存。

[0114] 当存在时，待包含在包封的肝组织中的内皮细胞可从不同起源(例如哺乳动物)和来源(原代细胞培养物、细胞系、分化的干细胞)获得。内皮细胞可来自不同的类型，诸如内皮祖细胞和内皮细胞。在一个实施方案中，使用内皮祖细胞。来自单个类器官的内皮细胞可来自相同或不同的起源、相同或不同的来源以及相同或不同的类型。在又一个实施方案中，

内皮祖细胞通过分化多能细胞(诸如多能干细胞)获得。在又一个实施方案中,内皮祖细胞从分化多能干细胞(例如通过用CHIR99021和/或激活素A与BMP4、bFGF和/或VEGF的组合培养多能干细胞)获得。在形成肝类器官之前,内皮细胞可新鲜使用或冷冻保存。

[0115] 在一个实施方案中,肝类器官由单一多能干细胞群制备。可使用本领域已知的方法,诸如病毒转导(例如通过使用仙台病毒系统)或使用合成mRNA方法来诱导多能干细胞。多能干细胞群可从诱导型多能干细胞(iPSC)的一个或多个集落获得。在从同一多能干细胞群制备肝类器官的实施方案中,将iPSC群体分成至少两个(并且在一些实施方案中至少三个)亚群,每个亚群经受不同的培养条件以产生肝细胞和间充质细胞(并且,在一些实施方案中,内皮细胞)。

[0116] 一旦获得不同的细胞中的每种,就将它们组合并在悬浮液中培养以产生肝类器官。为了控制肝类器官的大小,有可能在极低粘附条件下(例如在悬浮液中)使用直径介于100至1000μm之间的微腔培养细胞。在一些实施方案中,所述微腔具有每cm^2约500μm的直径和深度。在一些实施方案中,一旦形成原始肝类器官,就可将它们在生物反应器中悬浮培养(用于扩增)。在一个实施方案中,将肝细胞和间充质细胞在培养之前以1个内胚层细胞与0.1-0.7个间充质细胞的比例组合。在又一个实施方案中,当存在内皮细胞时,在培养之前将它们与内胚层细胞以1个内胚层细胞0.2-1个内皮细胞的比例组合。在又一个实施方案中,在培养之前,肝细胞、间充质细胞与内皮细胞之间的比例是1:0.2:0.7。应理解,在培养期间,不同细胞之间的比例可改变,因为一些将优先增殖,而其他将优先分化。还应理解,可使用其他比例来获得如本文所描述的肝类器官。在制备肝类器官的过程期间,不需要物理支架或外源性基质材料(除组织培养容器外)。

[0117] 肝类器官可直接用于制备包封的肝组织。在一个实施方案中,所述肝类器官可在它们被引入包封的肝组织之前冷冻保存。

[0118] 可用于包封的肝组织中的聚合物在一个或多个肝类器官周围形成水凝胶。如本领域已知的,水凝胶是指亲水性的聚合物链,其中水是分散介质。水凝胶可从天然或合成的聚合物网络获得。在本公开的上下文中,包封在水凝胶内防止包埋的肝类器官从聚合物中泄漏,从而消除或降低肝类器官的细胞可能在植入后在受体体内引起免疫反应或肿瘤的风险。

[0119] 在本公开的上下文中,当被引入受试者(例如,例如人)时不表现出对肝类器官的细胞的毒性时,聚合物被认为是“生物相容性的”。在本公开的上下文中,优选的是生物相容性聚合物当置于受试者(例如,例如人)体内时不表现出对肝类器官的细胞的毒性。可例如通过测定以下来测量肝毒性:肝细胞样细胞凋亡死亡率(例如,其中细胞凋亡增加指示肝毒性)、转氨酶水平(例如,其中转氨酶水平增加指示肝毒性)、肝细胞样细胞膨胀(例如,其中膨胀增加指示肝毒性)、肝细胞样细胞中的微泡性脂肪变性(例如,其中脂肪变性增加指示肝毒性)、胆管细胞死亡率(例如,其中胆管细胞死亡率增加指示肝毒性)、γ-谷氨酰转肽酶(GGT)水平(例如,其中GGT水平增加指示肝毒性)。生物相容性聚合物包括但不限于碳水化合物(糖胺聚糖诸如透明质酸(HA)、硫酸软骨素、硫酸皮肤素、硫酸角质素、硫酸乙酰肝素、藻酸盐、壳聚糖、肝素、琼脂糖、葡聚糖、纤维素和/或其衍生物)、蛋白质(胶原蛋白、弹性蛋白、纤维蛋白、白蛋白、聚(氨基酸)、糖蛋白、抗体和/或其衍生物)和/或合成聚合物(例如,基于聚(乙二醇)(PEG)、聚(甲基丙烯酸羟乙酯)(PHEMA)和/或聚(乙烯醇)(PVA))。生物相容

性聚合物可以是单一聚合物或多种聚合物的混合物(例如US2012/01420069中描述的那些)。示例性生物相容性聚合物包括但不限于聚(乙)二醇、聚乳酸(PLA)、聚乙醇酸(PGA)、聚己内酯(PCL)、纤维蛋白、多糖材料(如壳聚糖、蛋白聚糖或糖胺聚糖(GAG))、藻酸盐、胶原蛋白、硫醇化肝素以及它们的混合物。在一些实施方案中,生物相容性聚合物可以是线性的、支化的并且任选地与肽(例如,RGD)、生长因子、整联蛋白或药物接枝。

[0120] 在一些实施方案中,所述聚合物是"低免疫原性聚合物",并且在接受者中不会引发免疫应答或仅引发最小的免疫应答。当将这种抗原决定簇引入同种异体受试者时,这种低免疫原性聚合物还能够掩蔽细胞的一种或多种抗原决定簇并降低或甚至防止对抗原决定簇的免疫应答。

[0121] 存在于本公开的包封的肝组织中的聚合物优选地是可交联的,例如,能够交联。所述聚合物可热交联、化学交联(例如,通过使用一种或多种肽,诸如VPMS、RGD等)或通过使用pH或光(例如,光聚合,例如使用UV光)交联。

[0122] 本公开的聚合物可以是可生物降解的(例如,易于通过活生物体的代谢水解)或完全或部分抗生物降解(例如,当经受活生物体的代谢时抗水解)。示例性生物相容性且可生物降解的聚合物包括但不限于聚(乙二醇)-马来酰亚胺(PEG-Mal)8-臂。示例性生物相容性和抗生物降解性聚合物包括但不限于聚(乙二醇)-乙烯基砜(PEG-VS)。

[0123] 一旦获得肝类器官,就使它们与第一生物相容性且可交联的聚合物接触,以至少部分地(并且在一些实施方案中基本上)覆盖所述肝类器官。所述聚合物可以不同的浓度使用。在一个实施方案中,在接触肝类器官时,聚合物的浓度介于约1%与15%(重量/体积)之间。在一个实施方案中,在接触肝类器官时,聚合物的浓度是至少约1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%或14%。在又一个实施方案中,在接触肝类器官时,聚合物的浓度等于或低于约15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%或2%。一旦肝类器官已经与第一聚合物接触,后者就交联(热、化学或通过使用pH或光)。第一生物相容性聚合物的交联通过在聚合物的不同分子之间和/或在聚合物的相同分子内产生额外的键(并且在一些实施方案中为额外的共价键)来实现。在一些实施方案中,第一生物相容性聚合物的交联将在聚合物分子与肝类器官的表面之间产生额外的键(并且在一些实施方案中为额外的共价键)。在一些实施方案中,第一聚合物是至少部分可生物降解的。

[0124] 在一些实施方案中,已经被第一生物相容性交联聚合物(至少部分地)覆盖或包封的肝类器官可与第二生物相容性可交联聚合物接触,以至少部分地(并且在一些实施方案中基本上)覆盖包封的肝组织。一旦包封的肝类器官已经与第二聚合物接触,后者就交联(热、化学或通过使用pH或光)。第二生物相容性聚合物的交联通过在聚合物的不同分子之间和/或在聚合物的相同分子内产生额外的键(并且在一些实施方案中为额外的共价键)来实现。在一些实施方案中,第二生物相容性聚合物的交联将在聚合物分子与第一生物相容性且交联的聚合物并且在一些实施方案中肝类器官表面之间产生额外的键(并且在一些实施方案中为额外的共价键)。在一些实施方案中,第二聚合物至少部分地抗生物降解。

[0125] 在一些实施方案中,所述方法还包括使所述包封的肝类器官(至少部分地被第一/第二生物相容性交联聚合物覆盖)与另一种生物相容性且可交联的聚合物接触以覆盖所述包封的肝类器官的步骤。一旦肝类器官已经与所述另一种聚合物接触,后者就交联(热、化

学或通过使用pH或光)。所述另一种生物相容性聚合物的交联通过在聚合物的不同分子之间和/或在聚合物的相同分子内产生额外的键(并且在一些实施方案中为额外的共价键)来实现。在一些实施方案中,所述另一种生物相容性聚合物的交联将在聚合物分子与第二生物相容性且交联的聚合物并且在一些实施方案中第一生物相容性且交联的聚合物和/或肝类器官的表面之间产生额外的键(并且在一些实施方案中为额外的共价键)。

[0126] 所述方法可被设计成在第一生物相容性且交联的聚合物内提供多个单分散的肝类器官例如,可通过分化单一iPSC获得肝祖细胞、内皮祖细胞和间充质祖细胞。可将细胞混合并在悬浮液中共培养以形成肝类器官。在一些实施方案中,肝细胞谱系细胞已分化成肝细胞样细胞,所述肝细胞样细胞基本上覆盖由间充质祖细胞和内皮祖细胞形成的细胞核心(在将肝类器官引入包封的肝组织之前)。在另一个实施方案中,肝类器官基本上是球形形状的并且具有约150μM的相对直径。然后可使用交联剂(例如所示的UV光)将肝类器官包封在第一相容性且可交联的基质中。包封的肝组织可用作再生医学中的可移植肝组织(具有例如介于5mm与10cm之间的大小)。或者,肝类器官可被设计成多孔板并用于药物开发以确定所筛选化合物的代谢或肝毒性。

[0127] 所述方法可被设计成提供(至少部分地)被第一生物相容性且交联的聚合物单独覆盖的多个肝类器官,然后将所述多个肝类器官并入由第二生物相容性且交联的聚合物制成的基质中。在这样的实施方案中,首先形成(至少部分地)被第一生物相容性且交联的聚合物单独覆盖的多个肝类器官,且然后使所述多个肝类器官与第二生物相容性且可交联的聚合物接触以进行交联。

[0128] 所述方法还可被设计成提供多个单独(例如,单分散的)肝类器官,所述肝类器官被第一和任选的第二相容性且交联的聚合物覆盖。在这样的实施方案中,包封的肝组织可包含每cm^2至少约50、60、70、80、90、100、125、150、175、200、250、300、350、400、450或500个肝类器官。在又一个实施方案中,包封的肝组织可包含每cm^2至多约500、450、400、350、300、250、200、175、150、125、100、90、80、70、60或50个肝类器官。在又一个实施方案中,包封的肝组织包含每cm^2介于约50、60、70、80、90、100、125、150、175、200、250、300、350、400或450与约500、450、400、350、300、250、200、175、150、125、100、90、80、70或60个之间的肝类器官。在又一个实施方案中,包封的肝组织包含每cm^2介于约50与500个之间的肝类器官。在另一个实施方案中,包封的肝组织包含每cm^3至少约250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000、1100、1200、1300、1400、1500、1600、1700、1800、1900、2000、2100、2200、2300、2400或2500个肝类器官。在又一个实施方案中,包封的肝组织包含每cm^3至多约2500、2400、2300、2200、2100、2000、1900、1800、1700、1600、1500、1400、1300、1200、1100、1000、950、900、850、800、750、700、650、600、550、500、450、400、350、300或250个肝类器官。在又一个实施方案中,包封的肝组织包含每cm^3介于约250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000、1100、1200、1300、1400、1500、1600、1700、1800、1900、2000、2100、2200、2300或2400与约2500、2400、2300、2200、2100、2000、1900、1800、1700、1600、1500、1400、1300、1200、1100、1000、950、900、850、800、750、700、650、600、550、500、450、400、350或300个之间的肝类器官。在又一个实施方案中,包封的肝组织包含每cm^3介于约250与2500个之间的肝类器官。

[0129] 在一个实施方案中,所述包封的肝组织可直接用于本文所描述的治疗和筛查方法

中，或者可冷冻保存以增加其储存时间。

[0130] 包封肝组织的治疗用途

[0131] 本文所描述的包封的肝组织可用作药物。因为它表现出肝脏的一些生物学功能，并且因此可在体内或离体用于恢复或改善有需要的受试者中的肝功能。例如，可通过测定白蛋白和凝血因子(例如，纤维蛋白原、凝血酶原、因子V、VII、VIII、IX、X、XI、XIII以及蛋白质C、蛋白质S和抗凝血酶)的合成来评估肝功能，而白蛋白和/或凝血因子合成的增加指示肝功能恢复或改善。肝功能也可通过测量国际标准化比率或INR来评估(例如，INR降低指示肝功能恢复或改善)。也可通过测量氨解毒为尿素来评估肝功能(例如，氨水平降低和/或尿素水平增加指示肝功能恢复或改善)。

[0132] 在这样的实施方案中，旨在使包封的肝组织与意欲治疗的受试者的生物流体接触。在这样的实施方案中，包封的肝将受试者所需的合成蛋白质和代谢物(白蛋白、凝血因子和/或尿素)释放到生物流体中，并且甚至可吸收来自所述生物流体的待代谢的有毒物质(氨、未缀合的胆红素、胆固醇、酪氨酸等)。包封的肝组织可用于恢复先天性肝代谢缺陷中缺乏/降低的酶功能。

[0133] 为了恢复或改善肝功能，可将包封的肝组织移植在在具有降低的肝功能、几乎没有肝功能的受试者体内。因此，包封的肝组织可例如与腹膜液结合植入腹膜腔中。或者，可将包封的肝组织与肝流体结合移植到接受者的肝脏上。在又一个实例中，可将包封的肝组织与淋巴液或血液结合皮下或肌内移植。

[0134] 或者，为了恢复或改善肝功能，包封的肝组织可用作离体解毒装置(例如，体外装置)的细胞组分。在这样的实施方案中，使经治疗的受试者的血液和/或腹膜液与包封的肝组织离体接触，以提供蛋白质和代谢物(白蛋白、凝血因子和/或尿素)，吸附或代谢潜在有毒物质(氨、未缀合的胆红素、胆固醇、酪氨酸等)。

[0135] 包封的肝组织可用于各种受试者(包括哺乳动物并且尤其是人)，所述受试者将受益于恢复或改善肝功能。包封的肝组织的细胞对于意欲治疗的受试者可以是自体的、同种异体的或异种的。然而，因为可设计包封的肝组织以防止与预期接受者的细胞(特别是免疫细胞)的物理接触，所以不需要使用自体细胞或免疫抑制药物来防止预期接受者的免疫识别和反应。这可通过例如使用包含仅一种生物相容性且交联的聚合物或第一和第二生物相容性且交联的聚合物两者的包封的肝组织和/或使用低免疫原性聚合物来进行。

[0136] 在一些实施方案中，可将包封的肝组织设计成通过手术操作并引入受试者，例如使用腹腔镜手术。另外，因为肝组织被包封在生物相容性(并且在一些实施方案中，低免疫原性)聚合物中，所以一旦肝功能已经恢复或包封的肝组织不再能够改善肝功能，就有可能从受试者中除去包封的肝组织。

[0137] 包封的肝组织可用于治疗肝衰竭。当大部分肝受损无法修复并且肝不再能够发挥作用时，发生肝衰竭。肝衰竭的早期症状包括恶心、食欲不振、疲劳和腹泻。随着疾患进展，也可观察到以下症状：黄疸、出血、腹部肿胀、精神错乱或混乱(称为肝性脑病)、嗜睡以及昏迷。肝衰竭可以是急性、慢性或慢加急性的。慢性肝衰竭的最常见原因是非酒精性脂肪性肝炎、乙型肝炎、丙型肝炎、长期酒精消耗、肝硬化、血色素沉着症和营养不良。在慢性肝衰竭中，肝细胞移植最常经由门静脉循环实施。然而，在继发于肝硬化的慢性肝衰竭的情况下，肝窦开窗部(毛细血管化)的消失可防止通过门静脉循环注射的注射细胞到达肝实质并植

入肝小叶中。这可能妨碍移植细胞的成熟和功能，并引起诸如窦状和门静脉血栓形成的并发症。由于它不需要门静脉注射或免疫抑制，本文所描述的包封的肝组织将允许治疗成千上万的患有肝硬化和慢性(或慢加急性)肝衰竭的患者，即使是不符合移植条件的那些，从而预防或减轻严重并发症(肝性脑病、凝血病等)并改善存活。

[0138] 本文所描述的包封的肝组织也可用于治疗急性肝衰竭。急性肝衰竭的最常见原因是处方和草药的反应或过量、病毒感染(包括甲型、乙型和丙型肝炎)以及摄入有毒的野生蘑菇、自身免疫性肝炎或威尔逊病。急性肝衰竭可快速发生，有时在不到48小时内发生，并且因此难以预防。此外，在急性肝衰竭中，肝功能如此受损的受试者需要移植完全成熟的且功能性的肝细胞。在一些实施方案中，包封的肝组织可用于治疗或缓解急性肝衰竭的症状。将包封的肝组织移植在有需要的受试者中或用作外部(离体)解毒装置，以治疗有需要的受试者的血液(体外肝脏支持物、生物人工肝脏装置或肝脏透析)。取决于包封的肝组织中的肝类器官的数量和疾患的严重程度，可使用一种或多于一种包封的肝组织来治疗受试者。一种或多种包封的肝组织可同时或依次使用。当包封的肝组织用于治疗或缓解肝衰竭的症状时，可使用与待治疗的受试者同种异体的细胞。

[0139] 包封的肝组织也可用于治疗或缓解单基因先天性肝代谢缺陷的症状(例如，克-纳二氏综合征、家族性高胆固醇血症、尿素循环障碍诸如N-乙酰谷氨酸合成酶缺乏症、氨甲酰磷酸合成酶缺乏症、鸟氨酸转氨甲酰酶缺乏症、瓜氨酸血症、精氨基琥珀酸裂解酶缺乏症、精氨酸酶缺乏症、I型遗传性酪氨酸血症等)。在此实施方案中，包封的肝组织提供缺乏的代谢功能、减轻症状、预防或减少并发症和/或减少或消除对终身治疗或饮食的需要。

[0140] 包封的肝组织可被设计成可植入产品(例如包封的肝组织片)以治疗急性和慢性肝衰竭而无需免疫抑制。在这样的实施方案中，可植入组织片包含每cm^2约数千个肝类器官。在一些实施方案中，包封的肝组织片可定位在容器(例如像，定制的、可渗透的袋)内，以便于操作和固定至所需的植入部位。在其他实施方案中，为了易于操作，可植入组织片可以是至少1mm厚，并且在一些另外的实施方案中，至少5mm至10cm宽。可将包封的肝组织制成所需的任何形状或尺寸，并且可在实施期间修整或切割。

[0141] 肝代谢和肝毒性筛查方法和试剂盒

[0142] 由于本文所描述的包封的肝组织保留至少一些肝功能，因此它可用作体外模型来确定剂(如潜在药物)如何被肝代谢，以使药物的发现和开发合理化。它还可用于确定剂是否表现出肝毒性。当施用至全身循环时，绝大多数(疑似的)治疗剂(批准的或正在开发中)以某种方式或另一种方式被肝脏的细胞代谢。在一些实施方案中，本文所描述的包封的肝组织可用于确定剂(诸如推定治疗剂)的肝毒性(例如，药物诱导的肝毒性)(如果有的话)。药物(批准的和研究中的)是肝损伤的重要原因。超过900种药物、毒素和药草据报道引起肝损伤，并且药物占所有暴发性肝衰竭病例的20％-40％。大约75％的特质性药物反应导致肝移植或死亡。药物诱导的肝损伤是撤回批准的药物的最常见原因。早期确定剂(如药物)的肝毒性概况可用于合理化药物发现和开发。

[0143] 本文所描述的包封的肝组织确实表现出至少一些肝功能，并且因此可体外用于确定剂(诸如化学剂、生物剂、天然药物产品或混合物)的肝代谢和/或肝毒性。所述方法可用于确定单一剂或多种剂的组合的肝代谢。

[0144] 为此，将待测试的剂或剂的组合与包封的肝组织接触放置，以在足以允许所述剂

对包封的肝组织的至少一个肝类器官的至少一种(并且在一些实施方案中,两种或三种)细胞类型的作用的条件下提供测试混合物。所述测试混合物包含所述剂和包封的肝组织。然后,测定所述包封的肝组织的至少一个肝类器官的至少一种(并且在一些实施方案中,至少两种或三种)细胞类型中或所述测试混合物中的所述剂的至少一种剂相关的肝代谢物。如在本公开的上下文中所使用的,表述"剂相关代谢物"是指可通过水解正测试的剂而形成的代谢物。

[0145] 替代地或组合地,测定所述包封的组织的至少一个肝类器官的至少一种(并且在一些实施方案中,至少两种或三种)细胞类型中或所述测试混合物中的至少一个肝参数。可测定的肝参数包括但不限于白蛋白产生、尿素产生、ATP产生、谷胱甘肽产生、细胞色素P450(CYP)代谢活性、肝特异性基因或蛋白质(例如,CYP酶(CyP2C9、CyP3A4、CyP1A1、CyP1A2、CyP2B6和/或CyP2D6)的表达、对肝毒素的反应、细胞死亡(例如通过测量测试混合物中的乳酸脱氢酶或转氨酶)、细胞凋亡、细胞坏死、细胞代谢活动(例如存活/死亡测定、半胱天冬酶3/7测定、MTT测定或基于WST-1的测试)、线粒体功能和/或胆汁酸产生。一旦已经获得至少一个(或多个)肝参数,就将其与相应的对照肝参数进行比较。在一个实施方案中,对照肝参数可在筛选的剂(或筛选的剂的组合)不存在下或在用于溶解所述筛选的剂(筛选的剂的组合)的媒介物存在下获得。可对包封的肝组织的全部或一些细胞进行测定步骤。在一个实施方案中,在包封的肝组织的肝细胞样细胞和/或胆管上皮细胞上进行测定步骤。

[0146] 所述方法还包括比较以确定所述剂是否被包封的肝组织的肝类器官代谢和/或所述剂是否表现出对包封的肝组织的肝类器官的细胞的肝毒性。为此,在测量的剂相关肝代谢物与对照剂相关肝代谢物之间进行比较。例如,对照剂相关代谢物本身可以是呈完整(例如,未水解)形式的剂。当确定存在与对照剂相关代谢物不同的剂相关代谢物时,则确定所述剂如何被肝细胞代谢。还可在测量的肝参数与对照肝参数之间进行比较。例如,可在所述剂不存在下获得对照肝参数。当确定肝参数不同于对照肝参数时,则确定所述剂是否表现出肝毒性。

[0147] 在一个实施方案中,所述方法用于确定所述筛选的剂(或筛选的剂的组合)是否表现出肝毒性。在这样的实施方案中,确定接触所述筛选的剂(或筛选的剂的组合)是否在包封的肝组织的肝类器官的至少一种细胞(例如肝细胞或胆管上皮细胞)中诱导毒性。可例如通过确定以下来测量毒性:细胞死亡(例如,通过测量测试混合物中的乳酸脱氢酶或转氨酶)、细胞代谢活力(例如存活/死亡测定、半胱天冬酶3/7测定、MTT测定或基于WST-1的测试)、线粒体功能(例如,线粒体功能的降低指示具有肝毒性)、细胞色素P450系统中的一种或多种酶(例如像CYP2E1)的活性的调节(例如,细胞色素P450系统的所述一种或多种酶的活性增加指示肝毒性)和/或胆汁酸产生的调节(例如,胆汁酸产生的增加指示肝毒性)。所述方法可包括将所述筛选的剂与对照剂(已知不会诱导肝毒性或已知会诱导肝毒性)的毒性结果进行比较。

[0148] 所述方法还可包括使所述筛选的剂(或多种筛选的剂)与获得的具有带不同代谢活性的肝类器官的包封的肝组织接触。例如,可使用来自不同起源和来源的细胞制备肝类器官,以在不同水平下执行特定代谢功能(因此代表在一般群体中的个体之间发现的变异)。例如,可在单个板的不同孔中产生具有不同代谢活性的所获得的包封的肝组织,以允许在它们中的每一者和全部上比较性地测试所述筛选的剂。在一个实施方案中,肝类器官

可源自不同性别、种族和/或基因型。可针对这些不同性别、种族和/或基因型测试所述筛选的剂以确定代谢的差异或者是否在所有或仅一些性别、种族和/或基因型中存在肝毒性。在一个实施方案中，所述肝类器官的间充质和/或内皮组分在多个肝类器官之间可以是相似的，但肝细胞样细胞和胆管上皮细胞来自不同的性别、种族和/或基因型。例如，每一不同的包封的肝组织可位于不同的孔中(如果需要多次重复)，并且相同的筛选的剂可与每一不同的包封的肝组织接触。

[0149] 在一些实施方案中，在筛选方法中使用的包封的肝组织不包含第二或另一种生物相容性交联聚合物，而是基本上由肝类器官和如本文所描述的第一生物相容性交联聚合物组成。

[0150] 所述筛选方法可使用已经单独包封的肝类器官或已经包封在含有超过一个肝类器官的基质中的肝类器官。在后者中，包封的肝组织可位于孔的底部，从而使得非常方便地添加筛选的剂并且在测定步骤之前洗涤包封的肝组织。

[0151] 本公开还提供了用于测定肝代谢或肝毒性的试剂盒。所述试剂盒包括本文所描述的包封的肝组织和用于进行所述方法的说明书。在一些实施方案中，所述试剂盒还包括组织培养载体，所述组织培养载体可任选地包括至少一个孔。在另外的实施方案中，所述包封的肝组织可位于至少一个孔的底部，并且如果需要，附接(共价或不共价)至所述孔的表面。所述试剂盒还可包括用于进行肝代谢或肝毒性测量(例如，例如存活/死亡测定、半胱天冬酶3/7测定、MTT测定、WST-1测定和/或LDH测量)的试剂。

[0152] 通过参考以下实施例将更易于理解本发明，提供所述实施例是为了说明本发明而非限制本发明的范围。

[0153] 实施例-肝细胞样细胞的产生和表征

[0154] 肝细胞样细胞(HLC)从两种不同的方案中获得：本文所描述的方案(称为方案B)，PCT/CA2017/051404中描述的标准方案(称为方案A)。然后比较HLC。

[0155] 分化方案(方案B)。

[0156] iPSC制备(第-3天至第0天)。在开始分化之前三天，使用TrypLE进行单细胞传代。将iPSC铺在层粘连蛋白包被的板上并在Essential 8Flex培养基中培养。所述培养基仅在最初的24小时内补充有Revita Cell™(ThermoFisher Scientific)。每天更换培养基。

[0157] 内胚层特化(第1天-第2天)。将细胞用DMEM/F-12培养基洗涤。然后将细胞在补充有100ng/ml激活素A和3μM CHIR99021的RPMI/B27(无胰岛素，含1％剔除血清替代物(KOSR))中培养。将细胞在环境O_2/5％CO_2中在37℃下培养2天。每天更换培养基。

[0158] 内胚层定型(定形内胚层，在第3天-第5天)。将细胞在补充有100ng/ml激活素A的RPMI/B27(无胰岛素，含1％剔除血清替代物)中培养。将细胞在环境O_2/5％CO_2中在37℃下培养3天。每天更换培养基。

[0159] 前肠后段(第6天-第10天)。将细胞在补充有20ng/ml BMP4、5ng/ml bFGF、4μM IWP2和1μM A83-01的RPMI/B27(无胰岛素，含1％剔除血清替代物)中培养。将细胞在环境O_2/5％CO_2中在37℃下培养5天。每天更换培养基。

[0160] 肝特化(双能祖细胞，第11天-第15天)。将细胞在补充有20ng/ml BMP4、10ng/ml bFGF、20ng/ml HGF和3μM CHIR99021的RPMI/B27(含胰岛素，含2％剔除血清替代物)中培养。将细胞在环境O_2/5％CO_2中在37℃下培养5天。每天更换培养基。

[0161] 肝成熟1(未成熟的肝细胞样细胞,第16天-第20天:)。将细胞在补充有20ng/ml HGF、3μM CHIR99021、20ng/ml BMP4、10ng/ml bFGF、20ng/ml OSM、10μM地塞米松和1μM A83-01的HBM/HCM培养基(无EGF,Lonza,含1%剔除血清替代物)中培养。将细胞在环境O_2/5%CO_2中在37℃下培养5天。每天更换培养基。使用RPMI/B27(含胰岛素,含2%剔除血清替代物)替代HBM/HCM培养基,已经获得了可比较的结果(数据未显示)。

[0162] 肝成熟2(未成熟的肝细胞样细胞,第21天-第25天)。将细胞在补充有20ng/ml OSM、10μM地塞米松的HBM/HCM培养基(无EGF,Lonza,含1%剔除血清替代物)中培养。将细胞在环境O_2/5%CO_2中在37℃下培养5天。每天更换培养基。使用补充有1%剔除血清替代物和Primary Hepatocyte Maintenance Supplement™(ThermoFisher Scientific)的威廉姆氏E培养基(William's E medium)替代HBM/HCM培养基,已经获得了可比较的结果(数据未显示)。

[0163] 肝成熟3(成熟的肝细胞样细胞,第25天-第30天)。将细胞在补充有10μM地塞米松的HBM/HCM培养基(无EGF,Lonza,含1%剔除血清替代物)中培养。将细胞在环境O_2/5%CO_2中在37℃下培养5天。每隔一天更换培养基。使用补充有1%剔除血清替代物和Primary Hepatocyte Maintenance Supplement™(ThermoFisher Scientific)的威廉姆氏E培养基(William's E medium)替代HBM/HCM培养基,已经获得了可比较的结果(数据未显示)。

[0164] 表1.在该实施例中比较了用于获得肝细胞样细胞的两种方案的细节。

[0165]

时间线	步骤	方案 A	方案 B
-3-0	平铺细胞用于分化	Essential 8 Flex	Essential 8 Flex
		4% O_2，5% CO_2	4% O_2，5% CO_2
		Revita Cell™ (前 24 小时)	Revita Cell™ (前 24 小时)
1-2	内胚层特化	RPMI/B27，无胰岛素，1% KOSR	RPMI/B27，无胰岛素，1% KOSR
		环境 O_2，5% CO_2	环境 O_2，5% CO_2
		激活素 A (100 ng/ml) CHIR99021 (3 μM)	激活素 A (100 ng/ml) CHIR99021 (3 μM)
3-5	内胚层定型	RPMI/B27，无胰岛素，1% KOSR	RPMI/B27，无胰岛素，1% KOSR
		环境 O_2，5% CO_2	环境 O_2，5% CO_2
		激活素 A (100 ng/ml)	激活素 A (100 ng/ml)
6-10	前肠后段	RPMI/B27，含胰岛素，2% KOSR	RPMI/B27，无胰岛素，1% KOSR
		环境 O_2，5% CO_2	环境 O_2，5% CO_2
		BMP4 (20 ng/ml) bFGF (10 ng/ml)	IWP2 (4 μM) A83-01 (1 μM) BMP4 (20 ng/ml) bFGF (5 ng/ml)
11-15	肝特化	RPMI/B27，含胰岛素，2% KOSR	RPMI/B27，含胰岛素，2% KOSR
		环境 O_2，5% CO_2	环境 O_2，5% CO_2
		HGF (20 ng/ml)	CHIR99021 (3 μM) BMP4 (20 ng/ml) bFGF (10 ng/ml) HGF (20 ng/ml)
16-20	肝成熟 1	威廉姆氏 E 培养基/原代肝细胞补充剂，1% KOSR	HBM/HCM (无 EGF) 1% KOSR

[0166]

时间线	步骤	方案 A	方案 B
		环境 O_2，5% CO_2	环境 O_2，5% CO_2
		OSM (20 ng/ml) 地塞米松(10 μM)	CHIR99021 (3 μM) BMP4 (20 ng/ml) bFGF (10 ng/ml) HGF (20 ng/ml) A83-01 (1 μM) 制瘤素 M (OSM) (20 ng/ml) 地塞米松(10 μM)
21-25	肝成熟 2	威廉姆氏 E 培养基/原代肝细胞补充剂，1% KOSR	HBM/HCM (无 EGF) 1% KOSR
		环境 O_2，5% CO_2	环境 O_2，5% CO_2
		OSM (20 ng/ml) 地塞米松(10 μM)	OSM (20 ng/ml) 地塞米松(10 μM)
26-30	肝细胞成熟 3	未执行	HBM/HCM (无 EGF) 1% KOSR
			环境 O_2，5% CO_2
			地塞米松(10 μM)

[0167] 细胞显微镜检查。使用相位差显微镜(EVOS FL细胞成像系统,Thermo Fisher Scientific)观察分化过程结束时的存活细胞,以研究形态。

[0168] 细胞计数。使用TrypLE从培养板上回收细胞,并使用自动细胞计数器Countess II FL自动细胞计数器(Thermo Fisher Scientific)进行计数。

[0169] 免疫荧光。将细胞固定在4%多聚甲醛中,并在0.2%Triton X-100中在室温下透化5分钟。通过将细胞与3%封闭血清(与第一抗体对应)溶液在室温下孵育30分钟来封闭非特异性位点。然后将固定和透化的细胞与第一抗体溶液(抗体在PBS-BSA 2%中稀释)一起在室温下孵育1小时。然后将细胞与第二标记的抗体溶液(荧光)一起在室温下避光孵育30分钟。在与第二标记的抗体一起孵育的最后15分钟期间,添加染料(Pureblue核染色,BioRad)以使细胞核染色。然后用抗褪色试剂(ProLong Gold)固定细胞。在所述程序后第二天分析荧光。使用了以下抗体:来自ABCAM的抗人SOX17,1:100稀释;来自ABCAM的抗人FOXA2,1:100稀释;来自ABCAM的抗人CXCR4,1:100稀释;来自DAKO的抗人AFP,1:100稀释;来自DAKO的抗人白蛋白(ALB),1:100稀释;来自ABCAM的抗人CK19,1:100稀释;和来自ABCAM的抗人CK7,1:200稀释。

[0170] FACS分析。将总计0.5-1X10^6个细胞等分到每个测定管中。将细胞用100μl的荧光染料缀合的第一抗体溶液(膜抗原)在室温下避光染色20分钟。随后将细胞用4%多聚甲醛在室温下固定10分钟。将细胞用1%Triton X-100透化。将细胞用100μl的荧光染料缀合的抗体溶液(细胞内抗原)染色并在黑暗中在室温下孵育20分钟。将细胞重新悬浮于0.5ml PBS-BSA 1%中,保持在4℃并进行分析。针对FACS使用了以下抗体:Per-CP-Cy 5.5抗人SOX17(BD Bioscience);APC抗人CD184(CXCR4)(BD Bioscience);PE抗人FOXA2(BD

Bioscience);PE抗人EpCAM(BD Bioscience);APC抗人白蛋白(R&D system);FITC抗人TRA1-60(BD Bioscience);Alexa 647抗人Nanog(BD Bioscience);APC抗人Brachyury(Bio-Techne)和PerCP-Cy 5.5抗人c-Kit(CD117)(BD Bioscience)。

[0171] 实时RT-PCR。从培养的细胞提取总RNA(Rneasy Plus Mini Kit,Qiagen)作为合成单链cDNA的模板。进行逆转录以获得cDNA。制备PCR反应混合物,然后装入板中。将板密封,离心,然后装入仪器中。使用标准的TaqMan qPCR反应条件。使用比较CT(ΔΔCT)方法分析数据以计算基因表达的相对定量。使用以下TaqMan基因表达测定(来自Thermo Fisher scientific):Hs1053049_S1 SOX2 Taqman基因表达测定;Hs00751752_S1 SOX17 Taqman基因表达测定;Hs00171403_M1 GATA4 Taqman基因表达测定;Hs002230853_M1 HNF4A Taqman基因表达测定;Hs00173490_M1 AFP Taqman基因表达测定;Hs00609411_M1白蛋白Taqman基因表达测定;Hs99999905_M1 GAPDH Taqman基因表达测定;Hs04187555_m1 FOXA1 Taqman基因表达测定;Hs00242160m1 HHEX Taqman基因表达测定;Hs00236830m1 PDX1 Taqman基因表达测定;Hs00232764 m1 FOXA2 Taqman基因表达测定;Hs01005019_m1 ASGR1 Taqman基因表达测定;Hs00173490AFP Taqman基因表达测定;Hs00607978s1 CXCR4 Taqman基因表达测定;Hs00761767_s1 KRT19 Taqman基因表达测定;Hs00559840_m1 KRT7 Taqman基因表达测定和Hs00944626_m1 TAT Taqman基因表达测定。

[0172] Cyp 3A4活性。根据制造商的说明书,使用来自Promega的"P450-Glo™测定"评价Cyp3A4活性。

[0173] 尿素合成。根据制造商的说明书,使用来自Gentaur的"Quantichrom尿素测定试剂盒"测量尿素合成。

[0174] 白蛋白产生。根据制造商的说明书,使用来自Abcam的"白蛋白人ELISA试剂盒"评价白蛋白产生。

[0175] 线粒体呼吸分析。使用Seahorse Bioscience XF96分析仪(Seahorse Bioscience Inc.)按照制造商的说明书稍作改动在96孔板中在37℃下进行线粒体应激测试。简而言之,将细胞以$1x10^5$个细胞/孔接种,并在测定之前24小时用不同剂量的对乙酰氨基酚(APAP-2、4、8mM)和胺碘酮(AMIO-2、4、8、19μM)进行预处理。在测试当天,除去生长培养基,洗涤两次,并用XF测定培养基(无缓冲的DMEM,d5030Sigma,25mM葡萄糖,2mM谷氨酰胺,1mM丙酮酸钠,pH 7.4)更换,并将板在无CO_2孵育器中在37℃下孵育1小时。在水化筒式传感器中装有适当体积的线粒体调节剂,以在每个孔中达到最终浓度:寡霉素(2μM)、羰基氰化物对三氟甲氧基苯腙(FCCP)(2μM)和鱼藤酮/抗霉素A(均为1μM)。然后,如制造商的协议所描述,自OCR值分析基础呼吸、ATP产生、质子泄漏、最大呼吸和非线粒体呼吸的水平。

[0176] 表2.所使用的缩写。

[0177]

iPSC	未分化的多能干细胞
DE	分化方案第5天的内胚层细胞
PFG	在分化方案第10天获得的前肠后段细胞
HB	在分化方案第15天获得的肝祖细胞
FPHH	新鲜分离的原代人胎肝细胞
PHH	原代人肝细胞(成人)
HLC	在分化方案结束时获得的肝细胞样细胞。

HLC-A	通过标准分化方案(方案A)获得的肝细胞样细胞
HLC-B	通过分化方案即方案B获得的肝细胞样细胞

[0178] 对hiPSC进行内胚层诱导处理五天产生表达特定内胚层标记物SOX17、FOXA2、GATA4、CXCR4和EOMES的细胞的均质单层(图1)。流式细胞术分析已经证实了所述群体的均质性,所述流式细胞仪分析显示超过80％的细胞对SOX17、FOXA2和CXCR4呈三重阳性,并且这些细胞不表达c-Kit(图2)。免疫染色显示,大多数细胞对定型内胚层标记SOX17、FOXA2和CXCR4呈阳性(图3-底部)。通过分化人胚胎干细胞(hESC,数据未显示)而不是iPSC,获得了相似的结果。

[0179] 内皮诱导之后,将细胞处理五天以诱导分化成前肠后段。在那个阶段提供了信号诸如FGF-2和BMP4,这些信号通常从心脏中胚层发出。此外,抑制Wnt/β-连环蛋白和TGFβ信号传导途径(通过分别使用IWP2和A83-01)以允许表达Hex和Prox1。如图4所示,细胞在前肠特异性标记物FOXA2、SOX2、FOXA1、HNF4A、AFP和白蛋白中的表达增加。

[0180] 随后,通过维持FGF-2和BMP4信号,添加HGF,以及激活Wnt途径(通过使用CHIR99021)来促进肝脏生长,从而诱导肝特化(具有多边形形态的成肝细胞),持续5天。显示所述细胞表达肝特异性标记物AFP、白蛋白、CK19、CK7和EpCAM(图5)。还确定了iPSC来源的肝祖细胞群不包括未分化的细胞(图6)。RT-qPCR显示出特征性成肝细胞/肝细胞标记物,诸如白蛋白、AFP、AFP、CK19、CK7、PDX1、SOX9、PROX1、HNF4α和HHEX的表达(图7)。如图8所示,与内胚层细胞或未分化的iPSC相比,肝祖细胞的细胞产率显著增加。

[0181] 为了进一步限定肝定型,抑制TGFβ信号传导(通过使用A83-01,以避免胆管细胞)并激活Wnt途径(通过使用CHIR99021)。包括FGF-2、BMP4、HGF、OSM和地塞米松。在分化的最后阶段,除去OSM(自出生后,肝脏不再发生造血作用)并维持地塞米松。

[0182] 在分化过程中,细胞群逐渐获得具有大细胞质核比,大量液泡和囊泡以及突出核仁的肝细胞样细胞的典型形态。发现若干细胞是双核的(图9A)。还显示所述细胞表达AFP、白蛋白以及CK19(图9B)。与成肝细胞阶段相比,免疫荧光显示白蛋白表达增加,AFP和CK19表达降低(图9B,且数据未显示)。如流式细胞术分析所评估,大多数细胞(98.5％)为白蛋白阳性(图10)。RT-qPCR分析显示,在HLC和FPHH之间特定肝基因诸如白蛋白、AFP、HNF4a、ASGR1和SOX9的表达相似(图11)。

[0183] 图12将从方案B获得的HLC与原代人肝细胞HepG2、未分化的iPSC、DE细胞或PFG细胞进行了比较。这些结果显示,HLC-B和FPHH具有相似的CyP3A4活性(图12A)和尿素产生(图12C)。与成年肝细胞相比,HLC-B细胞产生较低但可比较的白蛋白水平(图12B)。

[0184] 与从方案A获得的HLC相比,从方案B获得的HLC已显示达到显著更重要的分化程度,如较高的肝脏标记物表达(图13),显著更高的CyP3a4活性(图14A),白蛋白产生(图14B)和细胞产率(图14C)所示。

[0185] 在基础条件下并在增加对乙酰氨基酚(APAP)和胺碘酮(AMIO)(由肝脏特异性代谢的药物)的剂量后评估肝细胞样细胞(使用方案B获得)的代谢功能、线粒体呼吸能力和与ATP相关的呼吸作用(图15)。实施例15提供的结果表明,与药物接触后,从方案B获得的HLC调节其呼吸作用,因此具有代谢活性。

[0186] 虽然已结合本发明的具体实施方案描述了本发明,但是应理解权利要求书的范围应受实施例中列出的优选实施方案的限制,但是应总体上给出与描述一致的最广泛解释。

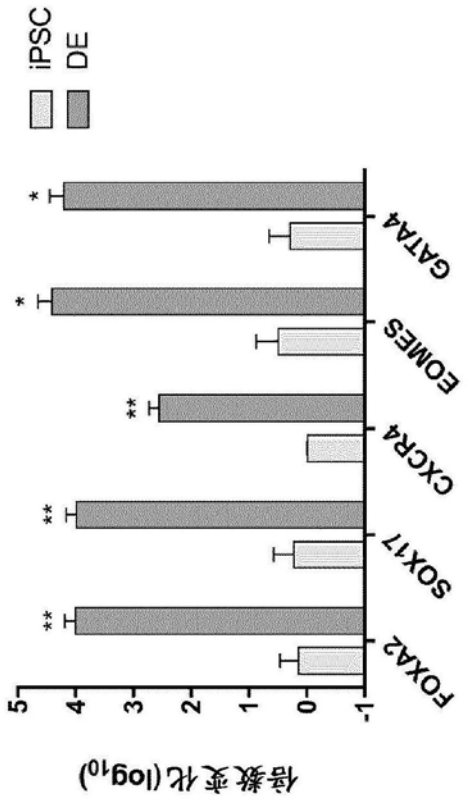

iPSC
DE
FOXA2
SOX17
CXCR4
EOMES
GATA4
倍数变化(log10)

图1A

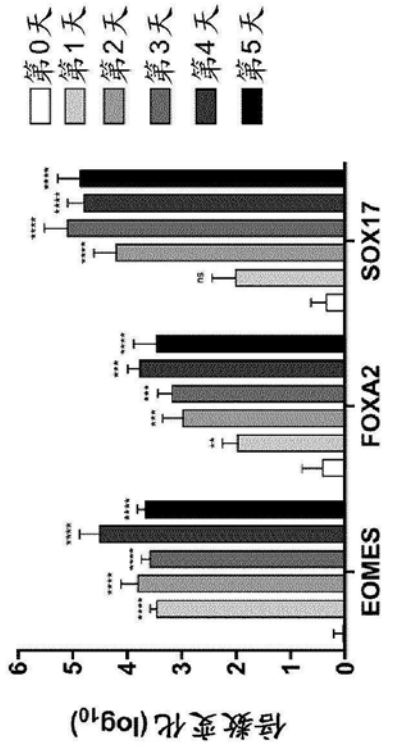

第0天
第1天
第2天
第3天
第4天
第5天
EOMES
FOXA2
SOX17
倍数变化(log10)

图1B

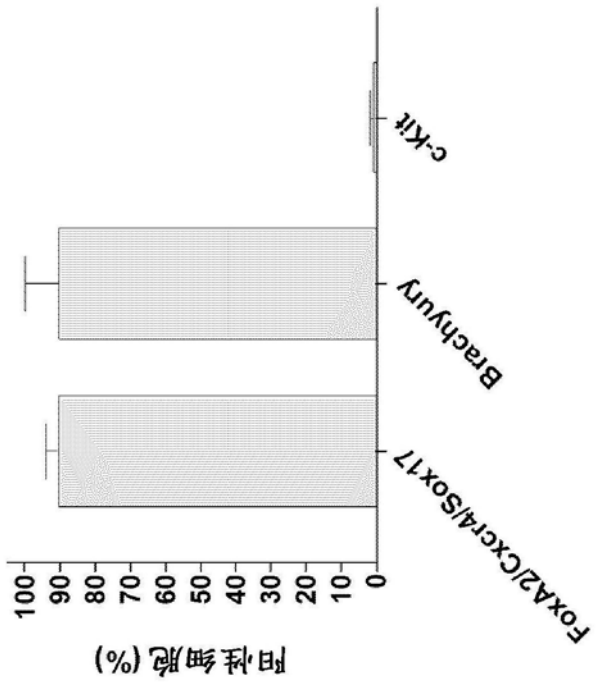

阳性细胞 (%)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
FoxA2/Cxcr4/Sox17
Brachyury
c-Kit

图2

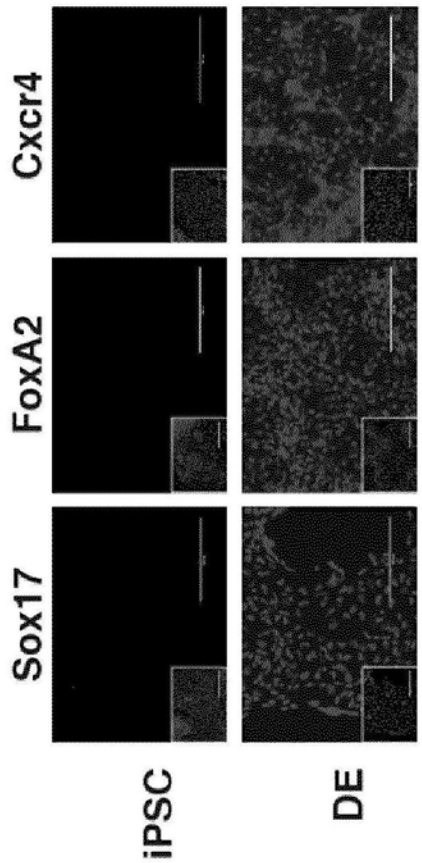

Sox17
FoxA2
Cxcr4
iPSC
DE

图3

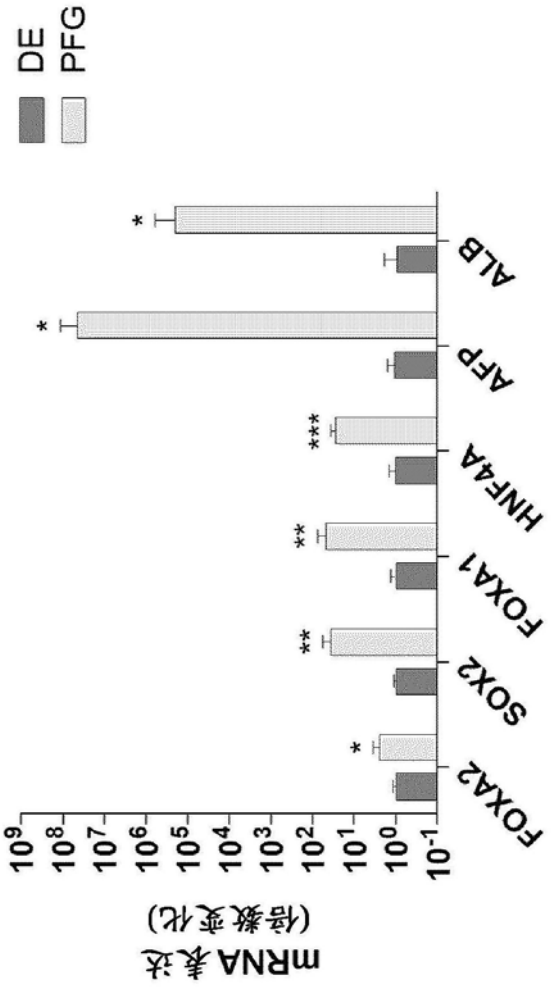

DE
PFG
mRNA表达
(倍数变化)
10^{9}
10^{8}
10^{7}
10^{6}
10^{5}
10^{4}
10^{3}
10^{2}
10^{1}
10^{0}
10^{-1}
FOXA2
SOX2
FOXA1
HNF4A
AFP
ALB
*
**
***

图4

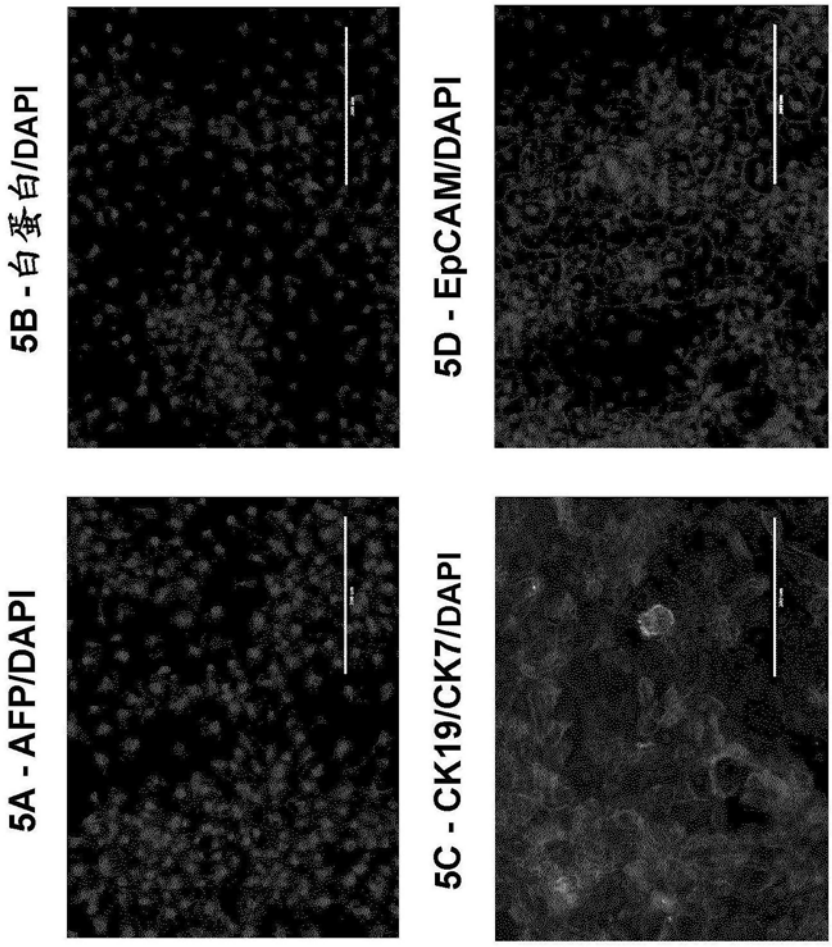


图5

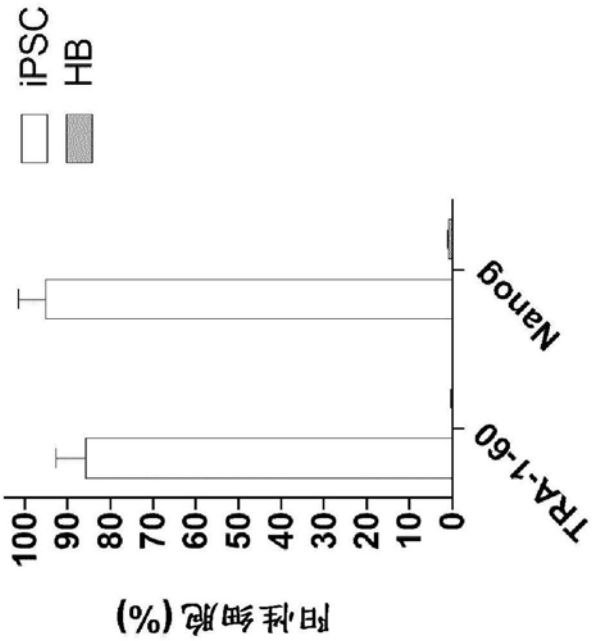

iPSC
HB
Nanog
TRA-1-60
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
阳性细胞(%)

图6

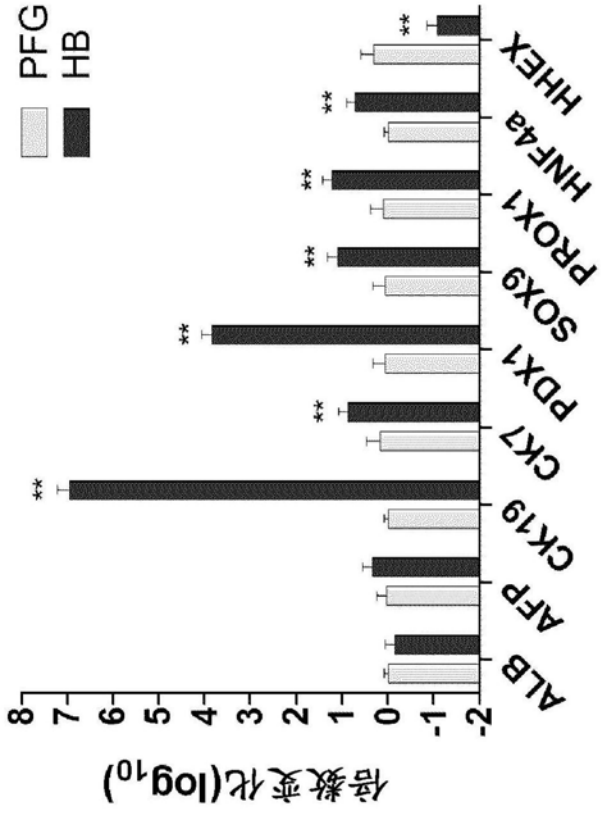

PFG
HB
ALB
AFP
CK19
CK7
PDX1
SOX9
PROX1
HNF4a
HHEX
8
7
6
5
4
3
2
1
0
-1
-2
倍数变化(log10)

图7

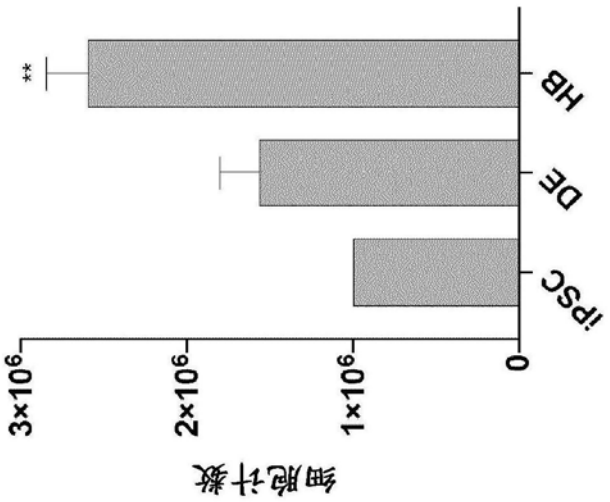


图8

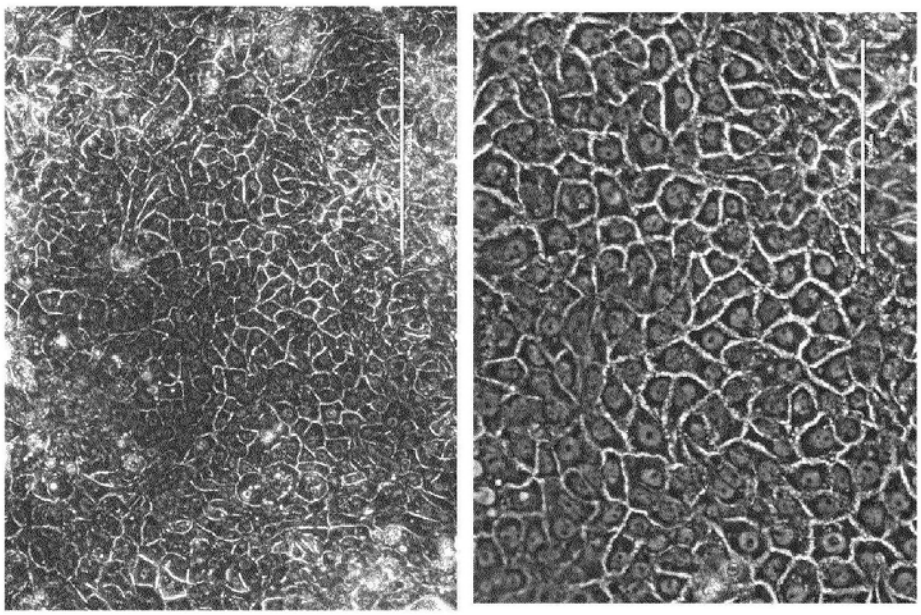


图9A

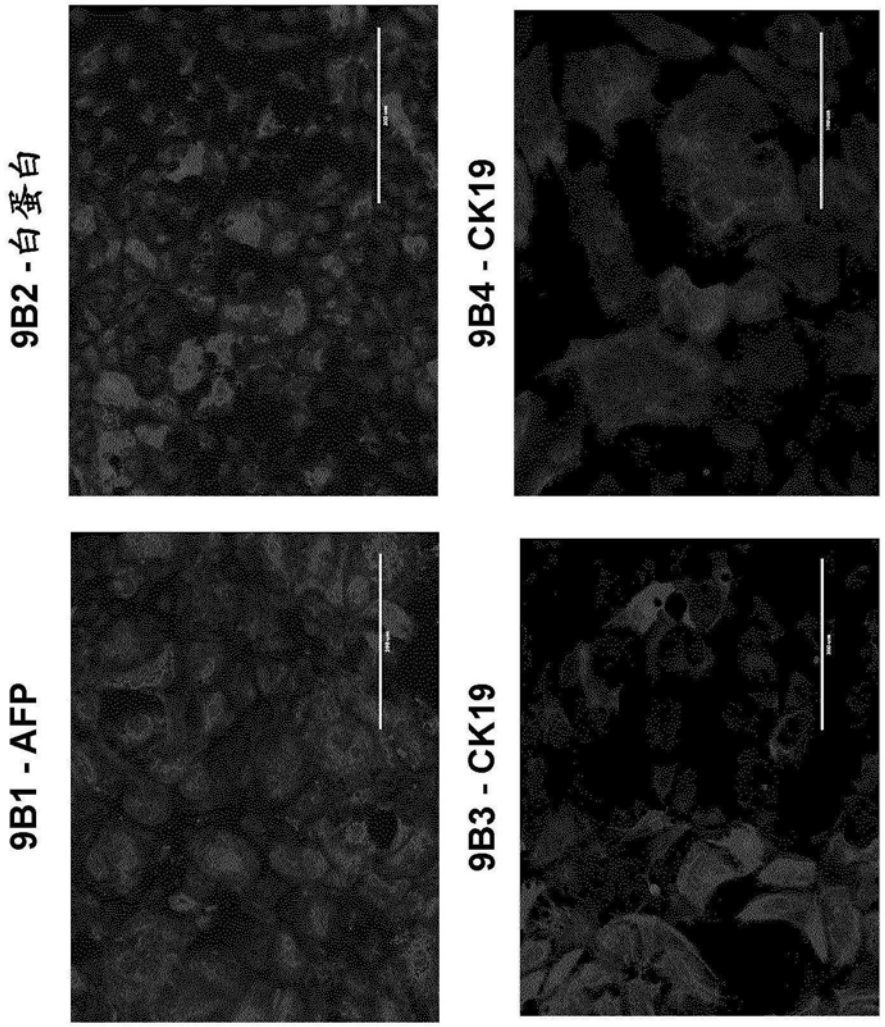


图9B

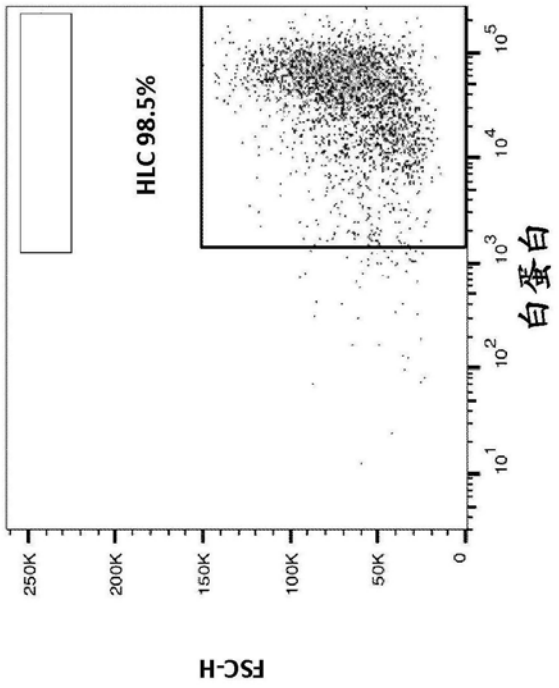

HLC 98.5%
白蛋白
FSC-H
250K
200K
150K
100K
50K
0

图10A

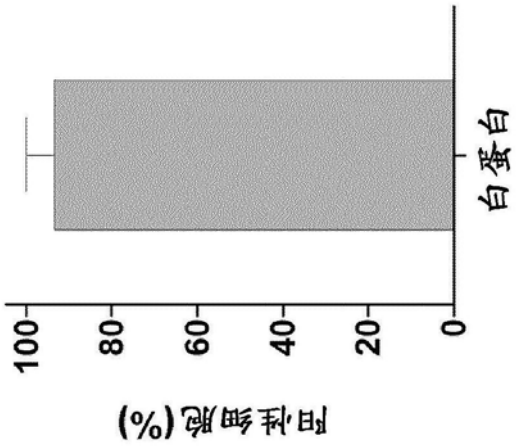

白蛋白
阳性细胞(%)
100
80
60
40
20
0

图10B

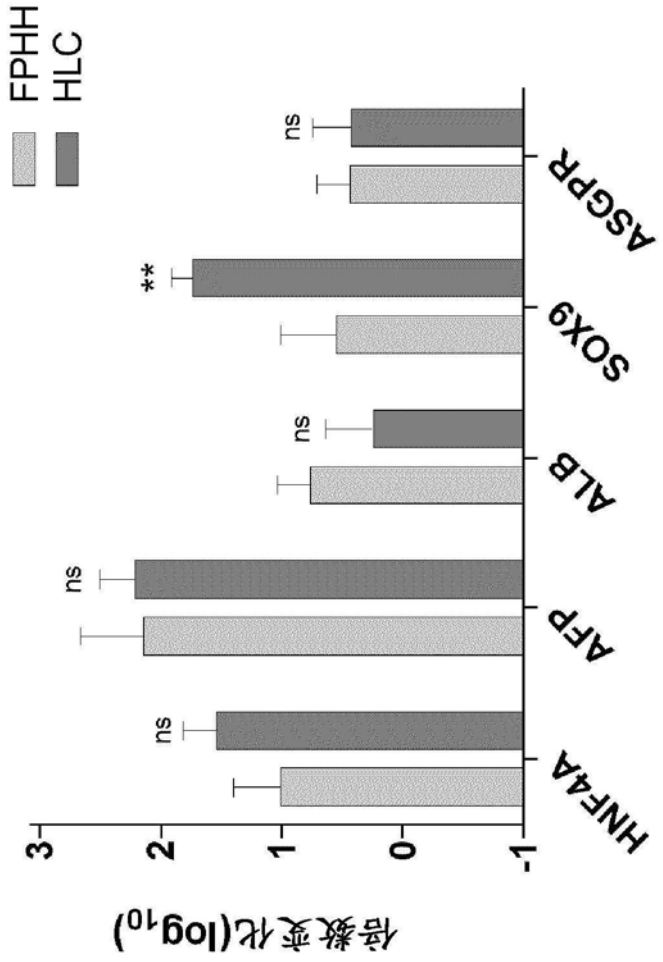

FPHH
HLC
HNF4A
AFP
ALB
SOX9
ASGPR
ns
**
倍数变化(log10)

图11

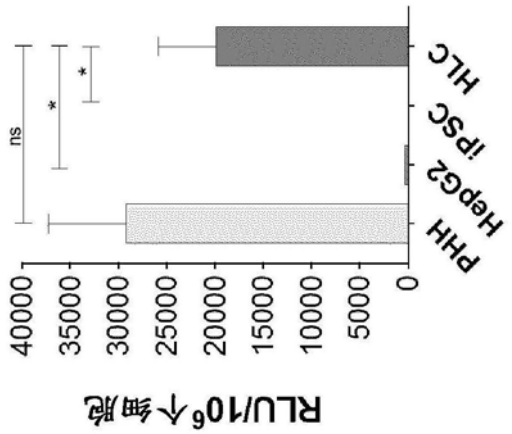

PHH
HepG2
iPSC
HLC
ns
*
*
RLU/10⁶个细胞

图12A

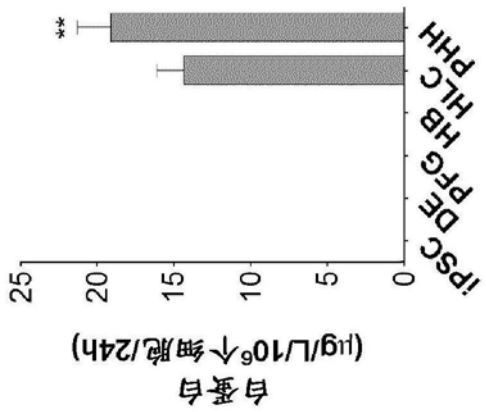


图12B

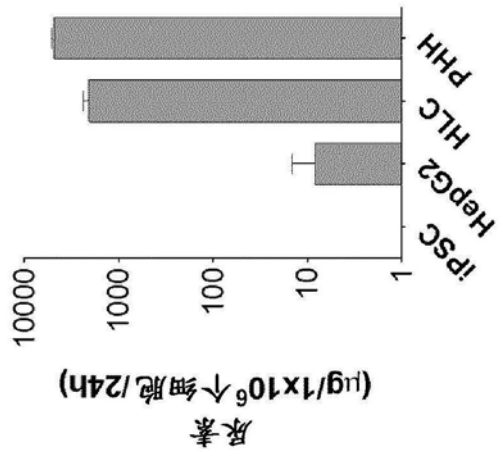


图12C

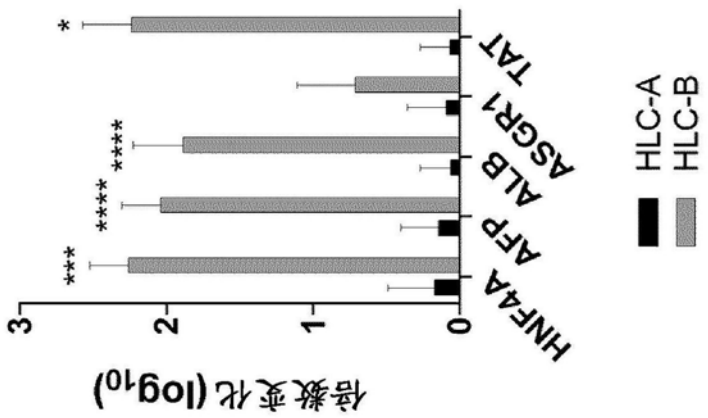


图13

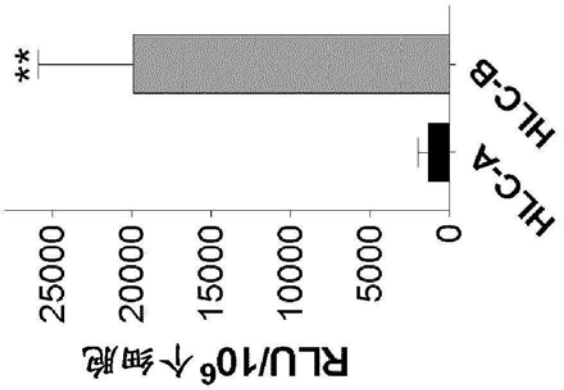


图14A

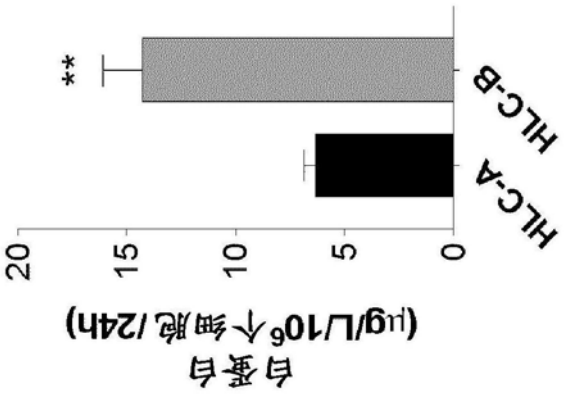


图14B

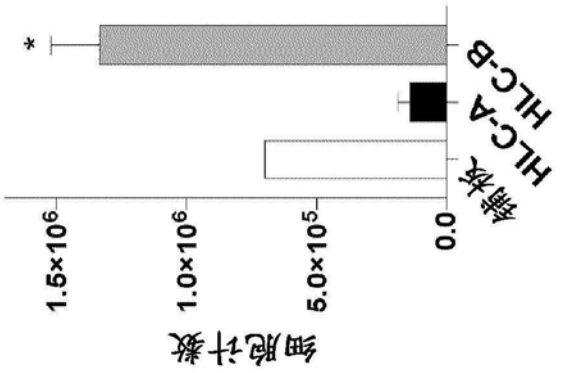


图14C

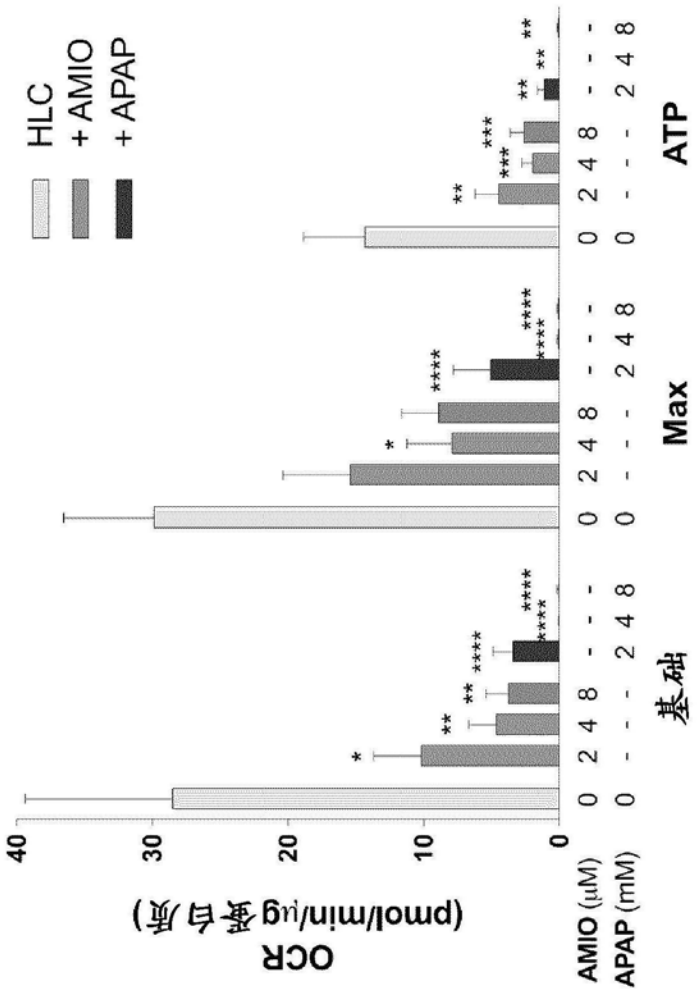

HLC
+ AMIO
+ APAP
OCR
(pmol/min/μg蛋白质)
40
30
20
10
0
AMIO (μM) 0 2 4 8 - - - - 0 2 4 8 - - - - 0 2 4 8 - - - -
APAP (mM) 0 - - - 2 4 8 0 - - - 2 4 8 0 - - - 2 4 8
基础
Max
ATP

图15