

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **033821**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2019.11.29

(21) Номер заявки
201792641

(22) Дата подачи заявки
2016.06.06

(51) Int. Cl. *A61K 45/00* (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)

(54) **ПРИМЕНЕНИЕ ИНГИБИТОРА ОСИ IGFBP3/ТМЕМ219 ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ДИАБЕТА**

(31) **EP15170679.3; EP16169222.3**

(32) **2015.06.04; 2016.05.11**

(33) **EP**

(43) **2018.03.30**

(86) **PCT/EP2016/062792**

(87) **WO 2016/193497 2016.12.08**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ОСПЕДАЛЕ САН РАФФАЭЛЕ СРЛ
(IT)**

(72) Изобретатель:
**Д'Аддио Франческа, Фьорина Паоло
(IT)**

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) **WO-A1-9739032**

(57) Изобретение относится к роли оси IGFBP3/ТМЕМ219 в дебюте диабета и связанному с ней применению ингибиторов оси IGFBP3/ТМЕМ219 для лечения и/или профилактики диабета.

B1

033821

033821

B1

Область техники

Настоящее изобретение относится к роли оси IGFBP3/ТМЕМ219 в дебюте диабета и связанному с ней применению ингибиторов оси IGFBP3/ТМЕМ219 для лечения и/или профилактики диабета. Изобретение также относится к способу идентификации индивидуума, имеющего риск развития диабета типа 1 и/или типа 2, и связанному с ним набору.

Предшествующий уровень техники

У индивидуумов с диабетом типа 1 (Т1D) распространены желудочно-кишечные нарушения, состоящие из гастропареза, вздутия живота, синдрома раздраженного кишечника и энкопреза (1993). Фактически, у до 80% индивидуумов с длительным Т1D, как правило, страдающих несколькими осложнениями диабета, включая терминальную стадию почечной недостаточности (ESRD) (1993; Atkinson et al., 2013; Fiorina et al., 2001), наблюдают симптомы, связанные с желудочно-кишечным трактом. Наличие этих симптомов, связанных с желудочно-кишечным трактом, известных как диабетическая энтеропатия (DE), значительно снижает качество жизни (1993; Atkinson et al., 2013; Camilleri, 2007; Talley et al., 2001) и имеет в значительной степени неизвестный патогенез (Feldman and Schiller, 1983). В доклинических исследованиях наблюдали значительное нарушение морфологии слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта у грызунов с диабетом (Domenech et al., 2011; Zhao et al, 2003), что позволяет предполагать, что при Т1D может изменяться гомеостаз желудочно-кишечного тракта; однако доступно мало данных о людях. Эпителий желудочно-кишечного тракта поддерживается стволовыми клетками желудочно-кишечного тракта и их нишей, отвечающими на физиологический стресс и повреждение под действием окружающей среды (Barker, 2014; Medema and Vermeulen, 2011). Стволовые клетки толстого кишечника (CoSC), локализованные в основании крипты толстого кишечника и экспрессирующие рецептор 2 эфрина В (EphB2), богатый лейцином, содержащий повторы, сопряженный с G-белком рецептор 5 (LGR5), h-TERT и альдегиддегидрогеназу (Aldh), помимо других маркеров (Carlone and Breault, 2012; Carpentino et al., 2009; Jung et al., 2011; Sato and Clevers, 2013), составляют локальное микроокружение ниши CoSC (van der Flier and Clevers, 2009; Zeki et al., 2011). В недавних исследованиях определяли условия, повторяющие многие признаки гомеостаза желудочно-кишечного тракта и образующие нормальные самообновляющиеся крупные органоиды крипт *in vitro* или так называемые "мини-кишечники" (Sato and Clevers, 2013). Какие-либо системные факторы, такие как циркулирующие гормоны, служащие для контроля CoSC, еще предстоит установить (Stange and Clevers, 2013).

Лечение желудочно-кишечных нарушений, в частности диабетической энтеропатии, включает симптоматические лекарственные средства и облегчающие лекарственные средства от диарей, боли в области живота, запора и диспепсии. В настоящее время не существует доступного специфического лечения диабетической энтеропатии.

Диагностика желудочно-кишечных нарушений, в частности диабетической энтеропатии, включает эндоскопию толстого кишечника, эндоскопию желудка, аноректальную манометрию, пищеводную манометрию и анализ образцов кала, оценку периферических маркеров злокачественных новообразований (т.е. СЕА, Са19.9, α -фетопротеина, Са125) и маркеров целиакии. Ни один из указанных выше способов не способен обеспечивать точную диагностику диабетической энтеропатии.

В WO 2011133886 и WO 2007024715 описывают терапевтический состав в форме IGFBP3-связывающего антитела.

WO 0187238 относится к противораковой фармацевтической композиции, содержащей терапевтически эффективный ТМЕМ219, в частности, для лечения рака толстого кишечника.

В WO 2014089262 описывают применение IGFBP3 в качестве маркера для диагностики нарушений с хроническим воспалением (ожирением) (в частности, воспалительного заболевания кишечника, такого как UC, болезнь Крона и рак толстого кишечника).

US 6066464 относится к иммунологическому анализу для детекции IGFBP3 на твердой подложке, представляющей собой бумагу.

WO 2013152989 относится к применению IGFBP3 в качестве биомаркера колоректального рака.

В WO 0153837 описывают способ мониторинга или диагностики заболеваний, включающий изменение комбинации опухолевых маркеров и по меньшей мере одного компонента оси IGF. IGFBP3 предложен в качестве маркера опухолей толстого кишечника.

Исторически диабет типа 1 (Т1D) рассматривают как опосредованное Т-клетками аутоиммунное заболевание, приводящее к деструкции инсулин-продуцирующих β -клеток поджелудочной железы (Bluestone et al., 2010; Eisenbarth, 1986). С этой точки зрения, иницирующий фактор запускает иммунный ответ против аутоантигенов, а затем недавно активированные аутореактивные Т-клетки направленно воздействуют и разрушают панкреатические островки и инсулин-продуцирующие β -клетки (Bluestone et al., 2010). То факт, определена ли деструкция β -клеток исключительно аутоиммунной атакой или в патогенезе Т1D участвуют другие механизмы, такие как паракринная модуляция, метаболическая дисрегуляция, неиммунный апоптоз β -клеток и прекращение регенерации β -клеток, в настоящее время является предметом дискуссии (Atkinson and Chervonsky, 2012; Atkinson et al., 2015). Недавно было замечено, что факторы окружающей среды необходимы для инициации аутоиммунного ответа при Т1D, в частности

вирусные инфекции (Filippi and von Herrath, 2008), и исследования влияния микрофлоры кишечника показали, что энтеровирусы участвуют в активации аутореактивных Т-клеток (McLean et al., 2015). Текущие исследования также сфокусированы на других факторах окружающей среды, таких как питание, неонатальное воздействие молока и глютеина и возраст отлучения от груди, и они позволяют предполагать, что постепенно возникает новый подход к исследованию патогенеза Т1D (McLean et al., 2015), таким образом, уже не считают, что генетические факторы являются исключительной детерминантой Т1D (Alper et al., 2006), (Oilinki et al., 2012). Кроме того, эффективность иммунотерапевтических стратегий, которые в последнее десятилетие считают основным путем разработки лечения Т1D, в настоящее время подвергается сомнению (Ben Nasr et al., 2015a). Хотя показано, что направленное воздействие на аутоиммунный ответ с использованием иммуносупрессорного лечения или прорегуляторной схемы лечения является удовлетворительным у грызунов, такие стратегии наоборот позволяют достигать независимости от инсулина у ничтожно малого количества индивидуумов с Т1D (Atkinson et al., 2015). Помимо того, что эти данные подчеркивают различия между моделями на животных и людях, они также проливают свет на тот факт, что при исследовании иммунного ответа, главным образом, изучают иммунные явления, происходящие на периферии, хотя мало что известно о патологическом процессе, происходящем в островках и, в частности, β -клетках. В связи с этим, открытие новых факторов, участвующих в инициации/облегчении потери бета-клеток при Т1D будет иметь большое значение. Такое открытие может проложить путь для новых терапевтических подходов, способных останавливать или замедлять самую первую фазу заболевания. Но в этой области сохраняется потребность в альтернативном лечении Т1D и Т2D.

В WO 2008153788 описывают способ ингибирования или снижения уровней IGFBP3 для лечения резистентности к инсулину или TD2, где ингибитор является нуклеиновой кислотой, комплементарной мРНК IGFBP3, или антителом, связывающимся с IGFBP3, против IGFBP-3. Здесь не описана ось IGFBP3/TMEM219. Muzumdar et al. (Muzumdar et al., 2006) описывают, что IGFBP3 действует в качестве антагониста инсулина с помощью центрального механизма, приводящего к снижению периферического захвату глюкозы. Здесь не описывают ингибирование оси IGFBP3/TMEM219.

В WO 9739032 описывают применение ингибитора IGFBP3 для лечения диабета, где ингибитор предотвращает связывание IGFBP-3 с IGF-1. Ингибирование оси IGFBP3/TMEM219 не предусмотрено. D'Addio et al., (2015) описывают, что есо-ТМЕМ219 нормализует уровни циркулирующих IGF-I/IGFBP3. WO 200702471 относится к применению сконструированных мультивалентных и мультиспецифических связывающих белков, а именно иммуноглобулинов с двойным вариабельным доменом, связывающихся с двумя различными антигенами или пептидами-мишенями с использованием одного среднего линкера и являющихся биспецифическими. В описании помимо многочисленных белков-мишеней упомянут IGFBP3 в комбинации с другими членами семейства.

WO 2011133886 относится к способу получения антител и других мультимерных комплексов белков, а именно гетеромультимерных белков, способных специфически связываться с несколькими мишенями. IGFBP3 может представлять собой потенциальную мишень.

Сущность изобретения

Остается неясным, служат ли системные факторы для контроля гомеостаза эпителия толстого кишечника и стволовых клеток толстого кишечника (CoSC). Авторы настоящего изобретения предполагают, что циркулирующая "гормональная" пара контролирует CoSC и разрушается при длительном диабете типа 1 (Т1D), что приводит к диабетической энтеропатии (DE). Индивидуумы с длительным Т1D проявляют аномалии слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта и CoSC и неспособность образовывать мини-кишечники *in vitro*. При протеомном профилировании сыворотки выявляли измененные уровни циркулирующего инсулиноподобного фактора роста 1 (IGF-I) и его связывающего белка-3 (IGFBP3) у индивидуумов с длительным Т1D с признаками повышенного опосредованного гипергликемией печеночного высвобождения IGFBP3. IGFBP3 предотвращает рост мини-кишечника *in vitro* посредством ТМЕМ219-зависимого/опосредованного каспазой IGF-I-независимого эффекта и разрушает CoSC в доклинических моделях *in vivo*. Восстановление нормогликемии при длительном Т1D с использованием трансплантации почек и поджелудочной железы и лечения рекомбинантным белком есто-ТМЕМ219 у мышей с диабетом восстанавливало CoSC посредством восстановления соответствующих уровней циркулирующих IGF-I/IGFBP3. Периферическая пара IGF-I/IGFBP3 контролирует CoSC и дисфункциональна при DE.

Авторы настоящего изобретения показали, что индивидуумы с длительным Т1D и DE имеют измененные CoSC и демонстрируют повышенные уровни IGFBP3. Введение IGFBP3 изменяет регенеративные свойства CoSC и морфологию слизистой оболочки *in vitro* и *in vivo* в доклинической модели DE посредством подавления циркулирующего IGF-I и осуществления ТМЕМ219-зависимого/опосредованного каспазой токсического эффекта в отношении CoSC. Наконец, получали новый рекомбинантный белок есто-ТМЕМ219 на основе внеклеточного домена рецептора IGFBP3 (ТМЕМ219). Есто-ТМЕМ219 подавляет периферический IGFBP3 и предотвращает его связывание с рецептором IGFBP3, ТМЕМ219. Затем направленное воздействие на IGFBP3 с использованием такого рекомбинантного белка есто-ТМЕМ219, экспрессирующегося на CoSC, отменяет вредные воздействия IGFBP3 *in vitro* и *in vivo*.

В настоящем описании представлены очевидные данные, демонстрирующие, что высвобождение IGFBP3 повышено у индивидуумов с высоким риском T1D и T2D. Примечательно, что авторы настоящего изобретения обнаружили, что рецептор IGFBP3, TMEM219 экспрессируется в линии β -клеток и на островках мышши/человека, и его лигирование с IGFBP3 является токсичным для β -клеток, повышая вероятность существования эндогенного β -клеточного токсина. Это позволяет предполагать, что β -клеточные токсины [β -токсины] могут участвовать в патогенезе T1D, в частности, на ранней стадии, когда повреждение островка/ β -клеток может облегчать экспонирование аутоантигенов иммунным клеткам, таким образом, создавая локальную воспалительную среду и устойчивую иммунную реакцию. Примечательно, что авторы настоящего изобретения наблюдали повышенные уровни IGFBP3 у индивидуумов с пре-T2D и T2D, что позволяет предполагать, что потенциальная роль этой оси также очевидна при T2D.

Авторы настоящего изобретения также наблюдали, что IGFBP3 может индуцировать апоптоз β -клеток и островков мышши/человека *in vitro* каспаза 8-зависимым образом. Наконец, недавно полученный рекомбинантный белок ecto-TMEM219 на основе внеклеточного домена TMEM219, способный подавлять IGFBP3, предотвращает передачу его сигнала посредством TMEM219 на β -клетках поджелудочной железы. Лечение ecto-TMEM219 снижает утрату β -клеток, улучшает содержание инсулина в островках и гликометаболический контроль в моделях диабета мышши (T1D и T2D) *in vivo*, в то время как *in vitro* он защищает островки и β -клетки от IGFBP3-индуцированного апоптоза. Авторы настоящего изобретения показали, что IGFBP3 является эндогенным периферическим β -клеточным токсином (или бетатоксином), все в большей мере выделяющимся у индивидуумов с высоким риском диабета (T1D и T2D). Одновременная экспрессия рецептора IGFBP3 (TMEM219) на β -клетках инициирует/способствует гибели β -клеток, таким образом, способствуя дебюту/прогрессированию диабета.

Другими словами, настоящее изобретение основано на обнаружении того, что TMEM219, рецептор IGFBP3, опосредующий IGFBP3/IGF1-независимые неблагоприятные эффекты, экспрессируется на панкреатических островках и β -клетках; кроме того, направленное воздействие на ось IGFBP3/TMEM219 с использованием ecto-TMEM219 восстанавливает соответствующую передачу сигнала IGFBP3 у мышши с диабетом, предотвращает потерю β -клеток и сохраняет морфологию островков, таким образом, подтверждая ключевую роль оси IGFBP3/TMEM219, способствующей потере β -клеток при диабете.

Терапевтический подход по настоящему изобретению на основе ингибирования оси IGFBP3/TMEM219 может помочь преодолеть ограничения существующих способов терапии T1D и T2D, т.к. с помощью него можно предотвращать повреждение β -клеток и последующее снижение или прекращение секреции инсулина, что приводит к развитию диабета.

В таком случае преимуществами настоящего изобретения по сравнению со способами лечения по предшествующему уровню техники являются

- предотвращение деструкции β -клеток и островков,
- защита β -клеточной массы и инсулин-продуцирующих клеток,
- профилактика основных осложнений диабета,
- ограничение аутоиммунной атаки в отношении панкреатических островков при T1D,
- профилактика резистентности к инсулину при T2D и
- отсутствии требований к иммунотерапии при T1D.

В таком случае изобретение относится к применению ингибитора оси IGFBP3/TMEM219 в лечении и/или профилактике диабета у индивидуума.

Предпочтительно указанный ингибитор выбран из группы, состоящей из

- a) полипептида;
- b) полинуклеотида, кодирующего указанный полипептид или полинуклеотид, способный ингибировать ось IGFBP3/TMEM219;
- c) вектора, содержащего или экспрессирующего указанный полинуклеотид;
- d) клетки-хозяина, генетически сконструированной так, что она экспрессирует указанный полипептид или указанный полинуклеотид;
- e) низкомолекулярного соединения;
- f) пептида, белка, антитела, антисмыслового олигонуклеотида, миРНК, антисмыслового экспрессирующего вектора или рекомбинантного вируса или любого другого средства, способного ингибировать или ось IGFBP3/TMEM219.

Предпочтительно указанный ингибитор является рецептором TMEM219 или его фрагментом.

Предпочтительно фрагмент TMEM219 является фрагментом, содержащим внеклеточный домен TMEM219.

В предпочтительном варианте осуществления ингибитор является ecto-TMEM219. Предпочтительно ингибитор является растворимым. Предпочтительно указанный ингибитор является слитым белком TMEM219-Ig, предпочтительно указанный слитый белок подавляет циркулирующий IGFBP3 и предотвращает его связывание с TMEM219.

Предпочтительно ингибитор является антителом против IGFBP3, предпочтительно указанное анти-

тело селективно блокирует участок связывания TMEM219.

Предпочтительно указанный ингибитор является антителом против TMEM219, предпочтительно указанное антитело занимает участок связывания IGFBP3 рецептора TMEM21, таким образом, предотвращая связывание IGFBP3.

Более предпочтительно указанный ингибитор является олигонуклеотидом, комплементарным мРНК IGFBP3.

В предпочтительном варианте осуществления диабет является диабетом типа 1 или типа 2.

Предпочтительно индивидуум выбран из группы, состоящей из индивидуума с риском развития диабета типа 1 и/или типа 2, индивидуума с ранней стадией диабета типа 1 и/или типа 2.

Настоящее изобретение также относится к фармацевтической композиции лечения и/или профилактики диабета, содержащей ингибитор по изобретению и фармацевтически приемлемые носители. Предпочтительно фармацевтическая композиция дополнительно содержит терапевтическое средство.

Предпочтительно терапевтическое средство выбрано из группы, состоящей из: инсулина в любой форме, прамлингида (симлина), ингибиторов ангиотензин-превращающего фермента (АСЕ) или блокаторов рецептора ангиотензина II (ARB), аспирина, лекарственных средств, снижающих холестерин, метформина (глюкофажа, глуметцы, др.), сульфонилкарбамидов (глибурида (ДиаБеты, глиназы), глипизид (глюкотрола) и глимегирида (амарила), меглитинидов (например, репаглинида (прандина) и натеглинида (старликса)), тиазолидиндионов (например, росиглитазона (авандии) и пиоглитазона (актоса)), ингибиторов DPP-4 (ситаглиптина (янувии), саксаглиптина (онглизы) и линаглиптина (траженты)), агонистов рецептора GLP-1 (эксенатида (Byetta) и лираглутида (виктозы)), ингибиторов SGLT2, примеры включают канаглифлозин (инвокана) и дапаглифлозин (форксига).

В настоящем изобретении ингибирование оси IGFBP3/TMEM219 означает блокирование связывания IGFBP3 с TMEM219, например, посредством подавления IGFBP3 в кровотоке, оно также означает блокирование участка связывания IGFBP3 TMEM219, блокирование участка связывания IGFBP3 на TMEM219. Оно дополнительно означает ингибирование функционирования TMEM219, и/или экспрессии, и/или передачи сигнала, этого можно достигать, например, посредством сайленсинга экспрессии TMEM219, в частности, с использованием миРНК или олигонуклеотидов. Оно также означает ингибирование функционирования и/или экспрессии IGFBP3.

В рамках изобретения ингибитор связывания IGFBP3 с TMEM219 может являться одной из следующих молекул:

растворимым есто-TMEM219 (внеклеточная часть TMEM219), нейтрализующим циркулирующий IGFBP3;

слитым белком TMEM219-Ig, слитым белком на основе Fc, состоящим из Fc-домена иммуноглобулина, напрямую связанного с пептидом TMEM219 или его внеклеточной частью, подавляющим циркулирующий IGFBP3 и предотвращающим его связывание с TMEM219, экспрессируемым на β -клетках;

антителом против IGFBP3, селективно блокирующим участок связывания TMEM219;

антителом против TMEM219, занимающим участок связывания IGFBP3 рецептора TMEM219, таким образом, предотвращающим связывание IGFBP3 (имеющее антагонистическую активность в отношении IGFBP3);

олигонуклеотидами, комплементарными мРНК IGFBP3.

В настоящем изобретении пациентами, которых можно лечить, являются индивидуумы с риском развития T1D (аутоиммунного диабета, с учетом наличия периферических аутоантител против островков или генетической предрасположенности, или семейной предрасположенности, или измененной функции β -клеток) или T2D (неаутоиммунного диабета, с учетом признаков снижения глюкозы натощак и/или снижения толерантности к глюкозе без удовлетворения критериев для диагностики диабета), или индивидуумы, у которых развился T1D или T2D на любой стадии заболевания, в частности индивидуум с ранней стадией диабета типа 1 и/или типа 2, с целью защиты β -клеток от дальнейшей деструкции. Наличие любого уровня сохраненных β -клетки является единственным требованием для оценки успешной терапии.

Экспрессию IGFBP3 можно измерять посредством RT-ПЦР на тканях и клетках, вестерн-блоттинга на тканях и клетках, иммуногистохимии на тканях, иммунофлуоресцентного анализа ткани и клеток. Уровни IGFBP3 в биологических жидкостях можно измерять с помощью иммунологических анализов и протеомного анализа.

Функцию IGFBP3 можно измерять посредством детекции экспрессии каспаз 8 и 9 на клетках-мишенях с использованием RT-ПЦР, микрочипов, сокультивирования клеток-мишеней/структур с пан-ингибитором каспазы, ингибиторами каспаз 8 и 9 и измерения живых клеток/структур.

В настоящем описании выражение "ингибирует или блокирует взаимодействие IGFBP3 с его рецептором TMEM219" означает подавление циркулирующего IGFBP3 и предотвращение его связывания с рецептором TMEM219, экспрессирующимся на панкреатических островках и β -клетках. Связывание IGFBP3-TMEM219 также можно предотвращать с помощью IGFBP3-блокирующего антитела. Кроме того, TMEM219-блокирующее антитело может связываться с рецептором TMEM219, таким образом, де-

лая рецептор недоступным, когда IGFBP3 поступает из кровотока.

Ингибитор по изобретению может являться рецептором TMEM219

(MGNCQAGHNLHLCLAHHPPLVCATLILLLLGLSGLGLGSFLLTHRTGLRSPDIPQDWVSFLRS
FGQLTLCPRGTVTGKWRGSHVVGLLTTLNFGDGPDRNTRTFQATVLGSSQMGLKGSSAGQLVLI
ARVTTERTAGTCLYFSAVPGILPSSQPPISCSEEGAGNATLSPRMGEECVSVWSHEGLVLTLL
TSEELALCGSRLLVLGSLLLFCGLLCCVTAMCFHPRRESHWSRTRL, SEQ ID NO: 1)

или его фрагментом.

В частности, конструируют фрагмент TMEM219, например, для блокирования/предотвращения доступа к IGFBP3 и/или его связывания с TMEM219, он имеет меньшую молекулярную массу, содержит пять цистеинов, образующих дисульфидные мостики и глобулярную структуру. Предпочтительно фрагмент имеет длину по меньшей мере 50 аминокислот, предпочтительно 100 аминокислот, предпочтительно 120 аминокислот, предпочтительно 150 аминокислот, предпочтительно по меньшей мере 160 аминокислот.

В предпочтительном варианте осуществления фрагмент имеет длину по меньшей мере 162, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 205, 210, 215, 220, 225, 230, 235 аминокислот. Предпочтительно фрагмент имеет по меньшей мере 65% идентичности с последовательностью TMEM219, предпочтительно по меньшей мере 70, 75, 80, 85, 90, 95 или 99% идентичности с последовательностью TMEM219.

Предпочтительно фрагмент TMEM21 является фрагментом внеклеточного домена TMEM219 (ecto-TMEM219), в частности фрагмент содержит последовательность

THRTGLRSPDIPQDWVSFLRSFGQLTLCPRNGTVTGWRGSHVVGLLTTLNFGDGPDRNK
TRTFQATVLGSSQMGLKGSSAGQLVLI TARVTTERTAGTCLYFSAVPGILPSSQPPISCSEEGAG
NATLSPRMGEECVSVWSHEGLVLTLLTSEELALCGSR (SEQ ID NO: 2).

Предпочтительно фрагмент TMEM219 является внеклеточным доменом TMEM219, в частности фрагмент содержит последовательность

SFLLTHRTGLRSPDIPQDWVSFLRSFGQLTLCPRNGTVTGKWRGSHVVGLLTTLNFGDGP
PDRNKTRTFQATVLGSSQMGLKGSSAGQLVLI TARVTTERTAGTCLYFSAVPGILPSSQPPISC
SEEGAGNATLSPRMGEECVSVWSHEGLVLTLLTSEELALCGSR (SEQ ID NO: 3).

Предпочтительно фрагмент TMEM21 состоит из

THRTGLRSPDIPQDWVSFLRSFGQLTLCPRGTVTGWRGSHVVGLLTTLNFGDGPDRNK
RTFQATVLGSSQMGLKGSSAGQLVLI TARVTTERTAGTCLYFSAVPGILPSSQPPISCSEEGAG
ATLSPRMGEECVSVWSHEGLVLTLLTSEELALCGSR (SEQ ID NO: 2).

Предпочтительно фрагмент TMEM219 состоит из

SFLLTHRTGLRSPDIPQDWVSFLRSFGQLTLCPRGTVTGKWRGSHVVGLLTTLNFGDGP
DRNKTRTFQATVLGSSQMGLKGSSAGQLVLI TARVTTERTAGTCLYFSAVPGILPSSQPPISCSE
EGAGNATLSPRMGEECVSVWSHEGLVLTLLTSEELALCGSR (SEQ ID NO: 3).

В настоящем изобретении TMEM219 предпочтительно является эукариотическим TMEM219, предпочтительно TMEM21 млекопитающего, предпочтительно TMEM219 человека.

Взаимодействие IGFBP3 с TMEM219 можно измерять посредством не прямой оценки эффектов IGFBP3 в отношении клеток-мишеней (повышенная экспрессия каспазы 8 и 9 по данным RT-ПЦР), прямой оценки связывания IGFBP3-IGFBP3-рецептор (TMEM219) с использованием жидкостного или твердофазного анализов связывания с лигандом (т.е. иммунопреципитация, RT-ПЦР, иммунологические анализы) и радиоактивные анализы связывания с лигандом.

В настоящем изобретении термин "длительный T1D" означает наличие диабета типа 1 в течение более чем 15 лет, ассоциированного с развитием диабетических осложнений.

В предпочтительном аспекте по изобретению ингибитор является антителом или его синтетическим или рекомбинантным производным. Указанное антитело предпочтительно является моноклональным или поликлональным антителом, или его синтетическими или рекомбинантными производными, более предпочтительно указанное антитело является гуманизированным моноклональным антителом.

Предпочтительно указанный полинуклеотид является РНК или ДНК, предпочтительно миРНК, shRNA, микроРНК или антисмысловым олигонуклеотидом.

В предпочтительном варианте осуществления указанный выше вектор является экспрессирующим вектором, выбранным из группы, состоящей из плазмид, вирусных частиц и фагов.

Предпочтительно указанная клетка-хозяин выбрана из группы, состоящей из бактериальных клеток, клеток грибов, клеток насекомых, клеток животных, растительных клеток, предпочтительно клеток животных, более предпочтительно клеток человека.

В предпочтительном варианте осуществления указанный выше ингибитор (а) комбинируют по меньшей мере с одним терапевтическим средством (b) для определения комбинации или комбинированного препарата. Терапевтическое средство может являться противодиабетическим средством, средством

для профилактики диабета, антиапоптотическим средством, противовоспалительным средством, иммуносупрессорным средством, адъювантной терапией при трансплантации органов, защитным средством при клеточной терапии, анальгетиком.

Примерами терапевтического средства являются инсулиновая терапия в любой форме, прамлинтид (симлин), ингибиторы ангиотензин-превращающего фермента (АСЕ) или блокаторы рецептора ангиотензина II (ARB), аспирин, лекарственные средства, снижающие холестерин, метформин (глюкофаж, глуметца, др.), сульфонилкарбамиды (глибурид (ДиаБета, глиназа), глипизид (глюкотрол) и глимепирид (амарил), меглитиниды (например, репаглинид (прандин) и натеглинид (старликс)), тиазолидиндионы (например, росиглитазон (авандия) и пиоглитазон (актос)), ингибиторы DPP-4 (ситаглиптин (янувия), саксаглиптин (онглиза) и линаглиптин (тражента)), агонисты рецептора GLP-1 (эксенатид (Byetta) и лираглутид (виктоза)), ингибиторы SGLT2, примеры включают канаглифлозин (инвокана) и дапаглифлозин (форсига).

В рамках изобретения помощью терминов "комбинация" и "комбинированный препарат" также определяют "набор из частей" в том смысле, что партнеры по комбинации (a) и (b), как определено выше, можно дозировать независимо или с использованием различных фиксированных комбинаций с характерными количествами партнеров по комбинации (a) и (b), т.е. одновременно или в различные моменты времени. Затем части набора из частей, например, можно вводить одновременно или по очереди, т.е. в различные моменты времени и с равными или разными временными интервалами для любой части набора из частей. Соотношение общих количеств партнера по комбинации (a) и партнера по комбинации (b), подлежащих введению в комбинированном препарате, можно варьировать, например, для удовлетворения потребностей субпопуляции пациентов, подлежащих лечению, или потребностей одного пациента.

Комбинированное лечение может приводить к неожиданному улучшению лечения диабета. При одновременном, последовательном или раздельном введении ингибитор и другое терапевтическое средство могут взаимодействовать синергично, снижая диабет. Эта неожиданная синергия делает возможным снижение необходимой дозы каждого соединения, что приводит к снижению побочных эффектов и повышению клинической эффективности соединений и лечения. Определяя синергическое взаимодействие между одним или несколькими компонентами, можно окончательно измерять оптимальный диапазон для эффекта и абсолютные диапазоны доз каждого компонента для эффекта посредством введения пациентам, нуждающимся в лечении, компонентов с различными диапазонами соотношений мас./мас. и дозами. В случае людей сложность и стоимость осуществления клинических исследований на пациентах делает нецелесообразным использование этой формы тестирования в качестве основной модели синергии. Однако наблюдение синергии у одного вида может быть прогностическим для эффекта у других видов, и существуют модели на животных, как представлено в настоящем описании, для измерения синергического действия, и результаты таких исследований также можно использовать для прогнозирования эффективной дозы и диапазонов соотношений концентраций в плазме и абсолютных доз и концентраций в плазме, необходимых для других видов, с использованием фармакокинетических/фармакодинамических способов. Установленные корреляции между моделями диабета и эффектами, наблюдаемыми у людей, позволяют предполагать, что синергию у животных, например, можно демонстрировать на моделях, описанных в примерах ниже.

Указанные выше фармацевтические композиции предпочтительно предназначены для системного, перорального, местного, предпочтительно ректального или местного введения.

Контрольное количество является количеством, измеряемым в соответствующем контроле.

Контрольные средства можно использовать для сравнения количества соединения, определенного выше, или его повышения с соответствующим контролем. Соответствующий контроль можно получать, например, с учетом известного стандарта из нормального индивидуума или нормальной популяции.

Средствами для измерения количества IGFBP3, как определено выше, предпочтительно являются по меньшей мере одно антитело, его функциональный аналог или производные. Указанное антитело, функциональный аналог или производные специфичны для указанного соединения.

Соответствующий контроль может являться образцом, полученным из здорового пациента или пациента, страдающего иным нарушением, чем диабет.

В настоящем описании выражение "измерение количества" может означать измерение количества, концентрации или уровня соответствующего белка, и/или мРНК, и/или ДНК, предпочтительно полуколичественное или количественное. Измерение белка можно осуществлять прямо или косвенно. Прямое измерение относится к мере количества или концентрации биомаркера на основе сигнала, полученного напрямую от белка и напрямую коррелирующего с количеством молекул белка, присутствующих в образце. Этот сигнал, который также можно обозначать как интенсивностный сигнал, можно получать, например, посредством измерения значения интенсивности химического или физического свойства биомаркера. Непрямые измерения включают измерение вторичного компонента (например, компонента, отличающегося от продукта экспрессии гена) и биологической системы измерения (например, измерения клеточных ответов, лигандов, "меток" или продуктов ферментативной реакции).

В рамках изобретения термин "количество", в качестве неограничивающих примеров, относится к абсолютному или относительному количеству белков, и/или их мРНК, и/или их ДНК, и любому другому

значению или параметру, ассоциированному с ними или который может являться их результатом. Такие значения или параметры включают значения интенсивности сигнала, полученного благодаря физическим или химическим свойствам белка, полученного посредством прямого измерения, например значения интенсивности при иммунологическом анализе, масс-спектрологии или анализе ядерного магнитного резонанса. Кроме того, эти значения или параметры включают значения или параметры, полученные посредством непрямого измерения, например, с помощью любой из систем измерения, представленных в настоящем описании. Способы измерения мРНК и ДНК в образцах известны в этой области. Для измерения уровней нуклеиновой кислоты можно лизировать клетки в тестируемом образце и измерять уровни мРНК в лизатах или РНК, очищенной или полуочищенной из лизата, любым из способов, известных специалисту в этой области. Такие способы включают анализы гибридизации с использованием детектируемо меченых ДНК- или РНК-зондов (т.е. нозерн-блоттинг) или количественных или полуколичественных способов RT-ПЦР с использованием подходящих олигонуклеотидных праймеров. Альтернативно, можно осуществлять количественные или полуколичественные анализы гибридизации *in situ* с использованием, например, тканевых срезов, или нелизованных клеточных суспензий и детектируемо меченых (например, флуоресцентных или меченых ферментом) ДНК- или РНК-зондов. Дополнительные способы количественного анализа мРНК включают анализ с защитой РНК (RPA), кДНК- и олигонуклеотидные микрочипы, репрезентативный дифференциальный анализ (RDA), дифференциальный дисплей, анализ последовательности EST и серийный анализ экспрессии генов (SAGE).

Если при сравнении измеренного количества белка IGFBP3 или полинуклеотида, кодирующего указанный белок, с количеством, полученным из контрольного образца, количество указанного соединения в образце, выделенном из индивидуума, соответствует более высокому значению, у индивидуума может присутствовать заболевание, или указанное заболевание может ухудшаться.

Если при сравнении измеренного количества белка IGFBP3 или полинуклеотида, кодирующего указанный белок, с количеством, полученным из контрольного образца, количество указанного соединения в образце, выделенном из индивидуума, соответствует схожему или более низкому значению, индивидуум может не страдать заболеванием, или заболевание может улучшаться соответственно.

Альтернативно, выражение "детекция" или "измерение количества" означает измерение изменения молекулы. Указанное изменение может отражать повышение или снижение количества соединений, как определено выше. Повышение белка IGFBP3 или полинуклеотида, кодирующего указанный белок, может коррелировать с ухудшением заболевания. Снижение белка IGFBP3 или полинуклеотида, кодирующего указанный белок, может коррелировать с улучшением заболевания или выздоровлением индивидуума.

Выражение "белок IGFBP3", или "IGFBP3", или "TMEM219" также предназначено для включения соответствующего белка, кодируемого ортологичными или гомологичными генами IGFBP3 или TMEM, их функциональными мутантами, функциональными производными, функциональными фрагментами или аналогами, изоформами. Выражение "ген IGFBP3", или "IGFBP3", или "ген TMEM21", или "TMEM219" также предназначено для включения соответствующих ортологичных или гомологичных генов, их функциональных мутантов, функциональных производных, функциональных фрагментов или аналогов, изоформ.

В настоящем описании "функциональными мутантами" белка являются мутанты, которые можно получать посредством мутагенеза одной или нескольких аминокислот в их последовательностях, и которые сохраняют свою активность при лечении диабета. Фактически, белок по изобретению, при необходимости, можно модифицировать *in vitro* и/или *in vivo*, например, посредством гликозилирования, миристоилирования, амидирования, карбоксилирования или фосфорилирования, и можно получать, например, синтетическими или рекомбинантными способами, известными в этой области. Белок по изобретению "IGFBP3" или "TMEM219" можно модифицировать для повышения его биодоступности или времени полужизни способом, известным в этой области. Например, белок можно конъюгировать с полимером, пегилировать и т.д.

В настоящем изобретении активные ингредиенты также можно заключать в микрокапсуле, полученной, например, способами коацервации или интерфазной полимеризации, например гидроксиметилцеллюлозной или желатиновой микрокапсуле и полиметилметакрилатной микрокапсуле соответственно, в коллоидных системах доставки лекарственного средства (например, липосомах, альбуминовых микро-сферах, микроэмульсиях, наночастицах и микрокапсулах) или макроэмульсиях. Такие способы описывают в Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980).

Составы, подлежащие использованию для введения *in vivo*, должны быть стерильными. Это легко осуществлять посредством фильтрации через стерильные фильтрационные мембраны.

Можно получать препараты с замедленным высвобождением. Подходящие примеры препаратов с замедленным высвобождением включают полупроницаемые матрицы из твердых гидрофобных полимеров, содержащих антигено, где матрицы находятся в форме профилированных изделий, например пленок, или микрокапсул. Примеры матриц с замедленным высвобождением включают полиэфир, гидрогели (например, поли-(2-гидроксиэтилметакрилат)), или поливиниловый спирт, полилактиды (патент США № 3773919), сополимеры L-глутаминовой кислоты и [гамма]этил-L-глутамата, недеградирующий

этиленвинилацетат, деградирующие сополимеры молочной и гликолевой кислот, такие как инъеклируемые микросферы, состоящие из сополимера молочной и гликолевой кислот и ацетата лейпролида, и поли-D(-)-3-гидроксимасляная кислота. Хотя полимеры, такие как этиленвинилацетат и сополимеры молочной и гликолевой кислот, делают возможным высвобождение молекул в течение более 100 дней, конкретные гидрогели высвобождают белки в течение более коротких периодов времени. Если инкапсулированные антитела остаются в организме в течение длительного времени, они могут денатурировать или подвергаться агрегации в результате воздействия влаги при 37°C, что приводит к утрате биологической активности и возможным изменениям иммуногенности. Можно разрабатывать рациональные стратегии для стабилизации в зависимости от рассматриваемого механизма. Например, если обнаруживают, что механизм агрегации представляет собой образование межмолекулярной S-S-связи посредством тиодисульфидного обмена, стабилизации можно достигать посредством модификации сульфгидрильных остатков, лиофилизации из кислых растворов, контроля содержания влаги, использования соответствующих добавок и разработки конкретных композиций полимерных матриц.

В настоящем изобретении термин "функциональный" означает, например, "сохраняющий свою активность", например, в случае терапевтического лечения диабета.

В рамках изобретения термин "аналог" в отношении белка означает модифицированный пептид, где один или несколько аминокислотных остатков пептида заменяют другими аминокислотными остатками, и/или где один или несколько аминокислотных остатков подвергают делеции из пептида, и/или где один или несколько аминокислотных остатков подвергают делеции из пептида, и/или где один или несколько аминокислотных остатков добавляют в пептид. Такое добавление или делецию аминокислотных остатков можно осуществлять на N-конце пептида и/или C-конце пептида.

В рамках изобретения термин "производное" в отношении белка означает химически модифицированный пептид или его аналог, где по меньшей мере один заместитель не присутствует в немодифицированном пептиде или его аналоге, т.е. пептиде, являющемся ковалентно модифицированным. Типичными модификациями являются амиды, углеводы, алкильные группы, ацильные группы, сложные эфиры и т.п. В рамках изобретения термин "производные" также относится к более длинным или коротким полипептидам, имеющим, например, процент идентичности по меньшей мере 41%, предпочтительно по меньшей мере 41,5, 50, 54,9, 60, 61,2, 64,1, 65, 70 или 75%, более предпочтительно по меньшей мере 85%, например по меньшей мере 90%, и даже более предпочтительно по меньшей мере 95% по отношению к IGFBP3 или аминокислотной последовательности соответствующей области, кодируемой ортологичным или гомологичным геном IGFBP3.

В рамках изобретения термин "фрагменты" относится к полипептидам, предпочтительно имеющим длину по меньшей мере 10 аминокислот, более предпочтительно по меньшей мере 15, по меньшей мере 17 аминокислот или по меньшей мере 20 аминокислот, даже более предпочтительно по меньшей мере 25 аминокислот или по меньшей мере 37 или 40 аминокислот и более предпочтительно по меньшей мере 50, или 100, или 150, или 200, или 250, или 300, или 350, или 400, или 450, или 500 аминокислот.

По настоящему изобретению "эффективное количество" композиции является количеством, достаточным для достижения желаемого биологического эффекта, в этом случае улучшения или лечения диабета.

Следует понимать, что эффективная доза будет зависеть от возраста, пола, здоровья и массы реципиента, типа сопутствующего лечения, при его наличии, частоты лечения и природы желаемого эффекта. Представленные диапазоны эффективных доз ингибитора или молекулы по изобретению (например, от 1 до 1000 мг/кг, в частности, вводимых системно) не предназначены для ограничения изобретения и представляют собой предпочтительные диапазоны доз. Однако предпочтительную дозу можно адаптировать в зависимости от индивидуума, как будет понятно специалисту в этой области, и он может определять их без излишнего экспериментирования.

Введение олигонуклеотидов по настоящему изобретению можно осуществлять известными способами, где нуклеиновую кислоту встраивают в желаемую клетку-мишень *in vitro* или *in vivo*.

Аспект настоящего изобретения включает конструкцию нуклеиновой кислоты, содержащуюся в средстве доставки. Средство доставки является объектом, посредством которого нуклеотидную последовательность можно транспортировать по меньшей мере из одной среды в другую. Средства доставки, как правило, можно использовать для экспрессии последовательностей, кодируемых конструкцией нуклеиновой кислоты, и/или для внутриклеточной доставки конструкции. В объем настоящего изобретения входит то, что средство доставки может являться средством, выбранным из группы средств на основе РНК, средств на основе ДНК/векторов, средств на основе липидов, средств на основе вирусов и средств на основе клеток. Примеры таких средств доставки включают биodeградируемые полимерные микросферы, составы на основе липидов, такие как липосомные носители, нанесение конструкции на частицы коллоидного золота, липополисахариды, полипептиды, полисахариды, пегилирование вирусных частиц.

В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение может включать вирус в качестве средства доставки, где вирус можно выбирать из аденовирусов, ретровирусов, лентивирусов, аденоассоциированных вирусов, вирусов герпеса, вирусов осповакцины, пенящихся вирусов, цитомегаловирусов, вируса леса Семлики, поксвирусов, вектора РНК-вируса и вектора ДНК-вируса. Такие вирусные векторы

хорошо известны в этой области.

Общепотребительные способы переноса генов включают способы с использованием фосфата кальция, DEAE-декстрана, трансфекцию, электропорацию, микроинъекцию и способы с использованием вирусов. Другим способом встраивания ДНК в клетки является использование катионных липосом. Коммерчески доступными составами катионных липидов являются, например, Tfx 50 (Promega) или липофектамин 2000 (Life Technologies).

Композиции по настоящему изобретению могут находиться в форме раствора, например инъекционного раствора, крема, мази, таблетки, суспензии или т.п. Композицию можно вводить любым подходящим способом, например, посредством инъекции, в частности посредством внутриглазной инъекции, пероральным, местным, назальным, ректальным способом и т.д. Носитель может являться любым подходящим фармацевтическим носителем. Предпочтительно используют носитель, способный повышать эффективность введения молекул РНК в клетки-мишени. Подходящими примерами таких носителей являются липосомы, в частности катионные липосомы. Рекомбинантный экспрессирующий вектор по изобретению может являться любым подходящим рекомбинантным экспрессирующим вектором, и его можно использовать для трансформации или трансфекции любого подходящего хозяина.

Подходящие векторы включают векторы, сконструированные для размножения и экспансии, или для экспрессии, или и того и другого, такие как плазмиды и вирусы. Рекомбинантные экспрессирующие векторы по изобретению можно получать стандартными способами рекомбинантной ДНК. Можно получать конструкции экспрессирующих векторов, являющиеся кольцевыми или линейными, содержащие систему репликации, функциональную в прокариотической или эукариотической клетке-хозяине. Можно получать системы репликации, например, из CoIE1, плазмиду 2 μ , λ , SV40, вирус бычьей папилломы и т.п.

Желательно, чтобы рекомбинантный экспрессирующий вектор содержал регуляторные последовательности, такие как кодоны инициации и терминации транскрипции и трансляции, специфичные для типа хозяина (например, бактерии, гриба, растения или животного), в которого встраивают вектор, при необходимости и с учетом того, основан ли вектор на ДНК или РНК. Рекомбинантный экспрессирующий вектор может включать один или несколько маркерных генов, делающих возможной селекцию трансформированных или трансфицированных хозяев. Маркерные гены включают гены резистентности к бицидам, например резистентности к антибиотикам, тяжелым металлам и т.д., комплементации в ауксотрофном хозяине для обеспечения прототрофии и т.п. Подходящие маркерные гены для экспрессирующих векторов по настоящему изобретению включают, например, гены резистентности к неомицину/G418, гены резистентности к гигромицину, гены резистентности к гистидинолу, гены резистентности к тетрациклину и гены резистентности к ампициллину. Рекомбинантный экспрессирующий вектор может содержать нативный или стандартный промотор, функционально связанный с нуклеотидной последовательностью, кодирующей ингибитор PCYOX1 (включая его функциональные части и функциональные варианты), или с нуклеотидной последовательностью, комплементарной или гибридирующейся с нуклеотидной последовательностью, кодирующей РНК. Выбор промоторов, например, сильных, слабых, индуцибельных, тканеспецифических и специфичных для стадии развития, находится в пределах навыков специалиста в этой области. Аналогично, комбинирование нуклеотидной последовательности с промотором также находится в пределах навыков специалиста в этой области. Промотор может являться невирусным промотором или вирусным промотором, например, промотором цитомегаловируса (CMV), промотором SV40, промотором RSV и промотором, обнаруживаемым в длинном концевом повторе вируса стволовых клеток мыши.

Рекомбинантные экспрессирующие векторы по изобретению можно конструировать для транзиторной экспрессии, стабильной экспрессии или и того, и другого. Кроме того, рекомбинантные экспрессирующие векторы можно получать для конститутивной экспрессии или индуцируемой экспрессии.

Что касается указанных выше композиций IGFBP3, дополнительные материалы, а также способы обработки и т.п. можно найти в ч. 5 Remington's Pharmaceutical Sciences, 20th Edition, 2000, Marck Publishing Company, Easton, Pennsylvania, включенного в настоящее описание в качестве ссылки.

Соединения по настоящему изобретению также можно вводить в формах с замедленным высвобождением или с помощью систем доставки лекарственных средств с замедленным высвобождением. Описание типичных материалов с замедленным высвобождением также можно обнаружить во включенных материалах в Remington's Pharmaceutical Sciences. Кроме того, фармацевтические составы можно получать способом, как правило, известным в области фармацевтики.

В настоящем изобретении, если молекулу по изобретению вводят с другим терапевтическим средством, ее можно вводить одновременно или последовательно.

Последовательности

Аминокислотная последовательность IGFBP3:

MQRARPTLWAAALTLVLLRGGPPVARAGASSAGLGPVVRCEPCDARALAQCAPPPAVCA
 ELVREPGCGCCLTCALSEGQPCGIYTERCGSGLRCQSPDEARPLQALLDGRGLCVNASAVSRL
 RAYLLPAPPAPGEPAPGNASESEEDRSAGSVESPSVSSSTRVSDPKFHLHLSKJIIKGHAKD
 SQRYKVDYESQSTDTQNFSSSESKRETEYGPCRREMEDTLNHLKFLNVLSPRGVHIPNCDKKGIFY
 KKKQCRPSKGRKRGFCWCVDKYGQPLPGYTTKGGKEDVHCYSMQSK (SEQ ID NO: 4)

Нуклеотидная последовательность IGFBP3:

связывающий белок инсулиноподобного фактора роста 3 (IGFBP3) Homo sapiens, RefSeqGene на хромосоме 7, референсная последовательность NCBI: NG_011508.1.

Последовательность мРНК IGFBP3:

связывающий белок инсулиноподобного фактора роста 3 (IGFBP3) Homo sapiens, вариант транскрипта 1, мРНК, референсная последовательность NCBI: NM_001013398.1.

Аминокислотная последовательность TMEM219:

MGNCQAGHNLHLCLANHPPLVCATLILLLLGLSGLGLGSFLLTHRTGLRSPDIPQDWVS
 FLRSFGQLTLCPRNGTGTGKWRGSHVVGLLTTLNFGDGPDRNKTRTFQATVLGSQMGLGSSAGQ
 LVLI TARVTTERTAGTCLYFSAVPGILPSSQPPISCSSEEGAGNATLSPRMGEECVSVWSHEGLV
 LTKLLTSEELALCGSRLLVLGSLLLLFCGLLCCVTAMCFHPRRESHWSRTRL (SEQ ID NO:

1).

Нуклеотидная последовательность TMEM219:

трансмембранный белок 219 TMEM219 [Homo sapiens (человека)], ID гена: 124446.

Последовательность мРНК TMEM219:

трансмембранный белок 219 (TMEM219) Homo sapiens, вариант транскрипта 1, мРНК, референсная последовательность NCBI: NM_001083613.1.

Настоящее изобретение будет проиллюстрировано с помощью неограничивающих примеров со ссылкой на следующие чертежи.

Фиг. 1. Диабетическая энтеропатия при длительном T1D отличается аномалиями слизистой оболочки кишечника и нарушениями стволовых клеток толстого кишечника. А, В, С. На гистограммах изображена балльная оценка диарей, боли в области живота и запора в соответствии с опросником GSRS у здоровых индивидуумов (CTRL) и индивидуумов с длительным T1D (T1D+ESRD). Серой областью указан нормальный диапазон для параметра. D, E, F. На гистограммах приведены измерения тонуса сокращения анального сфинктера (мм рт.ст.), рефлекторной реакции (мл) и объема неотложного позыва (мл) по данным аноректальной манометрии у здоровых индивидуумов (CTRL) и индивидуумов с длительным T1D (T1D+ESRD). Серой областью указан нормальный диапазон параметра. В оценку включали индивидуумов N=20 CTRL и n=60 T1D+ESRD. G1-G2, I1-I2, K1-K2, M1-M2, O1-O2, Q1-Q2. Типичные изображения гистологического окрашивания гематоксилином и эозином (H&E), иммунологически окрашенные MIB1⁺ клетки, ультраструктурный анализ нейронных структур, где белыми стрелками показана локализация и наличие нейроэндокринных везикул, иммунологически окрашенные 5HT⁺, альдегиддегидрогеназа-положительные (Aldh)⁺ клетки и экспрессия EphB2⁺ на биоптатах, полученных от здоровых индивидуумов (CTRL) и индивидуумов с длительным T1D (T1D+ESRD). Масштабная линейка для ультраструктурного анализа: 2000 нм. Исходное увеличение: 100-кратное для G1-G2; 400-кратное для I1-I2, K1-K2; 40-кратное для O1-O2; 200-кратное для Q1-Q2. Масштабная линейка 80 мкм. H, J, L, N, P, R. На гистограммах представлено измерение крипт, MIB1⁺ клеток, нейроэндокринных везикул нервных окончаний (количество случаев с >3 везикулами NE на нервное окончание), 5HT⁺, Aldh⁺ клеток и экспрессии EphB2⁺ (баллы интенсивности 0-5) у CTRL и индивидуумов с длительным T1D (T1D+ESRD). В оценку включали индивидуумов N=20 CTRL и n=60 T1D+ESRD. Данные выражены как среднее ± стандартная ошибка среднего (SEM), если не указано иначе. *p<0,01; **p<0,001; ***p<0,0001. Сокращения: GSRS, шкала рейтинга желудочно-кишечных симптомов; CoSC, стволовая клетка кишечника; T1D, диабет типа 1; ESRD, терминальная стадия почечной недостаточности; CTRL, здоровые индивидуумы; H&E, гематоксилин и эозин; MIB1, антитело против Ki67; EphB2, рецептор эфрина B 2; Aldh, альдегиддегидрогеназа; 5HT, серотонин; NE, нейроэндокринные везикулы.

Фиг. 2. Диабетическая энтеропатия при длительном T1D ассоциирована с дефектом CoSC. А, В. Типичные точечные диаграммы EphB2^{low}, EphB2^{medium} и EphB2^{hi} клеток у здоровых индивидуумов (CTRL) и индивидуумов с длительным T1D (T1D+ESRD). С, D, E. На гистограммах изображены результаты проточного цитометрического анализа EphB2^{hi+}, EphB2^{hi+}LGR5⁺ и EphB2^h-TERT⁺ клеток в свежelyделенных криптах (n=10 CTRL и n=10 T1D+ESRD). F, G, H. На гистограммах изображены данные об экспрессии маркеров CoSC EphB2, LGR5, h-TERT в виде нормализованной экспрессии мРНК, измеряемой посредством количественной RT-ПЦР на выделенных кишечных криптах. Все образцы анализировали в трех параллелях и нормализовали по экспрессии гена домашнего хозяйства ACTB ($\Delta\Delta Ct$). I. На

диаграмме рассеяния представлены характерные маркеры CoSC и профилирование транскриптома стволовых клеток, исследуемое на свежевыделенных кишечных криптах $n=10$ здоровых индивидуумов (CTRL) и $n=10$ индивидуумов с длительным T1D (T1D+ESRD). J1-J2. Типичные изображения мини-кишечников, культивируемых в течение 8 дней *in vitro*, полученных из ранее выделенных крипт индивидуумов с длительным T1D (T1D+ESRD) и здоровых индивидуумов (CTRL). 10-кратное увеличение. Масштабная линейка 50 мкм. К. На гистограмме изображен % развившихся мини-кишечников от общего количества через 8 дней культивирования свежевыделенных кишечных крипт из $n=10$ CTRL и $n=10$ T1D+ESRD индивидуумов. L1-L4. Типичные изображения мини-кишечников, полученных из ранее выделенных крипт здоровых индивидуумов (CTRL) и культивированных в течение 8 дней в следующих условиях: L1 = нормальная (FBS) сыворотка+нормальная глюкоза (5 мМ); L2 = сыворотка T1D+ESRD+нормальная глюкоза; L3 = нормальная сыворотка+высокая глюкоза (35 мМ); L4 = сыворотка T1D+ESRD+высокая глюкоза. 10-кратное увеличение. Масштабная линейка 50 мкм. М. Гистограмма с группированием % развившихся мини-кишечников от общего количества через 8 дней культивирования из свежевыделенных кишечных крипт, культивируемых в следующих условиях: нормальная (FBS) сыворотка+нормальная глюкоза (5 мМ); сыворотка T1D+ESRD+нормальная глюкоза; нормальная сыворотка+высокая глюкоза (35 мМ); сыворотка T1D+ESRD+высокая глюкоза. Статистическую значимость вычисляют в каждой группе (нормальная глюкоза+нормальная сыворотка, среда+высокая глюкоза, среда+сыворотка при длительном T1D, высокая глюкоза+сыворотка при длительном T1D) посредством сравнения различных условий культивирования. Сравнение на гистограмме относится ко всем условиям относительно нормальной сыворотки+нормальной глюкозы. N. На профиле транскриптома изображена экспрессия характерных маркеров CoSC в выделенных криптах, полученных из здоровых индивидуумов и культивируемых с/без высокой глюкозы и/или сыворотки при длительном T1D. Оценивали $N=10$ индивидуумов на группу. Данные выражены как среднее \pm стандартная ошибка среднего (SEM), если не указано иначе. * $p<0,01$; ** $p<0,001$; *** $p<0,0001$. Сокращения: CoSC, стволовая клетка толстого кишечника; T1D, диабет типа 1; ESRD, терминальная стадия почечной недостаточности; CTRL, здоровые индивидуумы; EphB2, рецептор эфрина B 2; LGR5, сопряженный с G-белком рецептор 5, содержащий богатый лейцином повтор; RT-ПЦР, полимеразная цепная реакция в реальном времени; ACTB, β -актин; FBS, эмбриональная телячья сыворотка.

Фиг. 3. Циркулирующие IGF-I и IGFBP3 изменяются при длительном T1D, и манипуляции с ними *in vitro* вызывают сильные эффекты в отношении роста и самоподдержания CoSC. А. На тепловой карте представлен протеомный профиль при длительном T1D (T1D+ESRD) по сравнению со здоровыми индивидуумами (CTRL). Полный набор данных идентифицированных и количественно проанализированных белков подвергали статистическому анализу ($p<0,01$). В значительной степени дифференциально экспрессирующиеся белки дополнительно анализировали посредством иерархической кластеризации. Анализировали сыворотки $n=10$ CTRL и $n=10$ T1D+ESRD индивидуумов. В. На гистограмме изображена интенсивность LFQ для одного белка, экстраполированная из нецелевого протеомного анализа, связывающий белок инсулиноподобного фактора роста 3 (IGFBP3). C1-C2. Типичные изображения (40-кратное увеличение) экспрессии IGFBP3 в печени. IGFBP3 слабо и диффузно экспрессировался в паренхиме печени здоровых индивидуумов (C1), в то время как у индивидуумов с длительным диабетом он расположен более зонально (C2). D. На гистограмме представлены уровни IGFBP3, измеряемые посредством ELISA в супернатантах линии иммортализованных клеток гепатомы человека (HuH-7), культивируемых в течение 5 дней при различных концентрациях глюкозы (35 мМ: высокая глюкоза; 20 мМ: промежуточная глюкоза; 5 мМ: нормальная глюкоза). Эксперименты осуществляли в трех параллелях. E. На гистограмме представлены уровни инсулиноподобного фактора роста 1 (IGF-I), измеряемые посредством ELISA в сыворотке здоровых индивидуумов и индивидуумов с длительным T1D (T1D+ESRD). F. С помощью анализа вестерн-блоттинга (обрезанные блоты) подтверждали экспрессию IGF-IR и TMEM219 на поверхности кишечной крипты. Оценка общей экспрессии IGF-IR посредством WB включает детекцию IGF-IRa, субъединицы целого белка IGF-IR. Типичные изображения гибридизации TMEM219 *in situ* (G1 - отрицательный контроль, G2 - окрашивание TMEM219), осуществленной на биоптатах слизистой оболочки прямой кишки, полученных из CTRL. 20-кратное увеличение. G1-G2. Типичные изображения гибридизации TMEM219 *in situ* (G1 - отрицательный контроль, G2 - окрашивание TMEM219), осуществленной на биоптатах слизистой оболочки прямой кишки, полученных из CTRL. 400-кратное увеличение. H. На гистограмме изображена нормализованная экспрессия мРНК TMEM219 (рецептора IGFBP3) с использованием способа $\Delta\Delta Ct$. Оценивали $N=5$ индивидуумов на группу. I. Гистограмма с группированием % развившихся мини-кишечников от общего количества, полученных из индивидуумов с длительным T1D в различных условиях и демонстрирующих эффект IGF-I, IGFBP3 и антитела против IGF-IR. Представлены значения p относительно исходных условий и добавления IGF-I в культуру. J. Гистограмма, на которой представлена нормализованная экспрессия мРНК каспазы 8 и 9 в криптах, выделенных из здоровых индивидуумов, культивируемых в присутствии IGFBP3 и IGF-I+IGFBP3 в трех параллелях. K. Гистограмма с группированием % развившихся нормальных мини-кишечников от общего количества, полученных из здоровых индивидуумов и культивируемых в присутствии пан-ингибитора каспазы, селектив-

ных ингибиторов каспазы 8, 9 и 3 и/или IGFBP3, через 8 дней культивирования. Анализ осуществляли в трех параллелях. L. Гистограммы с группированием % развившихся нормальных мини-кишечников от общего количества, полученных из здоровых индивидуумов, культивируемых в различных условиях (нормальная глюкоза+нормальная сыворотка, высокая глюкоза+нормальная сыворотка, сыворотка T1D+ESRD+нормальная глюкоза, сыворотка T1D+ESRD+высокая глюкоза) и демонстрирующих эффект IGF-I, IGFBP3 и против IGF-IR. Представлены значения *p* относительно исходных условий (только среда, среда+высокая глюкоза, среда+сыворотка при длительном T1D, высокая глюкоза+сыворотка при длительном T1D). Вычисляли дополнительные значения *p* для сравнения различий роста мини-кишечников среди следующих условий: только среда по сравнению со средой+высокая глюкоза по сравнению со средой+высокая глюкоза+сыворотка при длительном T1D). Анализ осуществляли в трех параллелях. M. Гистограмма с группированием % развившихся мини-кишечников от общего количества, полученных из здоровых индивидуумов, культивируемых в течение 8 дней, подвергнутых направленному воздействию на TMEM219 с использованием миРНК и, наконец, сравниваемых с TMEM219-экспрессирующими криптами только в среде и в среде+высокая глюкоза+сыворотка при длительном T1D. Анализ осуществляли в трех параллелях. Данные выражены как среднее \pm стандартная ошибка среднего (SEM), если не указано иначе. **p*<0,01; ***p*<0,001; ****p*<0,0001. Сокращения: IGF-I, инсулиноподобный фактор роста 1; IGFBP3, связывающий белок инсулиноподобного фактора роста 3; IGF-IR, рецептор инсулиноподобного фактора роста 1; CoSC, стволовая клетка толстого кишечника; T1D, диабет типа 1; ESRD, терминальная стадия почечной недостаточности; CTRL, здоровые индивидуумы; RT-ПЦР, полимеразная цепная реакция в реальном времени; ACTB, β -актин; LFQ, количественный анализ без метки; SEM, стандартная ошибка среднего; миРНК, малая интерферирующая РНК; ингиб., ингибитор.

Фиг. 4. Эффекты периферической пары IGF-I/IGFBP3 в отношении полученных *in vitro* из отдельных клеток мини-кишечников и каскада каспаз. Манипуляции с периферической парой IGF-I/IGFBP3 изменяют прогрессирование диабетической энтеропатии в доклинической модели диабетической энтеропатии, в то время как лечение длительного T1D с одновременной трансплантацией поджелудочной железы-почки (SPK) улучшает желудочно-кишечные симптомы, моторику и морфологию. A. Гистограмма, на которой представлена нормализованная экспрессия мРНК TMEM219, LRP1, TGF- β типа I и II, в сортированных по EphB2⁺ отдельных клетках, полученных из крипт здоровых индивидуумов. Эксперименты осуществляли в трех параллелях. B. Гистограммы, на которых представлен % развившихся, полученных из отдельных клеток мини-кишечников (от общего количества), полученных из EphB2⁺ клеток, сортированных из свежeweделенных крипт здоровых индивидуумов и культивируемых в различных условиях (нормальная глюкоза+нормальная сыворотка, высокая глюкоза+нормальная сыворотка, сыворотка T1D+ESRD+нормальная глюкоза, сыворотка T1D+ESRD+высокая глюкоза), и на которых представлен эффект IGF-I и IGFBP3. Представлены значения *p* относительно исходных условий. C, D. Диаграмма рассеяния, на которой представлено профилирование апоптотического транскриптома, исследуемого в свежeweделенных кишечных криптах здоровых индивидуумов (CTRL) и индивидуумов с длительным T1D (T1D+ESRD), культивируемых с/без IGFBP3 и IGF-I. Эксперименты осуществляли в трех параллелях. E. Попытка схематического представления эффекта циркулирующих IGF-I и IGFBP3 в отношении CoSC. F, G, I. Линейные графики, на которых представлены количество крипт (B), глубина крипт (C) и ширина крипт (E), оцениваемые на срезах нижних отделов желудочно-кишечного тракта, полученных в начале и через 8 недель из мышей B6, которым вводили STZ, у которых развилась диабетическая энтеропатия (B6+STZ), наивных мышей B6 (WT), и наивных мышей B6, которым вводили IGFBP3 (WT+IGFBP3). WT: дикий тип, STZ: мыши, которым вводили стрептозотоцин. Оценивали N=3 мышей на группу. H1-H3. Типичные изображения кишечных крипт на срезах, окрашенных H&E, мышей WT, мышей B6+STZ, у которых развилась диабетическая энтеропатия, и наивных мышей B6, которым вводили IGFBP3 (WT+IGFBP3). Гистология с 400-кратным увеличением. J. Гистограмма, на которой представлено количество Aldh⁺ клеток/мм² на иммунологически окрашенных срезах мышей B6, которым вводили STZ, у которых развилась диабетическая энтеропатия, мышей WT и наивных мышей B6, которым вводили IGFBP3 (WT+IGFBP3). K1-K3. Типичные изображения Aldh⁺ клеток на иммунологически окрашенных срезах нижних отделов желудочно-кишечного тракта, собранных из мышей B6, которым вводили STZ, у которых развилась диабетическая энтеропатия, мышей WT и наивных мышей B6, которым вводили IGFBP3 (WT+IGFBP3). Гистология с 400-кратным увеличением. L, N, P. На гистограммах представлено измерение MIB1⁺ и Aldh⁺ клеток и экспрессия EphB2⁺ (баллы интенсивности 0-5) в четырех группах индивидуумов (n=20 CTRL, n=30 SPK, n=K+T1D и n=60 T1D+ESRD). M1-M2, O1-O2, Q1-Q2. Типичные изображения MIB1⁺ и Aldh⁺ клеток и экспрессия EphB2⁺ в иммунологически окрашенных биоптатах слизистой оболочки прямой кишки T1D+ESRD, подвергнутых трансплантации только почки (K+T1D) или одновременной трансплантации поджелудочной железы и почки (SPK), через 8 лет последующего наблюдения. Гистология с 400-кратным увеличением на M1-M2 и O1-O2, 20-кратным увеличением на Q1-Q2. Масштабная линейка 80 мкм. Данные выражены как среднее \pm стандартная ошибка среднего (SEM), если не указано иначе. **p*<0,01; ***p*<0,001; ****p*<0,0001. Сокращения: WT, дикий тип; STZ, введение стрептозотоцина; B6, мыши C57BL/6J; IGF-I, инсулиноподобный фактор роста 1; IGFBP3,

связывающий белок инсулиноподобного фактора роста 3; IGF-IR, рецептор инсулиноподобного фактора роста 1; CoSC, стволовая клетка толстого кишечника; T1D, диабет типа 1; ESRD, терминальная стадия почечной недостаточности; CTRL, здоровые индивидуумы; SPK, одновременная трансплантация почки и поджелудочной железы; K+T1D, трансплантация только почки при диабете типа 1; H&E, гематоксилин и эозин; MIB1, антитело против Ki67; EphB2, рецептор эфрина B 2; Aldh, альдегиддегидрогеназа; SEM, стандартная ошибка среднего.

Фиг. 5. Лечение длительного T1D с использованием SPK восполняет CoSC и восстанавливает характерный профиль CoSC и развитие мини-кишечника посредством восстановления циркулирующих IGF-I и IGFBP3. А, В, С. На гистограммах изображены результаты проточного цитометрического анализа EphB2^{hi+}, EphB2^{hi+}LGR5⁺, EphB2^h-TERT⁺ клеток, полученных из выделенных крипт у индивидуумов с длительным T1D (исходный уровень), T1D+ESRD, подвергнутых трансплантации почки и поджелудочной железы (SPK) или только почки (K+T1D), через 8 лет последующего наблюдения. Оценивали N=10 индивидуумов на группу. D, E, F. На гистограммах изображена нормализованная экспрессия мРНК маркеров стволовых клеток кишечника EphB2, LGR5, h-TERT, измеряемых посредством количественной RT-ПЦР на выделенных кишечных криптах, полученных из индивидуумов с длительным T1D (исходный уровень), T1D+ESRD, подвергнутых трансплантации почки и поджелудочной железы (SPK) или только почки (K+T1D), через 8 лет последующего наблюдения. Все образцы анализировали в трех параллелях и нормализовали по экспрессии гена домашнего хозяйства ACTB с использованием способа $\Delta\Delta C_t$. Оценивали N=10 индивидуумов на группу. G. Изображен анализ вестерн-блоттинга экспрессии EphB2, LGR5, h-TERT в выделенных кишечных криптах из четырех групп через 8 лет последующего наблюдения. Оценивали N=5 индивидуумов на группу. H. На гистограмме изображен % развившихся мини-кишечников от общего количества через 8 дней культивирования свежесыведенных кишечных крипт, полученных из индивидуумов с длительным T1D (исходный уровень), индивидуумов с SPK и K+T1D через 8 лет последующего наблюдения. Оценивали N=10 индивидуумов на группу. I. На тепловой карте представлено транскриптомное профилирование характерных маркеров CoSC, исследуемых в свежесыведенных кишечных криптах CTRL, индивидуумов с длительным T1D (T1D+ESRD), индивидуумов SPK и K+T1D через 8 лет последующего наблюдения. Оценивали N=10 индивидуумов на группу. J. На гистограмме представлены уровни IGF-I, измеряемые посредством ELISA в сыворотке четырех групп индивидуумов через 8 лет последующего наблюдения. Оценивали N=10 индивидуумов на группу. K. На гистограмме изображены уровни IGFBP3, измеряемые посредством ELISA в сыворотке четырех групп индивидуумов. Оценивали N=20 индивидуумов на группу. L, M. Корреляция между уровнями IGFBP3 в сыворотке и кишечными симптомами, оцениваемыми с использованием опросника GSRS (0-7) у n=20 индивидуумов из групп K+T1D (L) и SPK (M). Анализ осуществляли с использованием ANOVA (p<0,05) при сравнении всех групп. Данные выражены как среднее \pm стандартная ошибка среднего (SEM), если не указано иначе. *p<0,01; **p<0,001; ***p<0,0001. Сокращения: CoSC, стволовая клетка толстого кишечника; T1D, диабет типа 1; ESRD, терминальная стадия почечной недостаточности; CTRL, здоровые индивидуумы; SP, одновременная трансплантация почки и поджелудочной железы; EphB2, рецептор эфрина B 2; LGR5, содержащий богатый лейцином повтор, сопряженный с G-белком рецептор 5; RT-ПЦР, полимеразная цепная реакция в реальном времени; ACTB, β -актин; +T1D, трансплантация только почки при диабете типа 1; IGF-I, инсулиноподобный фактор роста 1; IGFBP3, связывающий белок инсулиноподобного фактора роста 3; SEM, стандартная ошибка среднего.

Фиг. 6. Лечение с использованием недавно полученного рекомбинантного белка ecto-TMEM219 (ecto-TMEM219) устраняет IGFBP3-опосредованную деструкцию мини-кишечников и позволяет сохранять CoSC в доклинической модели. А. Гистограмма с группированием % развившихся мини-кишечников от общего количества, полученных из здоровых индивидуумов в различных условиях, где представлен эффект ecto-TMEM219 при различных концентрациях (молярное соотношение 1:2, 1:1 и 2:1 по сравнению с IGFBP3) в мини-кишечниках, обработанных IGFBP3, и мини-кишечниках, подвергнутых воздействию высокой концентрации глюкозы. Представлены значения р относительно исходных условий. В. На гистограмме представлена нормализованная экспрессия мРНК EphB2 в криптах, выделенных из здоровых индивидуумов, культивируемых в присутствии IGFBP3 и ecto-TMEM219+IGFBP3, в трех параллелях. С. D. На гистограмме представлена нормализованная экспрессия мРНК каспазы 8 и 9 в криптах, выделенных из здоровых индивидуумов, культивируемых в присутствии IGFBP3 и ecto-TMEM219+IGFBP3, в трех параллелях. E, F, G. Линейные графики, на которых представлены количество крипт (E), глубина крипт (F) и ширина крипт (G), оцениваемых на срезах нижних отделов желудочно-кишечного тракта, собранных в начале и через 8 недель из мышей B6, которым вводили STZ, у которых развилась диабетическая энтеропатия (B6+STZ), наивных мышей B6 (WT) и мышей STZ-B6, которым вводили ecto-TMEM219. WT: дикий тип, STZ: введение стрептозотоцина. Оценивали N=3 мышей на группу. H. Линейный график, на котором представлена масса мышей B6, которым вводили STZ, у которых развилась диабетическая энтеропатия (B6+STZ), наивных мышей B6 (WT) и мышей B6, которым вводили STZ, у которых развилась диабетическая энтеропатия, которым вводили ecto-TMEM219, в начале и через 8 недель. WT: дикий тип, STZ: введение стрептозотоцина. Оценивали N=3 мышей на группу. I. Гистограмма,

на которой представлены результаты проточного цитометрического анализа EphB2⁺ клеток, выделенных из образцов кишечника, собранных из наивных мышей B6, мышей B6, которым вводили STZ, и мышей STZ-B6, которым вводили есто-ТМЕМ219, через 8 недель. J. Типичные диаграммы EphB2⁺ клеток, выделенных из крипт, выделенных из наивных мышей B6, мышей B6, которым вводили STZ, и мышей STZ-B6, которым вводили есто-ТМЕМ219, через 8 недель. Оценивали N=3-5 мышей на группу. K. Гистограмма, на которой представлена нормализованная экспрессия мРНК EphB2 в образцах кишечника, собранных из наивных мышей B6, мышей B6, которым вводили STZ, и мышей STZ-B6, которым вводили есто-ТМЕМ219, через 8 недель. L, M. Гистограмма, на которой представлена нормализованная экспрессия мРНК каспазы 8 (K) и каспазы 9 (L) в образцах кишечника, собранных из наивных мышей B6, мышей B6, которым вводили STZ, и мышей STZ-B6, которым вводили есто-ТМЕМ219, через 8 недель. N. Гистограмма, на которой представлены уровни циркулирующего IGFBP3, измеряемые у наивных мышей B6 (WT) и мышей B6, которым вводили STZ (B6+STZ), и у мышей B6+STZ, которым вводили есто-ТМЕМ219, через 8 недель. Данные выражены как среднее \pm стандартная ошибка среднего (SEM), если не указано иначе. *p<0,01; **p<0,001; ***p<0,0001. Сокращения: WT, дикий тип; STZ, введение стрептозоцина; B6, мыши C57BL/6J; IGF-I, инсулиноподобный фактор роста 1; IGFBP3, связывающий белок инсулиноподобного фактора роста 3; CoSC, стволовая клетка толстого кишечника; H&E, гематоксилин и эозин; EphB2, рецептор эфрина B 2; SEM, стандартная ошибка среднего, T1D, диабет типа 1; ESRD, терминальная стадия почечной недостаточности; CTRL, здоровые индивидуумы; RT-ПЦР, полимеразная цепная реакция в реальном времени; ACTB, β -актин.

Фиг. 7. Оценка уровней IGFBP3 в сыворотке (A) и моче (B) индивидуумов CTRL, T1D и T1D+ESRD. (C). Корреляция между уровнями IGFBP3 в сыворотке и моче у всех индивидуумов когорты, оцениваемой в этом исследовании. (D-E). Корреляция между уровнями IGFBP3 в сыворотке и eGFR, вычисленной с помощью формулы MDRD, у индивидуумов с T1D+ESRD с диализом (D) и с T1D с eGFR>15 мл/мин/м² (E). (F). Корреляция между уровнями IGFBP3 в сыворотке и моче у всех индивидуумов когорты, оцениваемой в этом исследовании. Серой областью указан нормальный диапазон уровней IGFBP3 в моче и сыворотке.

Фиг. 8. Профиль CoSC, получение мини-кишечников *in vitro*, экспрессия IGFBP3 в печени и IGF-IR на CoSC у индивидуумов с длительным T1D и здоровых индивидуумов. A-B. Типичные точечные диаграммы стратегии гейтирования PI клеток у здоровых индивидуумов (CTRL) и индивидуумов с длительным T1D (T1D+ESRD). C. На гистограммах изображены результаты проточного цитометрического анализа PI клеток в свежевыделенных криптах (n=10 CTRL и n=10 T1D+ESRD). D-E. Типичные точечные диаграммы EphB2^{hi}LGR5⁺ (D) и EphB2^h-TERT⁺ клеток у здоровых индивидуумов (CTRL) и индивидуумов с длительным T1D (T1D+ESRD). F. При анализе вестерн-блоттинга (обрезанные блоты) подтверждали низкую экспрессию EphB2, LGR5, h-TERT в выделенных *in vitro* кишечных криптах индивидуумов с длительным T1D (T1D+ESRD). Полноразмерные блоты представлены на фиг. 5. Оценивали N=5 индивидуумов на группу. G. Диаграмма рассеяния, на которой представлено профилирование транскриптома стволовых клеток, исследуемое в свежевыделенных кишечных криптах здоровых индивидуумов (CTRL) и индивидуумов с длительным T1D (T1D+ESRD). В таблице приведены анализируемые гены и пути (табл. S1). Оценивали N=10 индивидуумов на группу. H-I. Типичные изображения свежевыделенных крипт, полученных из здоровых индивидуумов и индивидуумов с длительным T1D, окрашенных с использованием DAPI. 20-кратное увеличение. J. Гистограмма, на которой представлен процент мини-кишечников, определяющих эффективность культивируемых крипт, полученных из здоровых индивидуумов и индивидуумов с длительным T1D, через 12 ч. Оценивали N=10 индивидуумов на группу. K. Гистограмма, на которой представлены вычисленные комбинированные баллы интенсивности/диффузии IGFBP3 (0-6) после иммуногистохимической оценки в образцах печени, полученных из здоровых индивидуумов и индивидуумов с длительным T1D. Оценивали N=3 индивидуумов на группу. L1-L6. Типичные изображения (63-кратное увеличение) экспрессии IGFBP3 в печени. С помощью иммунофлуоресцентного анализа подтверждали колокализацию Herp Par-1⁺ клеток и экспрессии IGFBP3 (L1-L3), в то время как не наблюдали колокализацию между IGFBP3 и CD163⁺ клетками (L4-L6). M. На гистограмме изображена нормализованная экспрессия мРНК рецептора IGF-I (IGF-IR), измеряемая посредством количественной RT-ПЦР на выделенных кишечных криптах. Все образцы анализировали в трех параллелях и нормализовали по гену домашнего хозяйства ACTB с использованием способа $\Delta\Delta Ct$. N1-N2. Типичные изображения IGF-IR⁺ клеток на образцах слизистой оболочки прямой кишки, полученных из индивидуумов CTRL и T1D+ESRD. Черной стрелкой показаны положительные клетки на основании крипты. 200-кратное увеличение. O1-O2. Типичные изображения гибридизации ТМЕМ219 *in situ*, осуществляемой на биоптатах слизистой оболочки прямой кишки, полученных из индивидуумов CTRL и T1D+ESRD. 400-кратное увеличение. Данные выражены как среднее \pm стандартная ошибка среднего (SEM), если не указано иначе. *p<0,01. Сокращения: PI, йодид пропидия; IGF-I, инсулиноподобный фактор роста 1; IGFBP3, связывающий белок инсулиноподобного фактора роста 3; IGF-IR, рецептор инсулиноподобного фактора роста 1; CoSC, стволовая клетка толстого кишечника; T1D, диабет типа 1; ESRD, терминальная стадия почечной недостаточности; CTRL, здоровые индивидуумы; EphB2, рецептор эфрина B 2; LGR5,

рецептор 5, содержащий богатый лейцином повтор, сопряженный с G-белком; RT-ПЦР, полимеразная цепная реакция в реальном времени; АСТВ, β -актин; SEM, стандартная ошибка среднего.

Фиг. 9. Экспрессия каспаз в культивируемых с IGF-I/IGFBP3 мини-кишечниках и отсутствие эффекта других циркулирующих факторов подтверждали основной проапоптотический эффект IGFBP3 в отношении развития мини-кишечников. А. Гистограмма, на которой представлена нормализованная экспрессия мРНК каспазы 8 в криптах, выделенных из индивидуумов с T1D+ESRD, культивируемых в присутствии IGFBP3, IGF-I+IGFBP3 и IGF-I в трех параллелях. В. Гистограмма, на которой представлена нормализованная экспрессия мРНК каспазы 9 в криптах, выделенных из индивидуумов с T1D+ESRD, культивируемых в присутствии IGFBP3, IGF-I+IGFBP3 и IGF-I в трех параллелях. С, D. Гистограмма с группированием % мини-кишечников, развившихся у здоровых индивидуумов (С) и индивидуумов с длительным T1D (D), культивируемых в присутствии среды с FBS и среды с сывороткой, полученной из здоровых индивидуумов, "сывороткой CTRL". Анализ проводили в трех параллелях. Е. Гистограмма с группированием % развившихся мини-кишечников от общего количества, полученных из здоровых индивидуумов, культивируемых в течение 8 дней, подвергнутых направленному воздействию на TMEM219 с использованием миРНК и антитела против IGF-IR и, в конечном итоге, сравниваемых с TMEM219-экспрессирующими криптами в среде в отдельности и среде+высокая глюкоза+сыворотка при длительном T1D. Анализ осуществляли в трех параллелях. F, G. Гистограмма с группированием % развившихся мини-кишечников через 8 дней культивирования, полученных из здоровых индивидуумов (F) и индивидуумов с длительным T1D (G), культивируемых в присутствии среды в отдельности и различных молекул, идентифицированных посредством протеомного анализа (табл. S7). Анализ осуществляли в трех параллелях. H. Гистограмма с группированием % мини-кишечников, полученных из здоровых индивидуумов и культивируемых в присутствии среды в отдельности, среды+высокая глюкоза, среды+высокая глюкоза и сыворотки при длительном T1D, IGF-I, IGFBP3 с/без инсулина. Анализ осуществляли в трех параллелях. Данные выражены как среднее \pm стандартная ошибка среднего (SEM), если не указано иначе. * $p < 0,01$; ** $p < 0,001$. Сокращения: IGF-I, инсулиноподобный фактор роста 1; IGFBP3, связывающий белок инсулиноподобного фактора роста 3; IGF-IR, рецептор инсулиноподобного фактора роста 1; CoSC, стволовая клетка толстого кишечника; T1D, диабет типа 1; ESRD, терминальная стадия почечной недостаточности; CTRL, здоровые индивидуумы; RT-ПЦР, полимеразная цепная реакция в реальном времени; АСТВ, β -актин; SEM, стандартная ошибка среднего; миРНК, малая интерферирующая РНК; ALDOA, фруктозобисфосфат-альдолаза А; РНКазы, панкреатическая рибонуклеаза; MASP, сериновая протеаза 1 маннозосвязывающего лектина.

Фиг. 10. Эффект пары IGF-I/IGFBP3 в отношении полученных из отдельных клеток мини-кишечников, транскриптомного профиля стволовых клеток и апоптотических путей. А1-А3. Типичные изображения полученных из отдельных клеток мини-кишечников, культивируемых в течение 8 дней *in vitro*, полученных из выделенных ранее сортированных по EphB2⁺ клеток здоровых индивидуумов и культивируемых со средой в отдельности, средой+IGFBP3, средой+35 мМ глюкозы+сывороткой при длительном T1D. Изображения представлены с 10-кратным увеличением. Масштабная линейка 50 мкм. В, С, D. Гистограмма, на которой представлена нормализованная экспрессия мРНК каспазы 8, каспазы 9 и Ki67 в полученных из отдельных клеток мини-кишечниках, выращенных из сортированных посредством проточной цитометрии EphB2⁺ клеток, выделенных из здоровых индивидуумов и культивируемых в различных условиях. Анализ осуществляли в трех параллелях. Е, F. Диаграмма рассеяния, на которой представлено профилирование транскриптома стволовых клеток, исследуемое в свежывыделенных кишечных криптах здоровых индивидуумов (CTRL) и индивидуумов с длительным T1D (T1D+ESRD), культивируемых с/без IGFBP3 и IGF-I. Анализы осуществляли в трех параллелях. G, H. Диаграмма рассеяния, на которой представлено профилирование апоптотического транскриптома, исследуемое в свежывыделенных кишечных криптах здоровых индивидуумов (CTRL) и индивидуумов с длительным T1D (T1D+ESRD), культивируемых с/без IGF-I. В таблице представлены анализируемые гены и пути (табл. S3). Анализы осуществляли в трех параллелях. I, J. Гистограмма с группированием % мини-кишечников, развившихся из крипт, полученных из здоровых индивидуумов (I) и индивидуумов с длительным T1D (J), а затем культивируемых в присутствии среды в отдельности, Fas-лиганда (FasL), пероксида водорода (H₂O₂) и фактора некроза опухоли (ФНО). Анализ осуществляли в трех параллелях. Данные выражены как среднее \pm стандартная ошибка среднего (SEM), если не указано иначе. * $p < 0,01$; ** $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$. Сокращения: IGF-I, инсулиноподобный фактор роста 1; IGFBP3, связывающий белок инсулиноподобного фактора роста 3; CoSC, стволовая клетка толстого кишечника; T1D, диабет типа 1; ESRD, терминальная стадия почечной недостаточности; CTRL, здоровые индивидуумы; RT-ПЦР, полимеразная цепная реакция в реальном времени; АСТВ, β -актин; SEM, стандартная ошибка среднего; FasL, Fas-лиганд; H₂O₂, пероксид водорода; ФНО, фактор некроза опухоли.

Фиг. 11. Манипуляции с парой IGF-I/IGFBP3 в доклинических моделях диабетической энтеропатии. А. Гистограмма, на которой представлены уровни циркулирующего IGFBP3, измеряемые у наивных мышей В6 (WT) и мышей В6, которым вводили STZ (B6+STZ). В. Гистограмма, на которой представлены уровни циркулирующего IGF-I, измеряемые у наивных мышей В6 (WT) и мышей В6, которым вводи-

ли STZ (B6+STZ). С. Гистограмма, на которой представлены уровни инсулина в сыворотке, измеряемые у наивных мышей B6 (WT) и мышей B6, которым вводили STZ (B6+STZ). D, E, F. Линейные графики, на которых представлены количество крипт (D), глубина крипт (E) и ширина крипт (F), оцениваемые на срезах нижних отделов желудочно-кишечного тракта, собранных в начале и через 8 недель у мышей B6, которым вводили STZ, у которых развилась диабетическая энтеропатия (B6+STZ), наивных мышей B6 (WT) и мышей STZ-B6, которым вводили IGFBP3 (B6+STZ+IGFBP3) или IGF-I (B6+STZ + IGF-I). WT: дикий тип, STZ: введение стрептозотоцина. Оценивали N=3 мышей на группу. G. Гистограмма, на которой представлено количество Aldh⁺ клеток/мм² на иммунологически окрашенных срезах мышей B6, которым вводили STZ, у которых развилась диабетическая энтеропатия, мышей WT и мышей STZ-B6, которым вводили IGFBP3 (B6+STZ+IGFBP3) или IGF-I (B6+STZ+IGF-I). H1-H2: Типичные изображения кишечных крипт на срезах, окрашенных H&E, мышей STZ-B6, которым вводили IGFBP3 (B6+STZ+IGFBP3), (H1) или IGF-I (B6+STZ+IGF-I), (H2). Гистология с 400-кратным увеличением. I. Линейный график, на котором представлена масса мышей B6, которым вводили STZ, у которых развилась диабетическая энтеропатия (B6+STZ), наивных B6 (WT), мышей B6, которым вводили STZ, у которых развилась диабетическая энтеропатия, которым вводили IGFBP3 (B6+STZ + IGFBP3). WT: дикий тип, STZ: введение стрептозотоцина. Оценивали N=3 мышей на группу. J. Гистограмма, на которой представлены результаты проточного цитометрического анализа EphB2⁺ клеток в образцах кишечника, собранных из наивных мышей B6, мышей B6, которым вводили STZ, и мышей STZ-B6, которым вводили IGFBP3 (B6+STZ+IGFBP3). K, L. Гистограмма, на которой представлена нормализованная экспрессия мРНК EphB2 (K) и LGR5 (L) в образцах кишечника, собранных из наивных мышей B6, мышей B6, которым вводили STZ, и мышей STZ-B6, которым вводили IGFBP3 (B6+STZ+IGFBP3). M, N. Гистограмма, на которой представлена нормализованная экспрессия мРНК каспазы 8 (M) и каспазы 9 (N) в образцах кишечника, собранных из наивных мышей B6, мышей B6, которым вводили STZ, и мышей STZ-B6, которым вводили IGFBP3 (B6+STZ+IGFBP3). Данные выражены как среднее ± стандартная ошибка среднего (SEM), если не указано иначе. *p<0,01; **p<0,001; ***p<0,0001. Сокращения: WT, дикий тип; STZ, введение стрептозотоцина; B6, мыши C57BL/6J; IGF-I, инсулиноподобный фактор роста 1; IGFBP3, связывающий белок инсулиноподобного фактора роста 3; CoSC, стволовая клетка толстого кишечника; H&E, гематоксилин и эозин; EphB2, рецептор эфрина B 2; Aldh, альдегиддегидрогеназа; SEM, стандартная ошибка среднего.

Фиг. 12. Лечение длительного T1D с использованием SPK улучшает диабетическую энтеропатию. A, B, C. На гистограммах изображена балльная оценка боли в области живота, диареи и запора в соответствии с опросником GSRS у здоровых индивидуумов (CTRL), индивидуумов с длительным T1D (исходный уровень), T1D+ESRD, подвергнутых трансплантации почки и поджелудочной железы (SPK) или только почки (K+T1D). Серой областью указан нормальный диапазон для всех параметров. Статистические параметры выражают как среднее ± SEM. D1-D2, E1-E2, G1-G2, J1-J2. Типичные изображения окрашивания гематоксилином и эозином (H&E) и ультраструктурный анализ нейронных структур, шванновских клеток и 5HT⁺ клеток, осуществленный на биоптатах слизистой оболочки прямой кишки, полученных из T1D+ESRD, подвергнутых трансплантации почки и поджелудочной железы (SPK) или только почки (K+T1D), через 8 лет последующего наблюдения, 400-кратное увеличение. F, H, I, K. На гистограммах представлены измерения нейроэндокринных везикул (% случаев с >3 NE везикул на нервное окончание), % шванновских клеток с пикнотическими ядрами и нарушениями цитоплазмы (% положительных случаев) при использовании электронной микроскопии, 5HT⁺ клетки, анализируемые с использованием биоптатов, полученных из слизистой оболочки прямой кишки CTRL, индивидуумов с длительным T1D (исходный уровень), T1D+ESRD, подвергнутых трансплантации почки и поджелудочной железы (SPK) или только почки (K+T1D), в течение 8-летнего периода последующего наблюдения. Статистические параметры выражают как среднее ± SEM. Оценивали индивидуумов N=20 CTRL, n=30 SPK, n=30 K+T1D и n=60 T1D+ESRD. Статистические параметры выражают как среднее ± SEM. Все исследуемые параметры статистически значимо отличались при сравнении различных групп следующим образом: *p<0,01; **p<0,001; ***p<0,0001. Оценивали N=10 индивидуумов на группу. Сокращения: GSRS, Шкала рейтинга желудочно-кишечных симптомов; SPK, одновременная трансплантация почки и поджелудочной железы; K+T1D, трансплантация только почки при диабете типа 1; CTRL, здоровые индивидуумы; T1D, диабет типа 1; ESRD, терминальная стадия почечной недостаточности; 5HT, серотонин; H&E, гематоксилин и эозин; NGF, фактор роста нервов; SEM, стандартная ошибка среднего; NE, нейроэндокринные везикулы.

Фиг. 13. Анализ стволовых клеток толстого кишечника, IGF-IR и протеомный профиль циркулирующих факторов при диабетической энтеропатии при группах SPK и K+T1D. A1-A6. Типичные изображения мини-кишечников, культивируемых в течение 8 дней *in vitro*, полученных из ранее выделенных крипт индивидуумов с длительным T1D, T1D+ESRD, подвергнутых трансплантации почки и поджелудочной железы (SPK) или трансплантации только почки (K+T1D), через 8 лет последующего наблюдения. Изображения представлены с 5- и 10-кратным увеличением. Масштабная линейка 10 мкм. B. Диаграмма рассеяния, на которой представлено профилирование транскриптома стволовых клеток, исследуемых

дуемое в свежeweыделенных кишечных криптах индивидуумов SPK. Оценивали N=3 индивидуумов. С. На гистограммах изображены относительные уровни экспрессии рецептора IGF-I (IGF-IR) на выделенных криптах здоровых индивидуумов (CTRL), индивидуумов с длительным T1D (T1D+ESRD), SPK и K+T1D, измеряемых посредством количественной RT-ПЦР. Все образцы анализировали в трех параллелях и нормализовали по относительному уровню экспрессии АСТВ с использованием способа $\Delta\Delta Ct$. Результаты выражены как среднее \pm SEM. D. На тепловой карте представлен протеомный профиль при длительном T1D по сравнению с индивидуумами CTRL и SPK через 8 лет последующего наблюдения. Полный набор данных об идентифицированных и количественно проанализированных белках подвергали статистическому анализу ($p < 0,05$). Значимо дифференциально экспрессирующиеся белки дополнительно анализировали посредством иерархической кластеризации. Статистические параметры выражают как среднее \pm SEM. Оценивали сыворотки N=10 индивидуумов на группу. Все исследуемые параметры статистически значимо отличались при сравнении различных групп следующим образом: * $p < 0,01$. Сокращения: T1D, диабет типа 1; ESRD, терминальная стадия почечной недостаточности; CTRL, здоровые индивидуумы; SPK, одновременная трансплантация почки и поджелудочной железы; K+T1D, трансплантация почки в отдельности при диабете типа 1; RT-ПЦР, полимеразная цепная реакция в реальном времени; АСТВ, β -актин; IGF-I, инсулиноподобный фактор роста 1; IGFBP3, связывающий белок инсулиноподобного фактора роста 3; IGF-IR, инсулиноподобный фактор роста 1 рецептор; SEM, стандартная ошибка среднего.

Фиг. 14. Корреляция кишечных симптомов с уровнями инсулина, HbA1C и глюкозы в крови в группах SPK и K+T1D. А, В. Корреляцию между уровнями инсулина в сыворотке и кишечными симптомами оценивали с использованием опросника GSRS и учета пункта с наибольшими баллами (0-7) у n=20 индивидуумов в группе K+T1D (А) и SPK (В). Анализ осуществляли с использованием ANOVA ($p < 0,05$) при сравнении всех групп. С. Уровни инсулина в сыворотке, измеряемые способом определения свободного инсулина у n=20 индивидуумов в группе K+T1D (А) и SPK (В). Данные выражены как среднее + стандартная ошибка среднего (SEM). D, E. Корреляцию между уровнями гликированного гемоглобина (HbA1C) в сыворотке и кишечными симптомами оценивали с использованием опросника GSRS (0-7) у n=20 индивидуумов в группе K+T1D (А) и SPK (В). Анализ осуществляли с использованием ANOVA ($p < 0,05$) при сравнении всех групп. F, G. Корреляцию между уровнями глюкозы в крови (гликемией) и кишечными симптомами оценивали с использованием опросника GSRS (0-7) у индивидуумов n=20 в группе K+T1D (А) и SPK (В). Анализ осуществляли с использованием ANOVA ($p < 0,05$) при сравнении всех групп. Сокращения: T1D, диабет типа 1; ESRD, терминальная стадия почечной недостаточности; CTRL, здоровые индивидуумы; SPK, одновременная трансплантация почки и поджелудочной железы; K+T1D, трансплантация только почки при диабете типа 1; IGF-I, инсулиноподобный фактор роста 1; IGFBP3, связывающий белок инсулиноподобного фактора роста 3.

Фиг. 15. Экспрессия маркеров линий клеток в мини-кишечниках, подвергнутых воздействию различных условий культивирования. А1-А4, В1-В4, С1-С4, D1-D4, E1-E4. Типичные изображения (10-кратное увеличение) экспрессии цитокератина 20 (KRT20), виментина, синаптофизина и альдегиддегидрогеназы (ALDH) в мини-кишечниках, полученных из крипт, выделенных из здоровых индивидуумов, CTRL (А1-А4) и индивидуумов T1D+ESRD (В1-В4), культивируемых с IGFBP3 (С1-С4), 35 мМ глюкозы (D1-D4), и 35 мМ глюкозы+сыворотка при длительном T1D (сыворотка T1D+ESRD)+IGF-I (E1-E4). С помощью иммунофлуоресцентного анализа подтверждали, что экспрессия всех маркеров линий снижена в мини-кишечниках, полученных из индивидуумов T1D+ESRD, по сравнению с CTRL (А1-А4, В1-В4), при этом ALDH является наименее экспрессируемым маркером (В4). Сниженную экспрессию ALDH также определяли в обработанных IGFBP3 мини-кишечниках (С4), в то время как мини-кишечники, подвергнутые воздействию высокой концентрации глюкозы и сыворотки при длительном T1D и обработанные IGF-I, демонстрировали очевидное восстановление экспрессии ALDH. F. Гистограмма, на которой представлена экспрессия TMEM219, KRT20, молекулы адгезии эпителиальных клеток (Epcam) и хромогранина А (CHGA) на нестволовых клетках (EphB2⁺ клетках), измеряемая посредством количественной RT-ПЦР. Все образцы анализировали в трех параллелях и нормализовали по относительному уровню экспрессии АСТВ с использованием способа $\Delta\Delta Ct$. Результаты выражены как среднее \pm SEM. Сокращения: T1D, диабет типа 1; ESRD, терминальная стадия почечной недостаточности; CTRL, здоровые индивидуумы; IGF-I, инсулиноподобный фактор роста 1; IGFBP3, связывающий белок инсулиноподобного фактора роста 3; IF, иммунофлуоресценция; KRT20, цитокератин 20, ALDH, альдегиддегидрогеназа, Epcam, молекула адгезии эпителиальных клеток; CHGA, хромогранин А; RT-ПЦР, полимеразная цепная реакция в реальном времени; АСТВ, β -актин.

Фиг. 16. Стратегия селекции для тестирования белков-кандидатов в анализе мини-кишечников *in vitro*. Схема, на которой представлена стратегия, используемая для селекции белков-кандидатов на основе протеомного профиля, тестируемого в анализе мини-кишечников *in vitro*.

Фиг. 17. Анализ развившихся мини-кишечников с использованием количественных критериев доменов крипты. А-Р. Гистограммы с группированием % развившихся мини-кишечников по меньшей мере с 1 доменом крипты, детектируемым в различных условиях, уже представленных на всем протяжении

описания.

Фиг. 18. Уровни периферического IGFBP3 повышены у индивидуумов с воспалительным заболеванием кишечника по сравнению со здоровыми индивидуумами.

Фиг. 19. Уровни периферического IGFBP3 повышены при преддиабетических и диабетических состояниях у людей с T1D (A) и T2D (B). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Сокращения: IGFBP3, связывающий белок инсулиноподобного фактора роста 3; CTRL, здоровые индивидуумы; T1D, диабет типа 1; T2D, диабет типа 2; положительный по аутоантителам: индивидуумы без диабета с риском развития T1D, положительные по антителам против пептидов островков; IGT: нарушенная толерантность к глюкозе, измеряемая при OGTT (пероральный тест толерантности к глюкозе) в условиях натощак и не натощак. NGT: нормальная толерантность к глюкозе, измеряемая при OGTT. IFG: нарушенная толерантность к глюкозе натощак, измеряемая при OGTT, и положительный результат только в условиях натощак.

Фиг. 20. Уровни периферического IGFBP3 повышаются при преддиабетических и диабетических состояниях в моделях T1D (A) и T2D (B) на мышах. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Сокращения: C57BL/6/J, мыши B6; B6, наивные мыши; NOD, мыши с диабетом без ожирения; HFD, рацион с высоким содержанием жира, IGFBP3, связывающий белок инсулиноподобного фактора роста 3.

Фиг. 21. Продукция IGFBP3 в первичных гепатоцитах человека при воздействии глюкозы (11 мМ, 20 мМ, 35 мМ) (A) и воспалении (1000 Ед./мл ИФН γ и 2 нг/мл ИЛ-1 β) (B). * $p < 0,05$, * $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Сокращения: ИФН, воспаление (ИФН γ +ИЛ-1 β); мМ, миллимолярный; IGFBP3, связывающий белок инсулиноподобного фактора роста 3.

Фиг. 22. TMEM219 экспрессируется на островках человека (A-C). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Сокращения: β -АСТ, β -актин.

Фиг. 23. TMEM219 экспрессируется на островках мыши (A) и на линии β -клеток мыши (B-D). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Сокращения: β -ТС, линия β -клеток мыши; β -АСТ, β -актин.

Фиг. 24. IGFBP3 (50 нг/мл) повышает апоптоз и экспрессию каспазы 8 (A-B) и снижает высвобождение и экспрессию инсулина (C, D1-D2, E) в большей степени по сравнению с провоспалительными стимулами (ИФН γ +ИЛ-1 β) в линии β -клеток мыши *in vitro*. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Сокращения: ИФН γ , интерферон гамма; ИЛ-1 β , интерлейкин β ; IGFBP3, связывающий белок инсулиноподобного фактора роста 3; β -ТС, линия β -клеток мыши.

Фиг. 25. IGFBP3 (50 нг/мл) повышает апоптоз (A) и экспрессию каспазы 8 в островках мыши (B) со снижением инсулина (C) *in vitro*. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Фиг. 26. IGFBP3 (50 нг/мл) повышает апоптоз и экспрессию каспазы 8 в островках человека (A-B и C1-C2) и снижает экспрессию инсулина (D1-D2, E) *in vitro*. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Сокращения: P_i, йодид пропидия; M30, моноклональное антитело M30, распознающее расщепленный каспазой цитокератин 18; INS, инсулин, IGFBP3, связывающий белок инсулиноподобного фактора роста 3.

Фиг. 27. Инъекция IGFBP3 (150 мкг/день в течение 15 дней) у мышей C57BL/6 изменяет морфологию островков *in vivo* через 8 недель диабета (A1-A6). Сокращения: STZ, стрептозотцин; B6, наивные мыши C57BL/6/J.

Фиг. 28. Ecto-TMEM219 (130 нг/мл) предотвращает IGFBP3-ассоциированные апоптотические эффекты в отношении линии β -клеток мыши (A-B, C1-C3). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Сокращения: β -ТС, линия β -клеток мыши; INS, инсулин, IGFBP3, связывающий белок инсулиноподобного фактора роста 3.

Фиг. 29. Введение ecto-TMEM219 (130 нг/мл) почти нормализует экспрессию каспазы 8 и инсулина в островках мыши *in vitro*. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Сокращения: IGFBP3, связывающий белок инсулиноподобного фактора роста 3.

Фиг. 30. Ecto-TMEM219 (130 нг/мл) предотвращает IGFBP3-ассоциированные апоптотические эффекты в отношении островков человека (A-B, C1-C3). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Сокращения: M30, моноклональное антитело M30, распознающее расщепленный каспазой цитокератин 18; INS, инсулин; IGFBP3, связывающий белок инсулиноподобного фактора роста 3.

Фиг. 31. Введение ecto-TMEM219 (130 нг/мл) мышам с диабетом восстанавливает уровни инсулина в сыворотке (A, C) и глюкозы в крови (B). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Фиг. 32. Рабочая гипотеза. Сокращения: IGFBP3, связывающий белок инсулиноподобного фактора роста 3; IGF-I, инсулиноподобный фактор роста 1; IGF-IR, инсулиноподобный фактор роста 1 рецептор.

Подробное описание изобретения

Пример 1.

Материалы и способы.

В исследование включали 60 индивидуумов с длительным T1D (T1D+ESRD), зарегистрированных в листе ожидания для одновременной трансплантации поджелудочной железы и почки (СПК), и сравнивали их с 20 здоровыми индивидуумами, совпадающими по возрасту и полу (CTRL). По результатам оценки желудочно-кишечных симптомов, моторики кишечника и патологии слизистой оболочки кишечника определяли DE. CoSC идентифицировали в очищенных криптах толстого кишечника с учетом экспрессии CoSC-специфичных маркеров (проточная цитометрия, RT-ПЦР, вестерн-блоттинг, профилирование

транскриптома). Свойства самоподдержания CoSC анализировали посредством оценки % развившихся *in vitro* мини-кишечников и характеристики экспрессии маркеров линий клеток в различных условиях (фиг. 15). Обширный протеомный анализ сыворотки использовали для детекции циркулирующих факторов, которые могут регулировать CoSC, а затем факторы-кандидаты тестировали в анализе мини-кишечников *in vitro* (фиг. 16). Подробное описание способов и статистического анализа представлено ниже. Исследование одобрено экспертным советом Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico Ospedale San Raffaele, Milano, Italy (Entaropathy-PancreasKidneyTransplantation/01 Secchi/Fiorina).

Пациенты и дизайн исследования.

В исследование включали 60 индивидуумов с T1D+ESRD, зарегистрированных в листе ожидания для одновременной трансплантации поджелудочной железы и почки (SPK), совпадающих по возрасту (возраст 41-43 лет), полу и длительности T1D ($29,4 \pm 1,8$ лет). Также исследовали 20 здоровых индивидуумов, совпадающих по возрасту и полу (CTRL), с нормальной функцией почек и нормальными глико-метаболическими параметрами. Всех индивидуумов T1D+ESRD подвергали интенсивному лечению инсулином на момент включения в исследование, в то время как группе CTRL не вводили какое-либо терапевтическое средство. Всем индивидуумам T1D+ESRD проводили одинаковое лечение в виде терапии антиагрегантами (ASA) и антигипертензивными средствами (ингибиторами ангиотензинпревращающего фермента), в то же время 40 из 60 вводили статины на момент включения в исследование. Не включали индивидуумов с четкими признаками воспалительных заболеваний кишечника, а также целиакии.

Индивидуумов T1D+ESRD наблюдали в течение до 8 лет (средний период последующего наблюдения: $8,6 \pm 1,1$ лет) после проведения трансплантации SPK ($n=30$) или K+T1D ($n=30$) в соответствии с макроскопической хирургической оценкой на момент трансплантации. Не включали индивидуумов, которым вводили пероральные антикоагулянты. Все из индивидуумов SPK являлись инсулиннезависимыми в течение всего периода последующего наблюдения, в то время как индивидуумам K+T1D проводили интенсивную подкожную терапию инсулином. От всех индивидуумов получали информированное согласие перед включением в исследование. Исследования, не включенные в рутинное клиническое последующее наблюдение, разрешены с соответствующим одобрением экспертного совета (Enteropatia-trapianto/01 Secchi/Fiorina).

Трансплантация и иммуносупрессия.

Органы для трансплантации получали от умерших доноров с помощью трансплантологического консорциума "North Italia Transplant" (NITp, Milan). После индукции с помощью ATG (тимоглобулин, IMTiX, SANGSTAT) иммуносупрессию поддерживали с использованием циклоспорина (на уровне 100-250 нг/мл) или FK506 (на уровне 10-15 нг/мл), микофенолата мофетила (500-2000 мг/день) и метилпреднизолона (10 мг/день). Стероиды отменяли в течение 3-6 месяцев после трансплантации. Всем пациентам, включенным в группы T1D+ESRD и SPK, проводили терапию антиагрегантами (80% ASA и 20% тиклопидина) для предотвращения тромбоза трансплантата или фистулы. Метаболический статус, функцию почек и артериальное давление исследовали при включении в исследование и после трансплантации каждые 2 года. Расчетный уровень клубочковой фильтрации (eGFR) вычисляли с использованием формулы модификации питания при заболевании почек (MDRD) (Levey et al., 1999).

Шкала рейтинга желудочно-кишечных симптомов (GSRS).

Желудочно-кишечные симптомы оценивали с использованием опросника GSRS у здоровых индивидуумов, у индивидуумов с длительным T1D (T1D+ESRD) и в группах SPK и K+T1D через 2, 4 и 8 лет после трансплантации. Шкала рейтинга желудочно-кишечных симптомов (GSRS) представляет собой опросник, состоящий из 15 пунктов с семиступенчатой шкалой Лайкерта, определяемой описательным анкорным текстом (Svedlund et al., 1988). Опросник исходно создавали как рейтинговую шкалу на основе интервью, созданную для оценки широкого диапазона желудочно-кишечных симптомов, а позднее модифицировали как самостоятельно заполняемый опросник. Чем выше баллы, тем тяжелее симптомы: диапазон шкалы составляет от минимального значения 1 до максимального значения 7. Если участие индивидуума в исследовании прекращено, значение при последнем доступном наблюдении будет перенесено в анализе далее. Пункты можно группировать по пяти измерениям, идентифицированным с учетом анализа факторов: синдром боли в области живота (три пункта), рефлюксный синдром (два пункта), диспепсический синдром (четыре пункта), синдром диареи (три пункта) и синдром запора (три пункта).

Аноректальная манометрия.

Данные об аноректальной манометрии были уже доступны для здоровых индивидуумов и их сравнивали с данными, полученными посредством аноректальной манометрии у индивидуумов с длительным T1D (T1D+ESRD) с использованием изготовленного на заказ зонда PVC, с открытым наконечником, диаметром 14-Fr, с семью отверстиями и 4-см латексным баллоном, присоединенным к концу зонда (Bio-engineering Laboratories Pic, Milan, Italy) (Carrington et al., 2014; Remes-Troche et al., 2010). Длину сфинктера измеряли после 10-минутного подготовительного периода, внутрианальное давление регистрировали в течение 15 мин в условиях покоя. Затем индивидуумов инструктировали сжимать анус так крепко, как возможно и в течение, если возможно, по меньшей мере 20 с. Авторы настоящего изобретения оценивали следующие пункты: тонус в покое, тонус сокращения, рефлексорная реакция и реакция неотложного позыва.

Патологическое исследование, иммуногистохимия и электронная микроскопия.

Колоректальную эндоскопию осуществляли у здоровых индивидуумов, индивидуумов с длительным T1D (T1D+ESRD) в исходный момент времени и в группах SPK и K+T1D через 2, 4 и 8 лет после трансплантации с использованием оптического устройства Welch Allyn. Образцы слизистой оболочки кишечника фиксировали в забуференном формалине (формальдегид 4% мас./об. и ацетатный буфер 0,05M) и заливали парафиновым воском. Срезы толщиной 3 мкм для каждого включенного пациента окрашивали гематоксилином и эозином (H&E) для морфологической оценки. В случае иммуногистохимии срезы толщиной 3 мкм помещали на покрытые поли-L-лизином стекла, депарафинизировали и гидратировали спиртами повышающейся концентрации и водой. После демаскирования антигена, осуществляемого посредством погружения срезов в 0,01M цитратный буфер, pH 6, в течение 10 мин в микроволновой печи при 650 Вт, а также ингибирования активности эндогенной пероксидазы, осуществляемого посредством погружения срезов в 3% пероксид водорода в течение 10 мин, осуществляли инкубацию с первичными антителами при 4°C в течение 18-20 ч с последующим получением авидин-биотинных комплексов (Hsu et al., 1981). Иммунные реакции проявляли с использованием 0,03% 3,3'-диаминобензидинтетрагидрохлорида, а затем срезы докрасивали гематоксилином Гарриса. Использовали следующие антитела: против Ki67 (моноклональное, клон MIB1, разведение 1:100, Dako, Carpinteria, CA, USA), против альдегиддегидрогеназы (моноклональное, клон 44/ALDH, разведение 1:1000, Transduction Laboratories, Franklin Lakes, NJ, USA), против EphB2 (моноклональное, клон 48CT12.6.4, разведение 1:200, Lifespan Biosciences, Seattle, WA, USA), против LGR5 (моноклональное, клон 2A2, разведение 1:100, Origene Technologies, Rockville, MD, USA), против hTERT (моноклональное, клон Y182, разведение 1:500, Millipore, Billerica, MA, USA), против глицентина (поликлональное, разведение 1:1250, Milab, Malmo, Sweden), против панкреатического полипептида (поликлональное, разведение 1:500, Peninsula, Belmont, CA, USA), против PYY (поликлональное, разведение 1:1000, Biogenesis, Bournemouth, UK), против серотонина (моноклональное, клон YC5, разведение 1:50, Biogenesis), против соматостатина (поликлональное, разведение 1:550, Dako), против IGF-I (поликлональное, 1:500, Abeam) и против IGF-1R (поликлональное, 1:100, Cell Signaling Technologies) (Fiorina et al., 2003). Для ультраструктурного анализа образцы фиксировали в течение 2 ч при 4°C в смеси 2% параформальдегида и 2% глутаральдегида в 0,05M какадилатном буфере, pH 7,3. После фиксации их обрабатывали 1% тетраоксидом осмия в течение 1 ч при комнатной температуре, затем дегидратировали и заключали в эпон-аралдит. Ультратонкие срезы нарезали алмазным ножом и помещали на никелевые сетки 200 меш, предварительно покрытые пленкой Formvar. Ультратонкие срезы окрашивали водным уранилацетатом и цитратом свинца по Рейнольдсу, а затем исследовали с использованием электронного микроскопа Philips Morgagni 268D. Пациентов группировали по количеству нейроэндокринных везикул (n>3 и n<3) для статистического анализа. Для выделения крипт ткань собирали в образце, содержащем смесь антибиотиков, и обрабатывали, как описано в следующем параграфе. Интенсивность иммуноокрашивания на EphB2 классифицировали от 1 (от отрицательного градиента EphB2 до нескольких положительных клеточек на крипту на поле) до 5 (сильный градиент EphB2 во всех продольных криптах). Первичное антитело против IGFBP3 (поликлональное, разведение 1:50, Sigma Aldrich) иммуногистохимически тестировали на биоптатах печени от пациентов с диабетом типа 1. Биоптаты печени без патологических признаков использовали в качестве контролей. Все эти образцы ткани получали из архива отделения патологии Department of Biomedical, Biotechnological and Translational Sciences, University of Parma, Parma, Italy. Интенсивность иммуноокрашивания классифицировали как 1 (слабая), 2 (умеренная) и 3 (сильная), в то время как его диффузию как 1 (фокальная), 2 (зональная) и 3 (диффузная).

Иммунофлуоресценция.

Образцы для иммунофлуоресцентного анализа, полученные из биоптатов печени, исследовали с использованием конфокальной системы (сканирующая головка LSM 510 Meta, интегрированная с инвертированным микроскопом Axiovert 200 M; Carl Zeiss, Jena, Germany) с 63-кратным масляным объективом. Изображения получали в многоканальном режиме с использованием последовательных и независимых оптических путей. Использовали следующие первичные антитела: против IGFBP3 кролика (1:10, Sigma), против Her Par-1 мыши (1:20, моноклональное, Dako), против CD163 мыши (1:10, клон MRQ26, CellMarque).

Мини-кишечники, сокультивированные с/без IGFBP3, с/без сыворотки при длительном T1D+высокая глюкоза (35 mM глюкозы) и полученные из крипт индивидуумов с T1D+ESRD, окрашивали на виментин, цитокератин 20, альдегиддегидрогеназу и синаптофизин для иммунофлуоресцентного анализа для оценки экспрессии маркеров линий клеток (фиг. 15: A1-A4, B1-B4, C1-C4, D1-D4, E1-E4). Использовали следующие первичные антитела: против виментина мыши (1:80, моноклональное, клон: V9 Dako), против альдегиддегидрогеназы мыши (1:1000, моноклональное, клон: 44, BD), против цитокератина мыши 20 (1:100, моноклональное, клон: Ks20.8, Dako) и против синаптофизина (1:100, моноклональное, клон: syn88, BioGenex).

Гибридизация in situ.

Парафиновые срезы слизистой оболочки толстого кишечника человека депарафинизировали и гидратировали стандартными способами. После обработки срезов с использованием 0,2M HCl в течение

15 мин при комнатной температуре срезы 3 раза промывали в PBS и инкубировали в течение 15 мин при 37°C с протеиназой К (30 мкг/мл в PBS). Добавляли 0,2% глицина в PBS на 1 мин для нейтрализации активности протеиназы К и дважды промывали образцы в PBS. После обработки после фиксации в 4% PFA в течение 10 мин при комнатной температуре и 3 промывок в PBS достигали ацетилирования гистонов посредством инкубации образцов два раза в течение 5 мин в водном растворе, содержащем 1,5% триэтанолamina, 0,15% HCl и 0,6% уксусного ангидрида. Затем образцы промывали и предварительно гибридизовали в течение 1 ч при 68°C в гибридизационном растворе (50% формамида, 5-кратный SSC, pH 4,5, 2% блокирующего реагента (Roche), 0,05% CHAPS (Sigma), 5 mM ЭДТА, 50 мкг/мл гепарина (Sigma) и 50 мкг/мл РНК дрожжей). В случае TМЕМ219 меченный дигоксигенином зонд разбавляли до 750 нг/мл в гибридизационном растворе и инкубировали в течение 24 ч при 65°C. Промывки после гибридизации осуществляли 3 раза в течение 20 мин в 50% формамиде/2-кратном SSC при 65°C. Срезы промывали в буфере TBS-T (0,1M Трис-HCl, pH 7,5, 0,15M NaCl, 0,1% Tween 20) и блокировали в течение 30 мин при комнатной температуре в блокирующем растворе (0,5% блокирующего реагента, 10% сыворотки овцы в TBS-T). Антитело овцы против DIG (Fab-фрагмент, Roche) разбавляли 1/2000 в блокирующем растворе и инкубировали в течение ночи при 4°C. После этого образцы промывали в TBS-T, а затем в буфере NTM (0,1M Трис, pH 9,5, 0,1M NaCl, 0,05M MgCl₂) и проявляли в растворе NBT/BCIP (Roche) в течение 24 ч.

Характеризация CoSC.

Очистка крипт.

Мышечный слой и подслизистую оболочку осторожно удаляли из свежих биоптатов прямой кишки человека и инкубировали слизистую оболочку со смесью антибиотиков (нормоцин, [Invivogen, San Diego, California 92121, USA], гентамицин [Invitrogen, Carlsbad, CA, USA] и фунгизон [Invitrogen]) в течение 15 мин при комнатной температуре (RT). Затем ткань нарезали на небольшие фрагменты и инкубировали с 10 mM дитиотреитола (DTT) (Sigma, St. Louis, MO 63103, USA) в PBS 2-3 раза в течение 5 мин при RT. Затем образцы переносили в 8 mM ЭДТА в PBS и медленно вращали в течение 60-75 мин при 4°C. Супернатант заменяли свежим PBS и посредством интенсивного встряхивания образца получали супернатанты, обогащенные криптами толстого кишечника. Добавляли эмбриональную телячью сыворотку (FBS, Sigma) до конечной концентрации 5% и центрифугировали фракции при 40×g в течение 2 мин для удаления отдельных клеток. Эту промывку повторяли 3 раза с использованием улучшенной среды DMEM/F12 (ADF, Gibco), дополненной 2 mM GlutaMax (Invitrogen), 10 mM HEPES (Sigma) и 5% FBS (Sigma).

200-300 единиц выделенных крипт толстого кишечника человека смешивали с 50 мкл матригеля и помещали на предварительно нагретые 24-луночные планшеты для культивирования, как описано выше. После отверждения (15-20 мин при 37°C) крипты перекрывали с 600 мкл полной среды для культивирования крипт [кондиционированная Wnt3a среда и улучшенная среда DMEM/F12 (Life Technologies, Grand Island, NY) 50:50, дополненная Glutamax, 10 mM HEPES, N-2 [1-кратный], B-27 без ретиноевой кислоты [1-кратный], 10 mM никотинамид, 1 mM N-ацетил-L-цистеин, 50 нг/мл EGF человека (Life Technologies, Grand Island, NY), 1 мкг/мл RSP01 (Sino Biological, Beijing, China), 100 нг/мл Noggin человека (Peprotech, Rocky Hill, NJ, USA), 1 мкг/мл гастрин (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), 500 нМ LY2157299 (Axon Med-Chem, Groningen, The Netherlands), 10 мкМ SB202190 (Sigma) и 0,01 мкМ PGE2 (Sigma)]. Среду меняли через день. В культуры добавляли ингибитор Rock Y-27632 (10 мкМ, Sigma) в течение первых 2-3 дней. Очищенные крипты культивировали в течение 8 дней. Маркеры линий клеток для энтероцитов и энтероэндокринных клеток оценивали в мини-кишечниках и в EphB2⁺ и EphB2⁻ сортированных отдельных клетках с использованием RT-ПЦР посредством тестирования: CHGA, KRT20 и EPCAM (Life Technologies, Grand Island, NY). Эффективность образования колоний (%) оценивали с использованием свежесделанных крипт для исключения того, что процедуры биопсии и выделения могли ухудшить их эффективность при образовании мини-кишечников в культуре *in vitro*. Для подтверждения количества ядер в свежесделанных криптах из индивидуумов CTRL и T1D+ESRD осуществляли окрашивание DAPI. Развившиеся мини-кишечники по меньшей мере с 1 доменом крипты также подсчитывали и вычисляли процент для получения большего количества количественных критериев для измерения развившихся мини-кишечников (фиг. 17A-P). Уровни инсулина и глюкозы, измеренные в сыворотке при длительном T1D (T1D+ESRD) и CTRL, представлены ниже.

Уровни глюкозы (T1D+ESRD по сравнению с CTRL, 178±47,5 по сравнению с 90±5,5 мг/дл, p=0,0001);

уровни инсулина (T1D+ESRD по сравнению с CTRL, 12,9±4,6 по сравнению с 5,8±1,6 мкМЕ/мл, p=0,009).

Проточная цитометрия.

Экспрессию маркеров CoSC EphB2 (APC-антитело против EphB2 человека, R&D, Minneapolis, MN) и LGR5 (PE-антитело против LGR5 человека, Origene, Rockville, MD) определяли с помощью проточной цитометрии посредством исключения CD45- и CD11b-положительных клеток (V450 против CD45 и CD11b человека, BD Biosciences, San Jose, CA). Добавляли йодид пропидия (PI) (10 мкг/мл) для исключения погибших клеток. EphB2⁺ клетки также сортировали с помощью проточной цитометрии для получения суспензии отдельных клеток в целях культивирования. Внутриклеточную детекцию *tert* человека

(hTERT) осуществляли посредством пермеабиллизации клеток и окрашивания с использованием первичного антитела против hTERT человека (GeneTex, Irvine, CA), а затем вторичного антитела против козы с DAPI (Life Technologies). Что касается анализа, клетки сначала гейтировали как P1 перед оценкой других поверхностных или внутриклеточных маркеров. Образцы анализировали с помощью BD LSR-Fortessa и FSC Express 3.0 (DeNovo Software, Los Angeles, CA, USA).

Исследование получения мини-кишечников *in vitro*.

Крипты выделяли из биоптатов прямой кишки здоровых индивидуумов и культивировали, как описано выше, для получения мини-кишечников. Для создания гипергликемических условий среду для культивирования модифицировали посредством добавления глюкозы в различных концентрациях (35 мМ: высокая глюкоза; 5 мМ: нормальная глюкоза). Для имитации уремических условий уремическую сыворотку человека, полученную из индивидуумов с длительным T1D с ESRD, добавляли к криптам, культивируемым, как указано в разделе о способах культивирования крипт. Через 8 дней крипты собирали и исследовали морфологию, рост мини-кишечников, экспрессию характерных маркеров кишечника (EphB2, LGR5, h-TERT), IGF-IR и TMEM219 (Life Technologies) и каспазы 9 (Life Technologies) с использованием RT-ПЦР. Пан-ингибитор каспазы (ингибитор каспазы Z-VAD-FMK, 20 мМ, Promega, Madison, WI), селективный ингибитор каспазы 8 (Z-IETD-FM, BD Pharmingen), селективный ингибитор каспазы 9 (Z-LEHD-FMK, BD Pharmingen), ингибитор каспазы 3 Z-DEVD-FMK (BD Pharmingen) использовали *in vitro* на мини-кишечниках для подтверждения антиапоптотического эффекта IGFBP3. Для культивирования выделенных крипт со средой для культивирования крипт, содержащей сыворотку здоровых людей, а именно сыворотку CTRL, вместо обычной FBS, клетки L-Wnt3 выращивали в 10% сыворотке CTRL для получения кондиционированной среды, которую затем добавляли в соотношении 50:50 к улучшенной среде DMEM/F12 для получения среды для культивирования крипт, как описано выше (см. Очистка крипт).

Для оценки свойств сортированных EphB2⁺ клеток при получении мини-кишечников 2000 сортированных клеток смешивали с 50 мкл матригеля и высевали на предварительно нагретые 24-луночные планшеты для культивирования. После отверждения матригеля (10-15 мин при 37°C) клетки перекрывали со "средой для выращивания отдельных клеток" (= полная среда для культивирования крипт+10М ингибитора Rock Y-27623). Среду через день заменяли свежей средой для выращивания отдельных клеток. Ингибитор Rock включали в среду для культивирования на 7-9 дней.

Иммуноблоттинг.

Все белки биоптатов кишечника выделяли в буфер Лэммли (Трис-HCl 62,5 ммоль/л, pH 6,8, 20% глицерина, 2% SDS, 5% β-меркаптоэтанола) и измеряли их концентрацию (Lowry et al., 1951). 35 мкг всего белка подвергали электрофорезу на 7% гелях для SDS-PAGE и блоттингу на нитроцеллюлозе (Schleicher & Schuell, Dassel, Germany). Затем блоты окрашивали понсо S. Мембраны блокировали в течение 1 ч в TBS (Трис [10 ммоль/л], NaCl [150 ммоль/л]), 0,1% Tween-20, 5% обезжиренного сухого молока, pH 7,4, при 25°C, инкубировали в течение 12 ч с 200 мг/мл поликлонального антитела против EphB2 козы, или поликлонального антитела против LGR5 козы (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), или моноклонального антитела против IGF-IR (Santa Cruz Biotechnology) и поликлонального антитела против TMEM219 (R&D, Minneapolis, MN), разведенного 1:200, или с моноклональным антителом мыши против β-актина (Santa Cruz Biotechnology), разведенным 1:1000 в TBS с 5% молока при 4°C, промывали четыре раза с TBS-0,1% Tween-20, затем инкубировали с меченым пероксидазой вторичным антителом кролика против IgG козы (или антителом кролика против β-актина мыши), разведенным 1:1000 (Santa Cruz Biotechnology) в TBS с 5% молока, и в конечном итоге промывали TBS-0,1% Tween-20. Полученные полосы визуализировали с использованием усиленной хемилюминесценции (SuperSignal; Pierce, Rockford, IL, USA).

Витальная визуализация роста кишечных крипт.

Витальную визуализацию мини-кишечников, полученных посредством очистки и культивирования кишечных крипт индивидуумов CTRL, T1D+ESRD и SPK, осуществляли с помощью Zeiss Axiovert S100, оборудованного контролем окружающей среды (от Oko-Lab, Italy) с камерой, в которую нагнетали увлажненный предварительно смешанный газ, состоящий из 5% CO₂ и 95% воздуха, и всю установку держали при 37°C. Изображения получали с 20-минутными интервалами в течение 72 ч. Изображения получали и обрабатывали с использованием Time Lapse (Oko-Lab, Italy) и, при необходимости, редактирование изображений осуществляли с использованием Adobe Photoshop Elements 7.0.

Анализ визуализации морфологии.

Изображения мини-кишечников получали в день 0, 5 и 8 с помощью инвертированного микроскопа Leica DH/RB и Axio Vision AC Release 4.3. Изображения, представленные на чертежах, представляют мини-кишечники в день 5, 10-кратное увеличение.

Профилирование транскриптома.

Тотальную РНК выделяли из суспензии очищенных кишечных крипт с использованием набора RNeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA) с расщеплением ДНКазой I на колонке. Затем 3 мкг тотальной РНК из каждого образца подвергали обратной транскрипции с использованием набора RT2 First Strand

kit (C-03; SABiosciences, Frederick, MD). Авторы настоящего изобретения использовали чипы Human Stem Cell RT2 Profiler PCR Array (PAHS-405Z), Human Stem Cell Signaling PCR Array (PAHS-047Z,) и сделанный на заказ чип со следующими генами: AXIN2, OLFM4, BMI1, RNF43, CDCA7, SLC12A2, CDK6, S0X9, DKC1, ZNRF3, ETS2, EPHB2, FAM84A, LGR5, GPX2, ACTB (SABiosciences). С помощью чипов Profiler PCR Array количественно измеряли экспрессию панели генов с использованием ПЦР в реальном времени с использованием SYBR Green (Kosinski et al., 2007). Для оценки профилирования транскриптома апоптотических маркеров и маркеров оксидативного стресса использовали Human Apoptosis PCR Array (PAHS-012Z, SABiosciences) и Human Oxidative stress PCR Array (PAHS-065Z, SABiosciences).

Анализ qRT-ПЦР.

РНК из очищенных кишечных крипт выделяли с использованием тризолового реагента (Invitrogen) и осуществляли анализ qRT-ПЦР с использованием анализов TaqMan (Life Technologies, Grand Island, NY) по инструкциям производителя. Нормализованные значения экспрессии определяли с использованием способа $\Delta\Delta Ct$. Данные количественной полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (qRT-ПЦР) нормализовали по экспрессии ACTB и вычисляли значения $\Delta\Delta Ct$. С помощью статистического анализа сравнивали экспрессию генов во всех популяциях клеток для каждого пациента с помощью одностороннего ANOVA и поправки Бонферрони для множественных сравнений между интересующей популяцией и всеми другими популяциями. Статистический анализ также осуществляли с использованием доступного программного обеспечения RT² profiler PCR Array Data Analysis (Qiagen). Для двух групп использовали t-критерий Стьюдента. Анализ осуществляли в трех параллелях после выделения свежих крипт и/или через 8 дней культивирования мини-кишечников. В табл. I-B приведены основные характеристики используемых праймеров.

Таблица I-B

Праймеры

Обозначение гена	UniGene #	Регистрационный номер Refseq	Размер полосы (п.н.)	Референсное положение
LGR5	Hs.658889	NM_003667	91	1665
EPHB2	Hs.523329	NM_004442	68	2908
TERT	Hs.492203	NM_198253	106	1072
ACTB	Hs.520640	NM_001101	174	730
IGF-IR	Hs.643120	NM_000875.3	64	2248
TMEM219	Hs.460574	NM_001083613.1	60	726
KRT20	Hs.84905	NM_019010.2	75	974
CHGA	Hs.150793	NM_001275.3	115	521
ErcaM	Hs.542050	NM_002354.2	95	784
LRP1	Hs.162757	NM_002332.2	64	656
TGFbR1	Hs.494622	NM_001130916.1	73	646
TGFbR2	Hs.604277	NM_001024847.2	70	1981
Каспаза 8	Hs.599762	NM_001080124.1	124	648
Каспаза 9	Hs.329502	NM_001229.4	143	1405

Анализ ELISA.

Уровни IGF-I и IGFBP3 в объединенных сыворотках/плазме всех групп индивидуумов и всех групп мышей, которым осуществляли или не осуществляли введение, оценивали с использованием коммерчески доступных наборов для ELISA по инструкциям производителя (R&D и Sigma).

Линию immortalized клеток гепатомы человека HuH-7 культивировали в течение 5 дней в DMEM с 10% FBS с различными концентрациями глюкозы: 5,5, 20 и 35,5 mM. Собирали супернатант культуры и оценивали IGFBP3 с использованием набора для ELISA IGFBP3 (Sigma) по инструкциям производителя. Собранные клетки отделяли с помощью трипсина и подсчитывали с использованием гемцитометра.

Уровни инсулина анализировали с помощью ферментативного иммунологического анализа с использованием микрочастиц (Mercodia Iso-Insulin ELISA) с использованием коэффициентов вариации (CV) для одного анализа и серии анализов 3,0% и 5,0%.

Рекомбинантные белки и интервенционные исследования.

Рекомбинантный IGF-I человека (Sigma, 13769), (IGF-I), рекомбинантный IGFBP3 человека (Life Technologies, 10430H07H5), (IGFBP3) и антитело против IGF-IR (Selleckchem, Boston, OSI-906) добавляли к культурам крипт в день +2 после выделения. IGFBP3 (Reprokine, Valley Cottage, NY) вводили наивным мышам и мышам B6, которым вводили STZ, в количестве 0,3 мг/мышь/день в течение 15 дней; IGF-I (Reprokine) и ecto-TMEM219 вводили in vivo мышам B6, которым вводили STZ, через 2 недели диабета в

дозе 5 мкг/мышь/день в течение 20 дней и 100 мкг/мышь/день в течение 15 дней соответственно.

Другие молекулы, тестируемые в анализе *in vitro* мини-кишечников и добавляемые к культурам крипт в день +2 после выделения: адипонектин (R&D), тимозин β 4 (Abeam), С-реактивный белок (Merck Millipore), цистатин С (Cell Signaling Technologies), хромогранин А (Life Technologies), фруктозобисфосфат-альдолаза (Novoprotein), остеопонтин (R&D), панкреатическая рибонуклеаза (РНКаза, Novoprotein), сывороточный амилоидный белок А (Abeam), сериновая протеаза маннозо-связывающего лектина 1 (MASP1, Novoprotein), фактор некроза опухоли (ФНО, R&D), Fas-лиганд (FasL, R&D). Также в анализе мини-кишечников тестировали пероксид водорода (H_2O_2 , 50 мкМ).

Получение рекомбинантного ecto-ТМЕМ219 человека.

Рекомбинантный ecto-ТМЕМ219 человека получали с использованием *E. coli* в качестве экспрессирующего хозяина для синтеза. В кратком изложении получали последовательность гена, кодирующую внеклеточный ТМЕМ219

```

THRTGLRSPDIPQDWVSFLRSFGQLTLCPRNGTVTGKWRGSHVVGLLTTLNFGDGPDRN
KTRTFQATVGLSQMGLKGSSAGQLVLI TARVTTERTAGTCLYFSAVPGILPSSQPPI SCSEEGA
GNATLSPRMGEECVSVWSHEGLVLT KLLTSEELALCGSR (SEQ ID NO: 2) .

```

Последовательность ДНК внеклеточного ТМЕМ219 клонировали в высококопийную плазмиду, содержащую промотор *lac*, с помощью которой затем трансформировали бактерию *E. coli*. Добавлением IPTG (аналога лактозы) активировали промотор *lac* и заставляли бактерии экспрессировать внеклеточный ТМЕМ219 (ecto-ТМЕМ219). SDS-PAGE и вестерн-блоттинг использовали для подтверждения чистоты выше 90%. Молекулярная масса свежеполученного рекомбинантного белка ecto-ТМЕМ219 человека составляла 80 кДа.

Крипты из здоровых индивидуумов выделяли и культивировали, как описано выше, в культуру добавляли ecto-ТМЕМ219 в трех концентрациях (260, 130 и 75 нг/мл) относительно используемой концентрации IGFBP3 (2:1, 1:1 и 1:2) и устанавливали подходящие контроли для каждой концентрации. Через 8 дней культивирования дополнительно оценивали экспрессию каспазы 8 и 9, экспрессию характерных маркеров CoSc (EphB2 и LGR5), количество развившихся мини-кишечников.

Малая интерферирующая РНК.

Выделенные крипты, полученные из здоровых индивидуумов, выращивали для получения *in vitro* мини-кишечников в полной среде и в среде для культивирования, модифицированной посредством добавления глюкозы в высокой концентрации и сыворотки при длительном T1D, как описано выше (см. исследование получения *in vitro* мини-кишечников в представленных способах). После 72 ч культивирования, позволяющих криптам восстанавливаться, 750 нг малой интерферирующей РНК (миРНК; миРНК Flexitube S104381013, Qiagen, Valencia, CA) инкубировали в 100 мкл среды для культивирования без сыворотки и с 6 мкл реагента для трансфекции HiPerFect (Qiagen) при комнатной температуре, чтобы сделать возможным образование трансфекционных комплексов. Крипты инкубировали с этими трансфекционными комплексами в условиях их нормального роста в течение 6 ч. Анализ сайленсинга генов осуществляли через 24, 48 и 72 ч посредством оценки процента нормальных развившихся мини-кишечников. Контрольную миРНК использовали с качестве отрицательного контроля для подтверждения эффекта сайленсинга генов.

Протеомный анализ.

8 мкл объединенной сыворотки от 10 пациентов на группу истошали с использованием центрифужной колонки ProteoPrep 20 (Sigma), таким образом, удаляя 20 белков с большим избытком. Процедуру повторяли дважды по инструкциям производителя для достижения ~99% истощения. Выделенный супернатант анализировали для определения общей концентрации белка с использованием спектрофотометра Direct Detect IR и BSA в качестве стандарта. Для получения достаточного количества белка для протеомного анализа 32 мкл из каждой совокупности обрабатывали, как описано выше. 40 мкг общего белка из каждого образца расщепляли в растворе с использованием протокола Filter Aided Sample Preparation (FASP), как описано в литературе (Wisniewski et al., 2009). Образцы обессаливали с использованием самостоятельного сделанных колонок C18 (мембрана C18 Empore, 3M) и инъецировали их в систему для капиллярной хроматографии (EasyLC, Proxeon Biosystems, Thermo Scientific). Разделение пептидов осуществляли с помощью самостоятельного сделанной обращенно-фазовой кварцевой капиллярной колонки 25 см, упакованной 3 мкм ReproSil Pur 120 C18-AQ. Использовали градиент элюентов А (чистая вода с 2% об./об. АСН, 0,5% об./об. уксусной кислоты) и В (АСН с 20% об./об. чистой воды с 0,5% об./об. уксусной кислоты) для разделения (скорость потока 0,15 мкл/мин) (от 10 до 35% В за 230 мин, от 35 до 50% В за 5 мин и от 50 до 70% В за 30 мин). Масс-спектрометрический анализ осуществляли с использованием масс-спектрометра LTQ-Orbitrap (Thermo Scientific, Waltham, MA), оборудованного источником ионов с нанораспылением (Proxeon Biosystems). Полные массовые спектры получали в режиме фиксированной массы и разрешением, установленным на 60000. Полученные диапазоны масс для каждого образца составляли *m/z* от 300 до 1750 Да. Десять наиболее интенсивных дважды и трижды заряженных ионов выбирали и фрагментировали в ионной ловушке с использованием нормализованной энергии столкновений 37%. Целевые ионы, уже выбранные для MS/MS, динамически исключали в течение 120 с. Все об-

разцы MS/MS анализировали с использованием средства поиска Mascot (v.2.2.07, Matrix Science, London, UK) для поиска в UniProt Human Complete Proteome cp hum 2013 12. Поиски осуществляли с использованием расщепления трипсином, при этом допустимо два пропущенных расщепления, карбамидометилирования цистеина в качестве фиксированной модификации, ацетилирования N-конца белка и окисления метионина в качестве переменной модификации. Допуск по массе устанавливали на 5 м.д. и 0,6 Да для ионов предшественника и фрагмента соответственно. Для количественного анализа белков исходные данные загружали в программное обеспечение MaxQuant версии 1.3.0.5 (Cox et al., 2011). Количественный анализ немеченого белка основан на интенсивностях предшественников. Принимали пептиды и белки с FDR менее 1%, минимум два пептида на белок. Эксперименты осуществляли в трех параллелях. Полный набор данных о белках, полученных посредством протеомного анализа (табл. I-C), анализировали с помощью t-критерия Стьюдента с использованием программного обеспечения MeV v. 4_8_1. 47 белков, значимо отличающихся (значение $p < 0,01$) в контрольной совокупности по сравнению с совокупностью T1D-ESDR, дополнительно подвергали иерархической кластеризации.

В табл. I-C представлено соответствие между номерами и названиями белков, определенных посредством протеомного анализа, представленное в виде тепловой карты на фиг. 10.

Таблица I-C

Список количественно проанализированных белков, идентифицированных с помощью протеомного анализа

Исходный ряд	Названия белков
1	Белок 14-3-3 дзета/дельта
4	Актин, цитоплазматический 1; актин, цитоплазматический 1, процессированный на N-конце; актин, цитоплазматический 2; актин, цитоплазматический 2, процессированный на N-конце
5	Адипонектин
6	Афамин
8	Альфа-1-антихимотрипсин; альфа-1-антихимотрипсин без His-Pro
9	Альфа-1-антитрипсин; короткий пептид из ААТ
12	Альфа-2-НС-гликопротеин; цепь А альфа-2-НС-гликопротеина; цепь В альфа-2-НС-гликопротеина
13	Альфа-2-макроглобулин
14	Альфа-актинин-1
16	Ангиотензиноген; ангиотензин-1; ангиотензин-2; ангиотензин-3
17	Антитромбин-III
18	Аполипопротеин А-I; укороченный аполипопротеин А-I
20	Аполипопротеин А-IV
21	Аполипопротеин В-100; аполипопротеин В-48
22	Аполипопротеин С-I; укороченный аполипопротеин С-I
23	Аполипопротеин С-II
24	Аполипопротеин С-III
25	Аполипопротеин С-IV
26	Аполипопротеин D
28	Аполипопротеин F
29	Аполипопротеин LI
31	Аполипопротеин (a)
34	Аттрацин
35	Специфичный для базальной мембраны коровый белок протеогликана гепарансульфата; эндорепеллин; пептид LG3
36	Бета-2-гликопротеин 1
37	Бета-2-микроглобулин; форма бета-2-микроглобулина pI 5,3
39	Бета-Ala-His-дипептидаза

42	Бета-цепь С4b-связывающего белка
43	Кадгерин-1; E-Cad/CTF1; E-Cad/CTF2; E-Cad/CTF3
44	Кадгерин-13
45	Кадгерин-5
46	Кальретикулин
50	Субъединица 2 карбоксипептидазы N
51	Олигомерный матричный белок хряща
54	Антиген CD44
57	Церулоплазмин
59	Хромогранин-А; вазостатин-1; вазостатин-2; EA-92; ES-43; панкреастатин; SS-18; WA-8; WE-14; LF-19; AL-11; GV-19 ;GR-44; ER-37
60	Кластерин; бета-цепь кластерина; альфа-цепь кластерина; кластерин
62	Фактор свертывания V; тяжелая цепь фактора свертывания V; легкая цепь фактора свертывания V
63	Фактор свертывания X; легкая цепь фактора X; тяжелая цепь фактора X; тяжелая цепь активированного фактор Ха
65	Кофилин-1
66	Цепь коллагена альфа-3 (VI)
68	Субкомпонент компонента комплемента C1r; тяжелая цепь субкомпонента компонента комплемента C1r; легкая цепь субкомпонента компонента комплемента C1r
71	Компонент комплемента C2; фрагмент компонента комплемента C2b; фрагмент компонента комплемента C2a
72	Компонент комплемента C3; бета-цепь компонента комплемента C3; альфа-цепь компонента комплемента C3; анафилотоксин C3a; альфа-цепь компонента комплемента C3b; фрагмент 1 альфа-цепи компонента комплемента C3c; фрагмент компонента комплемента C3dg; фрагмент компонента комплемента C3g; фрагмент компонента комплемента C3d; фрагмент компонента комплемента C3f; фрагмент 2 альфа-цепи компонента комплемента C3c
73	Компонент комплемента C4-A; бета-цепь компонента комплемента C4; альфа-цепь компонента комплемента C4-A; анафилотоксин C4a; C4b-A; C4d-A; гамма-цепь компонента комплемента C4
74	Компонент комплемента C4-B; бета-цепь компонента комплемента C4; альфа-цепь компонента комплемента C4-B; анафилотоксин C4a; C4b-B; C4d-B; гамма-цепь компонента комплемента C4
75	Компонент комплемента C5; бета-цепь компонента комплемента C5; альфа-цепь компонента комплемента C5; анафилотоксин C5a; альфа-цепь компонента комплемента C5
76	Рецептор компонента комплемента C1q

77	Компонент комплемента C6
78	Компонент комплемента компонент C7
84	Фактор комплемента D
88	Фактор комплемента I; тяжелая цепь фактора комплемента I; легкая цепь фактора комплемента I
89	Кортикостероид-связывающий глобулин
90	C-реактивный белок; C-реактивный белок (1-205)
91	Цистатин-С
92	Цистатин-М
95	EGF-содержащий фибулин-подобный белок внеклеточного матрикса 1
96	Эндотелиальный рецептор протеина C
97	Белок внеклеточного матрикса 1
98	Внеклеточная супероксиддисмутаза [Cu-Zn]
99	Фетуин-В
100	Альфа-цепь фибриногена; фибринопептид А; альфа-цепь фибриногена
101	Бета-цепь фибриногена; фибринопептид В; бета-цепь фибриногена
102	Гамма-цепь фибриногена
103	Фибронектин; анастеллин; Ugl-Y1; Ugl-Y2; Ugl-Y3
104	Фибулин-1
105	Фиколин-3
106	Фруктозобисфосфат-альдолаза А; Фруктозобисфосфат-альдолаза
107	Галектин-3-связывающий белок
108	Гамма-глутамилгидролаза
109	Гельзолин
111	Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа
112	Гаптоглобин; альфа-цепь гаптоглобина; бета-цепь гаптоглобина
117	Кофактор 2 гепарина
122	Регулируемый гипоксией белок 1
123	C-область цепи Ig альфа-1
125	C-область цепи Ig гамма-1
126	C-область цепи Ig гамма-2
127	C-область цепи Ig гамма-3
129	Область SESS тяжелой цепи V-II Ig; область OU тяжелой цепи V-II Ig
130	Область BRO тяжелой цепи V-III Ig; область ТЕI тяжелой цепи V-III Ig; область BUT тяжелой цепи V-III Ig; область WEA тяжелой цепи V-III Ig
134	Область VN26 тяжелой цепи V-III Ig
135	C-область каппа-цепи Ig
136	Область EU каппа-цепи V-I Ig; область CAR каппа-цепи V-I Ig
142	Область WOL каппа-цепи V-III Ig; область SIE каппа-цепи V-III Ig

	Ig; область Ti каппа-цепи V-III Ig; область GOL каппа-цепи V-III Ig
144	Область Len каппа-цепи V-IV Ig
145	Область HA лямбда-цепи V-I Ig; область WAN лямбда-цепи V-I Ig; область MGC лямбда-цепи V-II Ig; область WIN лямбда-цепи V-II Ig
146	Область LOI лямбда-цепи V-III Ig
148	C-области лямбда-2-цепи Ig; C-области лямбда-3-цепи Ig; C-область лямбда-6-цепи Ig
153	Имуноглобулин лямбда-подобный полипептид 5; C-области лямбда-1-цепи Ig
154	Связывающий белок инсулиноподобного фактора роста 2
155	Связывающий белок инсулиноподобного фактора роста 3
156	Связывающий белок инсулиноподобного фактора роста 6
158	Тяжелая цепь интер-альфа-ингибитора трипсина H1
159	Тяжелая цепь интер-альфа-ингибитора трипсина H2
160	Тяжелая цепь интер-альфа-ингибитора трипсина H3
161	Тяжелая цепь интер-альфа-ингибитора трипсина H4; тяжелая цепь интер-альфа-ингибитора трипсина H4 70 кДа; тяжелая цепь интер-альфа-ингибитора трипсина H4 35 кДа
164	Кератин, тип I цитоскелетный 10
165	Кератин, тип I цитоскелетный 9
166	Кератин, тип II цитоскелетный 1
167	Кининоген-1; тяжелая цепь кининогена-1; Т-кинин; брадикинин; лизил-брадикинин; легкая цепь кининогена-1; низкомолекулярный стимулирующий рост фактор
168	Богатый лейцином альфа-2-гликопротеин
171	V-цепь L-лактатдегидрогеназы; L-лактатдегидрогеназа
174	Льюмикан
175	Рецептор 1 гиалуроновой кислоты эндотелия лимфатических сосудов
176	Лизоцим С
178	Сериновая протеаза маннозо-связывающего лектина 1; тяжелая цепь сериновой протеазы маннозо-связывающего лектина 1; легкая цепь сериновой протеазы маннозо-связывающего лектина 1
180	Антиген дифференцировки моноцитов CD14; антиген дифференцировки моноцитов CD14, мочева форма; антиген дифференцировки моноцитов CD14, мембраносвязанная форма
181	Мультимерин-1; тромбоцитарный гликопротеин Ia*; тромбоцитарный мультимерин 155 кДа
183	Нейдезин
185	Белок, подобный молекуле адгезии нервных клеток L1; процессированный белок, подобный молекуле адгезии нервных

	клеток L1
187	Остеопонтин
188	Ингибитор пептидазы 16
189	Пептидил-пролил-цис-транс-изомеразы А; пептидил-пролил-цис-транс-изомеразы
192	Фосфатидилэтаноламин-связывающий белок 4
194	Фактор пигментного эпителия
197	Плазминоген; тяжелая цепь А плазмينا; пептид активации; ангиостатин; тяжелая цепь А плазмина, короткая форма; легкая цепь В плазмина
198	Основной тромбоцитарный белок; активационный белок соединительной ткани III; ТС-2; активационный белок соединительной ткани III (1-81); бета-тромбоглобулин; нейтрофил-активирующий белок 2 (74); нейтрофил-активирующий белок 2 (73); нейтрофил-активирующий белок 2; ТС-1; нейтрофил-активирующий белок 2 (1-66); нейтрофил-активирующий белок 2 (1-63)
199	Альфа-цепь тромбоцитарного гликопротеина Ib; гликокалицин
200	Белок 2, содержащий плексиновый домен
203	Профилин-1
204	Богатый пролином кислый белок 1
205	Пропердин
206	Простагландин-H2-D-изомеразы
207	Белок AMBP; альфа-1-микроглобулин; легкая цепь интер-альфа-ингибитора трипсина; трипстатин
209	Протромбин; фрагмент активационного белка 1; фрагмент активационного белка 2; легкая цепь тромбина; тяжелая цепь тромбина
212	Тирозиновая протеинфосфатаза гамма рецепторного типа
213	Ретинолсвязывающий белок 4; ретинолсвязывающий белок плазмы (1-182); ретинолсвязывающий белок плазмы (1-181); ретинолсвязывающий белок плазмы (1-179); ретинолсвязывающий белок плазмы (1-176)
214	Ингибитор диссоциации Rho GDP 2
215	Панкреатическая рибонуклеаза
216	Богатый цистеином белок M130 типа 1 скавенджер-рецептора; растворимый CD163
217	Секретируемый и трансмембранный белок 1
221	Серотрансферин
222	Сывороточный альбумин
223	Сывороточный амилоидный белок А
225	Р-компонент сывороточного амилоида; Р-компонент сывороточного

	амилоида (1-203)
226	Сывороточная параоксоназа/арилэстераза 1
228	SPARC-подобный белок 1
230	Талин-1
232	Тенасцин-Х
233	Тетранектин
234	Тромбоспондин-1
235	Тромбоспондин-4
236	Тимозин бета-4; гемопоэтический системный регуляторный пептид
237	Тироксин-связывающий глобулин
239	Трансгелин-2
240	Интегральный мембранный белок 2 транс-комплекса Гольджи
242	Альфа-4-цепь тропомиозина
243	Белок адгезии клеток сосудов 1
244	Вазорин
245	Винкулин
247	Витамин К-зависимый протеин С; легкая цепь витамин К-зависимого протеина С; тяжелая цепь витамин К-зависимого протеина С; активационный пептид
248	Витамин К-зависимый протеин S
249	Витамин К-зависимый протеин Z
250	Витронектин; субъединица витронектина V65; субъединица витронектина V10; соматомедин-B
251	Фактор фон Виллебранда; антиген фон Виллебранда 2
254	Цинк-альфа-2-гликопротеин
258	Витамин D-связывающий белок
259	Фактор комплемента Н
266	Фибулин-1
267	Сериновая протеаза маннозо-связывающего лектина 1
270	Фактор комплемента Н-связанный белок 4

Стратегия выбора белков-кандидатов.

Среди 46 факторов, разделенных у индивидуумов с длительным T1D и здоровых контролей, авторы настоящего изобретения сначала выбирали факторы с более значимыми различиями интенсивности LFQ при сравнении двух групп ($p > 0,005$), что приводило к исключению 12 факторов (фиг. 16). Затем авторы настоящего изобретения оценивали то, могут ли измененные факторы быть ассоциированными с кишечными нарушениями и/или с развитием диабета, посредством поиска уже опубликованных исследований и публикаций в этой области. Это привело к исключению еще 12 факторов. Авторы настоящего изобретения также исключали факторы, в основном, относящиеся к лимфоидному компартменту ($n=5$). Авторы настоящего изобретения закончили отбор с 17 факторами. Авторы настоящего изобретения исключали белки клеточной мембраны ($n=4$) и тестировали остальные белки ($n=13$) с помощью анализа мини-кишечников. Два фактора нельзя было протестировать *in vitro*. Авторы настоящего изобретения тестировали всего $n=11$ белков.

Исследования на животных.

Мышей C57BL/6 (B6) получали из Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine. Всех мышей содержали и использовали в соответствии с руководствами учреждения, одобренными Harvard Medical School Institutional Animal Care and Use Committee. У мышей вызывали диабет с помощью инъекции стрептозотоцина (225 мг/кг, введение *i.p.*; Sigma). Диабет определяли по уровням глюкозы в крови >250 мг/дл для 3 последовательных измерений. Диабетическую энтеропатию оценивали следующим образом: в кратком изложении, из умерщвленных мышей выделяли целый кишечник и промывали его PBS. Затем крайнюю часть толстого кишечника отрезали и разделяли на два фрагмента. Один фрагмент ткани толстого кишечника напрямую погружали в формалин, в то время как другую разрезали продольно для открытия просвета и внутренней слизистой оболочки и затем погружали в формалин. Затем ткань погружали в парафин и подготавливали к окрашиванию H&E и иммуноокрашиванию. Кроме того, ткань толстого кишечника также разрезали и выделяли стволовые клетки толстого кишечника, как описано выше (Merlos-Suarez et al., 2011). В кратком изложении толстый кишечник разрезали на фрагменты 2-4 мм и промывали их в 30 мл ледяного PBS. Фрагменты переносили в пробирку емкостью 50 мл, содержащие предварительно нагретый 20 мМ ЭДТА-PBS, и инкубировали при 37°C в течение 30 мин. После инкубации суспендированную ткань переносили в пробирку, содержащую 30 мл холодного PBS, и центрифугировали.

Крипты ресуспендировали в 13 мл холодной DMEMF12, промывали PBS и расщепляли в 5-10 мл раствора трипсина/ДНКазы при 37°C в течение 30 мин. Затем крипты ресуспендировали в DMEMF12/ЭДТА, дважды фильтровали с помощью фильтра 40 мкм и промывали. В конце крипты ресуспендировали в жидкой среде (DMEM+FBS+ЭДТА) и окрашивали с помощью антитела против EphB2-APC (R&D), антитела мыши против CD45-PerCP и антитела мыши против CD11b-PE (BD Pharmigen). Образцы исследовали с использованием FACSCalibur Analyzer и анализировали данные с помощью Flow Jo. Часть ткани также быстро замораживали и хранили в тризоле для осуществления исследований с помощью RT-ПЦР на следующие маркеры:

Обозначение гена	UniGene#	Регистрационный номер Refseq	Размер полосы (п.н.)	Референсное положение
LGR5	Mm.42103	NM_010195.2	64	571
TFHB2	Mm.250981	NM_010142.2	85	1696
Casp8	Mm.336851	NM_001080126.1	96	1525
Casp9	Mm.88829	NM_001277932.1	68	377
GADPH	Mm.204088	NM_008084.2	107	75

В конечном итоге плазму и сыворотку собирали для анализа уровней IGF-I (набор для ELISA IGF-I, R&D), IGFBP3 (набор для ELISA IGFBP3, R&D) и инсулина (набор для ELISA инсулина мыши Merckodia). Глюкозу крови подвергали мониторингу дважды в неделю в течение 8 недель для подтверждения дебюта и устойчивого состояния диабета.

Статистический анализ.

Данные представлены в виде среднего со стандартной ошибкой среднего (SEM), и их тестировали на нормальное распределение с использованием критерия Колмогорова-Смирнова и на однородность дисперсии с использованием критерия Левена. Статистическую значимость различий тестировали с помощью двустороннего t-критерия и критерия хи-квадрат (χ^2). Значимость различий между двумя группами определяли с помощью непарного двустороннего t-критерия Стьюдента. В случае множественных сравнений использовали анализ ANOVA с поправкой Бонферрони. Все данные вводили в Statistical Package for the Social Science (SPSS®, IBM®, SPSS Inc., Chicago, IL) и анализировали. Графики получали с использованием GraphPad Prism версии 5.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA). Все статистические тесты осуществляли при уровне значимости 5%.

Результаты.

При длительном T1D присутствуют дисфункция кишечника и клинические симптомы.

Авторы настоящего изобретения сначала охарактеризовывали морфологию и функционирование кишечника в популяции индивидуумов с длительным T1D и терминальной стадией почечной недостаточности (T1D+ESRD) и у здоровых индивидуумов (CTRL). Тяжелые кишечные симптомы, такие как диарея, боль в области живота и запор, наблюдали у индивидуумов T1D+ESRD по результатам оценки с использованием опросника Шкалы рейтинга желудочно-кишечных симптомов (GSRS) (фиг. 1A-C). Симптомы были ассоциированы с аномалиями функционирования аноректального сфинктера (фиг. 1D-F). Слизистая оболочка кишечника была изменена у индивидуумов с T1D+ESRD по сравнению со здоровыми индивидуумами с более низким количеством крипт, деформацией и зональным склерозом собственной пластинки (фиг. 1G1-G2, H). Наблюдали значительное снижение пролиферации клеток эпителия по данным окрашивания на Ki67 (антитело MIB1) (фиг. 1I1-I2, J), признаки дегенерации нейронов (фиг. 1K1-K2, L) и снижение экспрессии серотонина в нейроэндокринных клетках кишечника (фиг. 1M1-M2, N), что подтверждает наличие DE у этих индивидуумов.

При длительном T1D изменяются CoSC.

При характеристике крипт толстого кишечника выявляли значимое снижение экспрессии EphB2⁺ и количества клеток, иммунореактивных в отношении альдегиддегидрогеназы (Aldh)⁺ у индивидуумов T1D+ESRD по сравнению со здоровыми индивидуумами, оба этих маркера являются маркерами локальных стволовых клеток (Carpentino et al., 2009; Jung et al., 2011) (фиг. 1O1-O2, P, Q1-Q2, R). При гейтировании по PE клеткам при анализе FACS (фиг. 8A-C) выявляли значительное снижение процента EphB2^{hi}, EphB2^{hi}LGR5⁺ и EphB2^{hi}TERT⁺ клеток, выделенных из кишечных крипт, полученных из индивидуумов T1D+ESRD, по сравнению со здоровыми индивидуумами (фиг. 2A-B, C-E, фиг. 8D-E), и это подтверждали с помощью RT-ПЦР (фиг. 2F-H) и вестерн-блоттинга (WB) (фиг. 8F). При профилировании транскриптома крипт, полученных из T1D+ESRD, определяли сниженную экспрессию генов пути Notch (Notch1 и 2, JAG1, Dll, Sox1 и 2), пути Wnt (APC, FZD1, DKC1, ETS2, FAM84 A, GPX2, RNF43) и пути BMP (BMP1, BMP2, BMP3), путей, о которых ранее было известно, что они контролируют CoSC по сравнению с экспрессией этих генов у здоровых индивидуумов (фиг. 8G и табл. II).

Список положительно и отрицательно регулируемых генов-мишеней стволовых клеток, идентифицированных посредством профилирования транскриптома в свежевыделенных криптах толстого кишечника CTRL по сравнению с T1D+ESRD (по меньшей мере $p < 0,05$)

Отрицательно регулируемые гены	Положительно регулируемые гены
ACTC1, APC, CD44, BTRC, SOX1, SOX2, CCND2, FZD1, ADAR, ACAN, ALPI, CD8A, COL1A1, COL2A1, COL9A1, BMP1, BMP2, BMP3, CCNA2, CCNE1, CDC42, CDK1, CTNNA1, CXCL12, PARD6A, CD3D, CD8B, MME, CD4, DLL1, HDAC2, NOTCH1, DLL3, JAG1, NOTCH2, DTX2, KAT2A, NUMB, EP300, FGF2, FGF3, FGFR1, CGF3, ISL1, KRT15, MSX1, MYOD1, T, GJA1, GJB1, GJB2, KAT8, RB1, h-TERT, NCAM1, SIGMAR1, TUBB3, ABCG2, ALDH1A1, PDX1, IGF-I, DHH, BGLAP	DVL1, WNT1

При анализе характерных генов CoSC определяли, что LGR5, EphB2 (Gracz et al., 2013; Merlos-Suarez et al., 2011), h-TERT (Breault et al., 2008) и другие маркерные гены стволовых клеток кишечника (Hughes et al., 2011; Munoz et al., 2012; Ziskin et al., 2013) в значительной степени недоэкспрессировались при T1D+ESRD по сравнению со здоровыми индивидуумами (фиг. 2I), что подтверждает, что CoSC изменены у индивидуумов с DE.

При длительном T1D изменено образование мини-кишечников *in vitro*.

Для оценки свойств самоподдержания CoSC авторы настоящего изобретения использовали анализ мини-кишечников *in vitro*. Фактически, крипты, выделенные из индивидуумов T1D+ESRD и культивируемые *in vitro* в течение 8 дней, образовывали небольшие сферические мини-кишечники, которые не могли расти по сравнению с криптами здоровых индивидуумов (фиг. 2J1, J2, K), несмотря на сравнимую жизнеспособность (фиг. 8H-I) и эффективность образования мини-кишечников в обеих группах (фиг. 8J). Для прояснения эффекта циркулирующих факторов и высокой концентрации глюкозы в отношении CoSC авторы настоящего изобретения культивировали выделенные кишечные крипты, полученные из здоровых индивидуумов, при высокой концентрации глюкозы с/без сыворотки, полученной из индивидуумов с длительным T1D *in vitro*, в течение 8 дней (фиг. 2L1-L4, M). Высокая концентрация глюкозы частично предотвращала образование полностью зрелых мини-кишечников и действовала синергично с сывороткой индивидуумов с длительным T1D при изменении свойств самоподдержания CoSC, таким образом, мини-кишечники выглядели поврежденными (фиг. 2L2-L4). При анализе экспрессии генов также выявляли изменение характерных маркеров CoSC (фиг. 2N), что, таким образом, позволяет предполагать, что гипергликемия и циркулирующие факторы действуют совместно, изменяя регенеративные свойства CoSC при длительном T1D.

С помощью объективного протеомного профилирования сыворотки выявляли повышенные уровни IGFBP3 при длительном T1D.

Для идентификации потенциальных циркулирующих факторов, которые могут служить в качестве энтеротропных гормонов и могут играть роль в регуляции CoSC, авторы настоящего изобретения сравнивали протеом сыворотки здоровых индивидуумов с индивидуумами T1D+ESRD с использованием объективного протеомного анализа. Выявляли чистый протеомный профиль у индивидуумов T1D+ESRD по сравнению со здоровыми индивидуумами, при этом более 50% определенных белков попадали в одну группу или другую (фиг. 3A). Некоторые белки были ассоциированы с диабетом, а некоторые являлись факторами роста или белками, связанными со стволовыми клетками, или были потенциально вовлечены в функционирование кишечника (фиг. 3A). В частности, уровни IGF-1-связывающих белков (IGFBP2 и 3) являлись определяемыми у индивидуумов с длительным T1D по сравнению со здоровыми индивидуумами, при этом IGFBP3 повышен почти в 5 раз (фиг. 3B), в то время как IGFBP1, 4, 5 и 6 оставались почти неопределимыми. Примечательно, что в печени индивидуумов с длительным T1D гепатоциты, но не

купферовские клетки, демонстрировали более высокую экспрессию IGFBP3 по данным иммуногистохимии по сравнению со здоровыми индивидуумами (фиг. 3C1-C2, фиг. 8L1-L6), что позволяет предполагать повышение синтеза и высвобождения IGFBP3 в печени. Эффект высокой концентрации глюкозы в отношении высвобождения IGFBP3 в печени подтверждали посредством детекции повышенных уровней IGFBP3 в супернатанте иммортализованных гепатоцитов человека, подвергнутых воздействию высокой концентрации глюкозы (фиг. 3D). В конечном итоге уровни свободного IGF-I сыворотки были значимо снижены при длительном T1D по сравнению со здоровыми индивидуумами (фиг. 3E), что свидетельствует о том, что уровни циркулирующего IGF-I и IGFBP3 при длительном T1D изменены.

Периферические IGFBP3 и IGF-I контролируют CoSC.

Для дальнейшего выяснения роли циркулирующего IGF-I и IGFBP3 в регуляции CoSC и пролиферации эпителия кишечника авторы настоящего изобретения демонстрировали экспрессию IGF-IR и рецептора IGFBP3 (TMEM219) на выделенных криптах (фиг. 3F, H, фиг. 8M, N1-N2) с использованием RT-ПЦР и WB (фиг. 3F, H, фиг. 8M) и подтверждали экспрессию IGF-IR на CoSC с использованием иммуноокрашивания (фиг. 8N1-N2) и TMEM219 с использованием гибридизации *in situ* (фиг. 3G1-G2). Для механистического подтверждения роли IGF-I и IGFBP3 в отношении CoSC авторы настоящего изобретения тестировали эффект нескольких молекул, идентифицированных посредством протеомного профилирования, с помощью анализа мини-кишечников *in vitro*. Стратегия авторов настоящего изобретения для выбора потенциальных мишеней приведена в дополнительной информации. Значительно измененные мини-кишечники, полученные из образцов кишечника, полученных из индивидуумов T1D+ESRD, восстанавливали посредством добавления рекомбинантного IGF-I человека (IGF-I) в среду для культивирования (фиг. 31), в то время как добавление рекомбинантного IGFBP3 (IGFBP3) человека приводило к отмене положительного эффекта, наблюдаемого в отношении IGF-I, со сниженным развитием мини-кишечников и повышенным образованием разрушенных и деформированных органоидов (фиг. 31). Так как недавно показано, что IGFBP3 действует независимо от IGF-I (Williams et al., 2007) через рецептор IGFBP3 (TMEM219) (Baxter, 2013), необходимо выяснить, осуществляет ли IGFBP3 свои эффекты в отношении CoSC посредством связывания IGF-I или прямого воздействия на TMEM219 на CoSC. Авторы настоящего изобретения впервые подтверждали, что IGFBP3 обладает прямым проапоптотическим эффектом в отношении CoSC, демонстрируя повышенную экспрессию каспазы 8 и 9 в мини-кишечниках, полученных из здоровых индивидуумов и индивидуумов с длительным T1D и культивируемых с IGFBP3 (фиг. 3J, фиг. 9A-B), в то время как добавление пан-ингибитора каспазы (Z-VAD-FMK) или добавление обоих селективных ингибиторов каспаз 8 и 9, но не других ингибиторов каскада каспаз (ингибитор каспазы 3) устраняет эффект IGFBP3 (фиг. 3K). Затем авторы настоящего изобретения демонстрировали, что добавление IGF-I не восстанавливало развитие мини-кишечников, полученных из здоровых индивидуумов и подвергнутых воздействию IGFBP3 (фиг. 3L), подтверждая, что IGFBP3 может действовать через прямой и непрямой механизм IGF-I. Примечательно, что высокая концентрация глюкозы в отдельности не могла полностью нарушать рост мини-кишечников, и антитело против IGF-IR не ухудшало рост и морфологию мини-кишечников, образующихся у здоровых индивидуумов (фиг. 3L). Добавление IGF-I к мини-кишечникам, полученным из здоровых индивидуумов, но культивируемых с высокой концентрацией глюкозы и сывороткой от индивидуумов с длительным T1D, восстанавливало морфологию мини-кишечников, в то время как IGFBP3 устранял положительный эффект IGF-I при добавлении к культуре мини-кишечников (фиг. 3L).

Примечательно, что использование сыворотки здоровых индивидуумов CTRL в культивировании крипт, полученных из индивидуумов с длительным T1D, почти восстанавливало развитие/морфологию мини-кишечников, что свидетельствует о том, что циркулирующие факторы и, в частности, пара IGF-I/IGFBP3, контролируют CoSC (фиг. 9C-D). Затем авторы настоящего изобретения генетически модулировали экспрессию TMEM219 с использованием миРНК *in vitro* в мини-кишечниках, полученных из здоровых индивидуумов. Нокдаун TMEM219 в мини-кишечниках препятствовал их способности расти и самообновляться, несмотря на добавление IGFBP3 и высокой концентрации глюкозы с сывороткой при длительном T1D (фиг. 3M). Одновременная блокада TMEM219 с помощью миРНК и IGF-IR с помощью блокирующего антитела не приводила к какому-либо дополнительному положительному воздействию на развитие мини-кишечников, несмотря на использование сыворотки здоровых индивидуумов или индивидуумов с длительным T1D (фиг. 9E).

Другие циркулирующие белки, по-видимому, измененные в протеоме сыворотки индивидуумов с длительным T1D, тестировали в анализе мини-кишечников *in vitro* и не наблюдали какого-либо достоверного эффекта в отношении роста мини-кишечников (фиг. 9F-G). Также тестировали C-пептид и инсулин, уровни которых, как правило, изменены при T1D, и которые могут противодействовать паре IGF-I/IGFBP3 посредством связывания с IGF-IR (фиг. 9H), и не наблюдали какого-либо эффекта.

Для дополнительного подтверждения того, что пара IGF-I/IGFBP3 эффективно направленно воздействует на CoSC, а не только на крипты, авторы настоящего изобретения тестировали его эффект в отношении полученных из отдельных клеток мини-кишечников. Авторы настоящего изобретения сортировали EphB2⁺ клетки из выделенных крипт посредством проточной цитометрии и устанавливали, что TMEM219 сильно экспрессировался на их поверхности (фиг. 4A). Затем авторы настоящего изобретения

культивировали EphB2⁺ клетки в анализе *in vitro* полученных из отдельных клеток мини-кишечников и подтверждали, что воздействие высокой концентрации глюкозы и сыворотки при длительном T1D, а также добавление IGFBP3 в значительной степени устраняют рост полученных из отдельных клеток мини-кишечников, таким образом, восстанавливая основные свойства, описанные в предыдущих исследованиях на полученных из крипт мини-кишечников (фиг. 4B, фиг. 10A1-A3). Кроме того, экспрессия каспазы 8 и 9 подвергалась положительной регуляции в обработанных IGFBP3 мини-кишечниках и мини-кишечниках, подвергнутых воздействию высокой концентрации глюкозы и сыворотки при длительном T1D, в то время как Ki67, маркер пролиферации, в значительной степени недостаточно экспрессировался (фиг. 10B-D).

Эффект пары IGF-I/IGFBP3 в отношении ранее известных путей, контролируемых CoSC.

Для прояснения эффектов пары IGF-I/IGFBP3 в отношении путей, которые, как известно, вовлечены в функционирование ниши CoSC (т.е. Wnt/Notch/BMP), авторы настоящего изобретения определяли экспрессию транскриптов нише-специфических генов с использованием профиля транскриптома стволовых клеток. IGF-I в значительной степени восстанавливает экспрессию некоторых факторов, ассоциированных с путями передачи сигнала Wnt/Notch, на мини-кишечниках, полученных из крипт T1D+ESRD (фиг. 10E, табл. III), в то время как IGFBP3 плохо влияет на экспрессию генов Wnt/Notch/BMP в мини-кишечниках, полученных из крипт здоровых индивидуумов или индивидуумов T1D+ESRD (фиг. 10F, табл. III).

Таблица III

Список положительно и отрицательно регулируемых генов-мишеней стволовых клеток, идентифицированных посредством транскриптомного профилирования в крипах толстого кишечника, полученных из CTRL и T1D+ESRD и культивируемых с/без IGFBP3 и IGF-I (по меньшей мере $p < 0,05$)

	Отрицательно регулируемые гены	Положительно регулируемые гены
CTRL+IGF-I vs. CTRL	CD44, CDH1, COL9A1	ACAN, COL2A1, DLL1, FGF2, FGF3, GDF3, GJA1, IGF-I, ISL1, MME, MSX1, NCAM1, NOTCH2, PDX1, SOX1, SOX2, h-TERT
CTRL+IGFBP3 vs. CTRL	CD8B, COL9A1, RBI, SOX1, h-TERT	ASCL2, COL2A1, DHH, DLL1, DTX1, DVL1, FGF3, FGF4, FOXA2, FRAT1, GDF2, HSPA9, IGF1, KAT2A, MSX1, MYC, NEUROG2, S100B, WNT1
T1D+ESRD+IGF-I vs. T1D+ESRD	ACTC1, CD3D, CD4, COL9A1, DTX1, FGFR1	ABCG2, ADAR, BMP1, BMP2, BTRC, CDC42, CTNNA1, CXCL12, DLL1, DTX2, GDF3, HDAC2, ISL1, JAG1, NOTCH1, NOTCH2, NUMB, PARD6A, PDX1, RBI, SIGMAR1, h-TERT
T1D+ESRD+IGFBP3 vs. T1D+ESRD	ABCG2, ALDH1A1, ALPI, CD3D, CD4, CD44, CD8A, CDC42, FGF2, FGFR1, JAG1, SIGMAR1, SOX1, TUBB	ASCL2, KAT2A, MYC, NCAM1, NEUROG2, SOX2

Сокращения: IGF-I, инсулиноподобный фактор роста 1; IGFBP3, связывающий белок инсулиноподобного фактора роста 3, CTRL, здоровые индивидуумы, T1D, диабет типа 1, ESRD, терминальная стадия почечной недостаточности.

Это подтверждает, что IGF-I предотвращает экспрессию некоторых генов, участвующих в передаче сигнала Wnt/Notch/BMP, а также то, что IGFBP3 независимо действует на CoSC без значительных изменений экспрессии ключевых генов-мишеней других ранее известных путей.

Эффект пары IGF/IGFBP3 в отношении апоптотических путей в CoSC.

Интенсивный анализ транскриптома, осуществленный для выяснения опосредованного каспазой эффекта IGFBP3 в отношении мини-кишечников (фиг. 4C-D, фиг. 10G-H, табл. IV), показал, что добавление IGFBP3 к мини-кишечникам, выращенным из крипт здоровых индивидуумов, ассоциировано со значительной положительной регуляцией активаторов каскада каспаз (каспазы 8 и 9) и проапоптотических генов, в то время как антиапоптотический ген Bcl2 подвергается отрицательной регуляции (фиг. 4C).

Список положительно и отрицательно регулируемых про/антиапоптотических генов-мишеней, идентифицированных посредством транскриптомного профилирования свежеевыделенных крипт толстого кишечника CTRL vs. T1D+ESRD и крипт, культивируемых с IGFBP3 и IGF-I (по меньшей мере $p < 0,05$)

	Отрицательно регулируемые гены	Положительно регулируемые гены
T1D+ESRD vs. CTRL	BCL2, NOL3, FAS	CASP1, CASP10, CASP14, CASP5, CASP6, CASP7, CASP8, CASP9, CD27, CRADD, FADD, FASLG, HRK, TNFRSF10A, TNFRSF10B, TNFRSF11B, TNFRSF1A, TNFRSF1B, TNFRSF25, TNFRSF9, TNFSF8, TRADD, TRAF3
CTRL+IGF-I vs. CTRL	BNIPL3	CASP14, CASP5, CD27, CRADD, FASLG, TNFRSF25, TNFSF8, TRADD
CTRL+IGFBP3 vs. CTRL	BAX, BCL2	CASP5, CASP8, CASP9, FAS, TNFRSF1B, TNFSF8, TRADD, TRAF3
T1D+ESRD+IGF-I vs. T1D+ESRD	CASP1, CASP10, CASP5, CASP6, CASP7, CASP8, CASP9, CRADD, FADD, TNFRSF11B, TNFRSF9, TNFSF8, TRADD, TRAF3	BCL2
T1D+ESRD+IGFBP3 vs. T1D+ESRD	BAX, BCL2, NOL3, TNFRSF1B	CASP9, CD27

Сокращения: IGF-I, инсулиноподобный фактор роста 1; IGFBP3, связывающий белок инсулиноподобного фактора роста 3, CTRL, здоровые индивидуумы, T1D, диабет типа 1, ESRD, терминальная стадия почечной недостаточности.

Примечательно, что антиапоптотические гены (Bcl2, Fas, Nol3) в значительной степени также недоэкспрессировались в мини-кишечниках, выращенных из крипт T1D+ESRD, по сравнению со здоровыми индивидуумами, в то время как большинство генов, связанных с каспазами (каспаза 1, 5, 7, 8, 9, 14), гиперэкспрессировались (фиг. 10G). Кроме того, экспрессия генов, вовлеченных в другие проапоптотические пути, не изменялась (т.е. Fas-лиганд, FADD, ФНО) или ингибировалась (TRADD) в мини-кишечниках T1D+ESRD. Противоположный эффект наблюдали при добавлении IGF-I (фиг. 4D, фиг. 10H). Отсутствие изменений экспрессии генов-мишеней оксидативного стресса (табл. V) и любого эффекта факторов оксидативного стресса (фиг. 10I-J) подтверждало основной связанный с апоптозом, опосредованный каспазами механизм IGFBP3, посредством которого циркулирующий IGFBP3 напрямую контролирует CoSC (фиг. 4E).

Список положительно и отрицательно регулируемых генов-мишеней оксидативного стресса, идентифицированных посредством транскриптомного профилирования в свежесыведенных криптах толстого кишечника CTRL vs. T1D+ESRD и в криптах, культивируемых в IGFBP3 и IGF-I (по меньшей мере $p < 0,05$)

	Отрицательно регулируемые гены	Положительно регулируемые гены
T1D+ESRD vs. CTRL	DUOX1, PRDX4, STK25, GSS	CYBB, GPX5, KRT1, MT3, NOX4, OXR1, PTGS1, SFTPD
CTRL+IGF-I vs. CTRL	DUOX1, TXNRD	AOX1, FTH1, GPX7, GSS, KRT1, LPO, MPO, NCF1, NOS2, NOX4, OXR1, PTGS1, PTGS2, SCARA3, SFTPD, TPO, TTN
CTRL+IGFBP3 vs. CTRL	NCF1, SOD3	AOX1, GPX5, GPX7, HSPA1A, KRT1, MB, MPO, NOX5, OXR1, PTGS1, SFTPD, TPO, TTN, TXNRD2, UCP2
T1D+ESRD+IGF-I vs. T1D+ESRD	DUOX1, EPHX2, MB, MT3, NCF1, OXR1, PTGS1, SOD3, SRXN1	MPO, PDRX4, PRNP, STK25
T1D+ESRD+IGFBP3 vs. T1D+ESRD	CYBB, DUOX1, EPHX2, GPX3, GSTP1, HSPA1A, MGST3, NCF1, NQO1, PDRX6, RNF7, TXN	NOS2, STK25

Сокращения: IGF-I, инсулиноподобный фактор роста 1; IGFBP3, связывающий белок инсулиноподобного фактора роста 3, CTRL, здоровые индивидуумы, T1D, диабет типа 1, ESRD, терминальная стадия почечной недостаточности.

Манипуляции с осью циркулирующее пары IGF-I/IGFBP3 изменяет течение диабетической энтеропатии в доклинической модели.

Для дальнейшей демонстрации важности циркулирующих факторов IGF-I/IGFBP3 *in vivo* авторы настоящего изобретения тестировали эффекты введение IGF-I и IGFBP3 в доклинической модели DE. Через 8 недель химически индуцированного диабета (с использованием стрептозотоцина [STZ]), C57BL/6 (B6) у мышей наблюдали сниженное количество крипт в колоректальной ткани (фиг. 4F), демонстрирующих повышенную глубину и ширину в более чем 70% случаев (фиг. 4G, H1-H2, I), и сниженное количество Aldh⁺ клеток (фиг. 4J, K1-K2). Примечательно, что у этих мышей наблюдали повышенные уровни IGFBP3 в сыворотке и низкие уровни IGF-I при более низких уровнях инсулина по сравнению с наивными мышами B6 (фиг. 11A-C). Интраперитонеальное (i.p.) введение IGFBP3 наивным мышам B6 приводило к снижению локального количества крипт (фиг. 4F, H3), при этом у большинства крипт наблюдали повышенную глубину и ширину (фиг. 4G, H3, I) и значительное снижение Aldh⁺ клеток по сравнению с мышами, которым не осуществляли введение (фиг. 4J, K3). Эти признаки ухудшались при введении IGFBP3 мышам B6, которым вводили STZ (фиг. 11D-G, H1-H2), с признаками снижения массы (фиг. 11J), потери CoSC (фиг. 11J-L) и положительно регулируемой экспрессией каспазы 8 и 9 (фиг. 11M-N). Введение i.p IGF-I мышам B6, которым вводили STZ, лишь частично улучшало морфологию слизистой оболочки с повышением количества нормальных крипт, остающегося аномальным (фиг. 11D), и лишь частично восстанавливало количество Aldh⁺ клеток (фиг. 11G, H1-H2).

Лечение длительного T1D с использованием одновременной трансплантации поджелудочной железы и почки (SPK) реверсирует клинические и морфологические признаки DE.

Золотым стандартом лечения длительного T1D является SPK, которая может обеспечивать стабильный гликометаболический контроль, почти нормализовать факторы риска и пролонгировать выживание (табл. VI) (Fiorina et al., 2004; Fiorina et al., 2005; Folli et al., 2010; Secchi et al., 1998; Smets et al., 1999).

Таблица VI

Восстановление нормогликемии и нормальной функции почек при SPK ассоциировано со стабильным метаболизмом глюкозы/липидов и контролем артериального давления с течением времени до 8 лет последующего наблюдения по сравнению с K+T1D (представлены данные через 8 лет последующего наблюдения)

Параметры	T1D+ESRD (n=60)	SPK (n=30)	K+T1D (n=30)	Значение p
eGFR (мл/мин/1,73 мм ²)	<15	65,6±20,2*	61,8±25,2	*, <0,0001
HbA1c (%)	8,4±1,5	5,4±0,3*	7,5±1,4	*<0,0001; <0,001
EIR (МЕ)	37,4±2,3	0*	26,0±7,0	*<0,0001; <0,001
TG (мг/дл)	162,5±92,7	90,4±23,0*	147,1±98,0	*0,01; 0,04
Chol (мг/дл)	201,0±45,7	185±27,2	191,1±41,1	Не значимо
LDL (мг/дл)	116,3±40,3	119,5±34,0	97,8±2,1	Не значимо
HDL (мг/дл)	48,1±14,4	51,4±4,1	43,13±5,7	Не значимо
Систолическое давление	146,3±18,7	133,1±14,2*	140,1±15,7	*0,03; 0,04
Диастолическое давление	83,7±8,3	79,1±9,2	78,3±9,2	Не значимо

Сокращения: T1D, диабет типа 1; ESRD, терминальная стадия почечной недостаточности; SPK, одномоментная трансплантация почки и поджелудочной железы; K+T1D, трансплантация только почки при диабете типа 1; eGFR, расчетный уровень клубочковой фильтрации; HbA1c, гликированный гемоглобин; EIR, требования по экзогенному инсулину; TG, триглицериды; Chol, общий холестерин; LDL, липопротеины низкой плотности; HDL, липопротеины высокой плотности; BP, артериальное давление; UI, международные единицы.

Однако индивидуумов с T1D+ESRD также лечили с использованием трансплантации только почки, но у них сохранялся диабет (K+T1D) (Fiorina et al., 2001). Значительное улучшение желудочно-кишечных симптомов наблюдали с течением времени после SPK в определенной авторами настоящего изобретения когорте индивидуумов, которым проводили трансплантацию, в то время как в группе K+T1D не наблюдали какого-либо благоприятного эффекта (фиг. 12A-C), что позволяет предполагать, что DE является обратимым.

Лечение длительного T1D с использованием SPK восстанавливает морфологию слизистой оболочки кишечника и локальные свойства самоподдержания.

При анализе образцов слизистой оболочки кишечника наблюдали значительное восстановление структуры эпителиального компартмента с компенсаторной эпителиальной гиперплазией в группе SPK (фиг. 12: D1-D2). Восстановление нормальной гистологии и количества крипт наблюдали в группе SPK при удачном лечении длительного T1D, в то время как ни один из этих признаков не наблюдали у индивидуумов, которым проводили трансплантацию только почки и сохранивших диабет (фиг. 12D1-D2). Пролиферация эпителиальных клеток (MIB1⁺ клеток) повышалась после SPK с течением времени по сравнению с исходным уровнем и K+T1D в каждый момент времени (фиг. 4L, M1-M2) почти с нормализацией морфологии кишечника, обновления эпителия и свойств нейронов (фиг. 12E1-E2, F, G1-G2, H-I, J1-J2, K). Это свидетельствует о том, что лечение длительного T1D с использованием SPK стимулирует восстановление репарации эпителия кишечника и свойств самовосстановления.

Лечение длительного T1D стимулирует восстановление CoSC.

Лечение длительного T1D с использованием SPK ассоциировано с повышением Aldh⁺ клеток (фиг. 4N, O1-O2) и экспрессии EphB2⁺ в кишечной крипте (фиг. 4P, Q1-Q2) и почти нормализует процент EphB2^{hi+}, EphB2^{hi+}hTERT⁺ и EphB2^{hi+}LGR5⁺ клеток в выделенных кишечных криптах по сравнению с исходным уровнем (фиг. 5A-C). Экспрессия маркеров CoSC (фиг. 5D-G) и рост/морфология мини-кишечников, полученных из индивидуумов после SPK, также почти нормализовалась (фиг. 5H, фиг. 13A1-A6). При анализе транскриптома выявляли, что SPK почти восстанавливает экспрессию маркеров стволовых клеток и CoSC и пути, вовлеченные в сохранение CoSC (фиг. 5I, фиг. 13B, табл. VII).

Список положительно и отрицательно регулируемых генов-мишеней стволовых клеток, идентифицированных с помощью транскриптомного профилирования в свежeweделенных криптах толстого кишечника в группе SPK по сравнению с T1D+ESRD (по меньшей мере $p < 0,05$)

Отрицательно регулируемые гены	Положительно регулируемые гены		
DVL1	ACTC1	APC	CCND2
WNT1	BTRC	SOX1	SOX2
	ACAN	COL1A1	COL2A1
	BMP3		
	CCNE1	CDK1	
	CXCL2		
	CD8B	MME	
	DLL3	HDAC2	JAG1
	DTX2		
	FGF2		
	GDF3	ISL1	MSX1
	MYO1		
	GJA1		
	RB1	h-TERT	
	NCA1	SIGMAR1	
	PDX1	DHH	BGLA P

Сокращения: EGF, фактор роста эпителия; FGF, фактор роста фибробластов, BMP, морфогенетический белок кости.

Был сделан вывод о том, что лечение длительного T1D с использованием SPK стимулирует восстановление CoSC.

Лечение длительного T1D с использованием SPK восстанавливает циркулирующий IGF-I и IGFBP3.

При обширном протеомном анализе и направленном иммунологическом анализе выявляли почти нормализацию уровней IGFBP3 и IGF-I в сыворотке после SPK (фиг. 5J-K), ассоциированную с почти восстановленной экспрессией IGF-IR (фиг. 13C). Эти результаты не были очевидны в группе K+T1D, где наблюдали низкие уровни IGF-I (фиг. 5J) и экспрессию IGF-IR (фиг. 13C) и лишь частичное восстановление их профиля IGFBP (фиг. 13D). Значимая корреляция между уровнями IGFBP3 в сыворотке и кишечными симптомами в группах SPK и K+T1D, но более очевидная в последней из них, подтверждала, что восстановление уровней IGFBP3 ассоциировано с улучшением диабетической энтеропатии (фиг. 5L-M, фиг. 14A-G). Лечение длительного T1D с использованием SPK улучшает диабетическую энтеропатию посредством ассоциированного с глюкозой восстановления циркулирующей пары IGF-I/IGFBP3.

Рекомбинантный белок ecto-TMEM219 отменяет опосредованную IGFBP3 деструкцию мини-кишечников *in vitro* и сохраняет CoSC *in vivo* в модели DE мыши.

Для дальнейшей демонстрации опосредованных IGFBP3 вредоносных эффектов в отношении CoSC авторы настоящего изобретения получали рекомбинантный белок на основе внеклеточного домена TMEM219 (ecto-TMEM219). Добавление ecto-TMEM219 (молярное соотношение 2:1 с IGFBP3) к криптам, полученным из CTRL и культивируемым с IGFBP3, отменяет проапоптотический эффект IGFBP3 в отношении мини-кишечников и сохраняет регенеративные свойства крипт для получения мини-кишечников (фиг. 6A). Экспрессия характерных маркеров CoSC, EphB2 и LGR5, в значительной степени восстанавливалась в мини-кишечниках, культивируемых с IGFBP3 и ecto-TMEM219, что подчеркивает благоприятный эффект в сохранении CoSC (фиг. 6B), что также подтверждали с использованием мини-кишечников, культивируемых с высокой концентрацией глюкозы (фиг. 6A). Кроме того, при анализе каспазы 8 и 9 посредством RT-ПЦР выявляли совокупное снижение их экспрессии при добавлении ecto-TMEM219 в культивируемых с IGFBP3 мини-кишечниках по сравнению с IGFBP3 в отдельности (фиг. 6C-D). Затем авторы настоящего изобретения вводили мышам STZ-B6 ecto-TMEM219 и наблюдали улучшенную морфологию слизистой оболочки с восстановленным количеством, глубиной и шириной крипт (фиг. 6E, F, G). Введение ecto-TMEM219 ассоциировано с повышением массы тела мышей по сравнению с мышами B6, которым вводили STZ (фиг. 6H), со значительным восстановлением CoSC (фиг. 6I-K), сниженной экспрессией каспазы 8 и 9 (фиг. 6L-M) и восстановлением уровней циркулирующего IGFBP3 (фиг. 6N).

Обсуждение.

Диабетическая энтеропатия представляет собой клинически значимое осложнение у индивидуумов с T1D, т.к. оно ассоциировано с более низким качеством жизни, недостаточным питанием и мальабсорбцией (Bytzer et al., 2002; Faraj et al., 2007; Talley et al., 2001). В частности, у индивидуумов с длительным T1D (T1D+ESRD) кишечные нарушения развиваются с высокой частотой и тяжестью (Cano et al., 2007; Wu et al., 2004), что приводит к потере массы тела и кахексии (Purim et al., 2005), что свидетельствует о том, что энтеропатия является важным осложнением длительного T1D (Atkinson et al., 2013; Pambianco et al., 2006). Результаты, полученные авторами настоящего изобретения, свидетельствуют о том, что индивидуумы с длительным T1D страдают тяжелыми кишечными нарушениями (табл. VIII), и что эти клинические состояния ассоциированы с изменениями слизистой оболочки кишечника, сниженной пролиферацией эпителиальных клеток кишечника и признаками дегенерации нейронов.

Таблица VIII

Обзор результатов оценки диабетической энтеропатии у индивидуумов T1D+ESRD по сравнению с CTRL и SPK

Результаты		T1D+ESR D vs. CTRL	SPK vs. T1D+ESR D
Метаболическая оценка	Метаболизм глюкозы	---	+++
	Метаболизм липидов	--	+
	Контроль артериального давления	--	+
Кишечные симптомы	Диарея	---	+++
	Боль в области живота	---	+++
	Запор	---	++
Аноректальная манометрия	Тонус в покое	=	=
	Тонус сокращения	-	=
	Рефлекторная реакция	-	=
	Объем неотложного позыва	-	++
Обновление эпителия слизистой оболочки	Пролиферация	---	+++
	Дифференцировка	---	+++
Регенерация нейронов	Нервы	---	+++
	Шванновские клетки	---	+++
Круговорот стволовых клеток толстого кишечника	Стволовые клетки толстого кишечника	---	+++
	Рост крипт	---	+++

Относительные единицы: +++ (сильное улучшение); ++ (умеренное улучшение); + (небольшое улучшение); = отсутствие улучшения; --- (тяжелое ухудшение); -- (умеренное ухудшение); - (небольшое ухудшение). Оценки осуществляли следующим образом: T1D+ESRD vs. CTRL, SKP vs. T1D+ESRD, K+T1D vs. SKP. Сокращения; T1D, диабет типа 1; ESRD, терминальная стадия почечной недостаточности; CTRL, здоровые индивидуумы; SPK, одновременная трансплантация почки и поджелудочной железы. Схожие признаки также описаны в моделях T1D и DE на грызунах (Domenech et al., 2011). Данные, впервые полученные авторами настоящего изобретения, позволяют связывать DE с дефектом CoSC и включают IGFBP3 в качестве фактора, играющего важную роль в поддержании гомеостаза эпителия кишечника. Хотя гипергликемия является важным признаком T1D, исследования *in vitro* авторов настоящего изобретения позволяют предполагать, что с помощью этого признака нельзя полностью объяснить DE, и что циркулирующие факторы могут играть важную роль. С помощью протеомного анализа идентифицировали IGF-I как энтеротропный фактор, участвующий в гомеостазе CoSC. Затем авторы настоящего изобретения подтверждали, что IGF-I и IGFBP3 контролируют CoSC, и что эта ось дисфункциональна при длительном T1D. Данные, полученные авторами настоящего изобретения, свидетельствуют о том, что IGF-I действует в качестве циркулирующего энтеротропного фактора, стимулирующего рост крипт и контролирующего CoSC с помощью IGF-IR, в то время как IGFBP3 может блокировать передачу сигнала IGF-I посредством связывания циркулирующего IGF-I и снижения его биодоступности. Кроме того и наиболее важно, авторы настоящего изобретения показали, что IGFBP3 с помощью проапоптотического IGF-I-независимого механизма действует на CoSC, которые, как показали авторы настоящего изобретения, экспрессируют TMEM219 (рецептор IGFBP3), таким образом, способствуя невозможности роста мини-кишечников. Этот последний эффект опосредован каспазой 8 и 9 и зависит от TMEM219; фактиче-

ски, отсутствие рецептора IGFBP3 (TMEM219) на CoSC значительно снижает ассоциированные с высокой концентрацией глюкозы повреждения CoSC. T1D вместе с голоданием и кахексией отличаются низкими уровнями циркулирующего IGF-I (Bondy et al., 1994; Giustina et al., 2014) по причине сниженного высвобождения IGF-I в печени, контролируемого и стимулированного эндогенным инсулином (Le Roith, 1997; Sridhar and Goodwin, 2009). Более важно, что гипергликемия, по-видимому, обладает прямым эффектом в отношении синтеза и высвобождения IGFBP3 в печени. Таким образом, IGFBP3 может действовать в качестве печеночного гормона, снижающего абсорбционную способность кишечника при гипергликемии. Примечательно, что SPK обеспечила доказательство концепции для гипотезы авторов настоящего изобретения и подтверждает их данные, касающиеся существования циркулирующих факторов, контролирующих CoSC. Выраженное улучшение клинических и функциональных признаков DE, наблюдаемых авторами настоящего изобретения в их исследовании, ассоциировано с пополнением CoSC и восстановлением циркулирующего IGF-I и IGFBP3, что подтверждает гипотезу авторов настоящего изобретения. В конечном итоге недавно полученный рекомбинантный белок ecto-TMEM219 улучшал DE у мышей с диабетом *in vivo* и восстанавливал способность мини-кишечников нормально расти *in vitro*, что, таким образом, подтверждает роль IGFBP3 в контроле CoSC и подготавливает почву для новой потенциальной терапевтической стратегии. В целом, исследование авторов настоящего изобретения показывает, что опосредованное IGFBP3 разрушение CoSC, связанное с гипергликемией, очевидно при DE. Авторы настоящего изобретения предполагают, что циркулирующий IGF-I/IGFBP3 представляет собой гормональную пару, контролирующую CoSC, и новую терапевтическую мишень для индивидуумов с кишечными нарушениями, в частности, вызванными длительным сахарным диабетом (Bondy et al., 1994; Bortvedt and Lund, 2012; Boucher et al., 2010).

Пример 2.

Материалы и способы.

Пациенты и дизайн исследования.

В исследование включали 60 индивидуумов с T1D+ESRD, зарегистрированных в листе ожидания для одновременной трансплантации поджелудочной железы и почки (SPK), совпадающих по возрасту (от 41 до 43 лет), полу и длительности T1D (29,4±1,8 лет). Также включали 20 индивидуумов с диабетом типа 1 (T1D) от 10 до 20 лет. Также исследовали 20 здоровых индивидуумов, совпадающих по возрасту и полу (CTRL), с нормальной функцией почек и нормальными гликометаболическими параметрами. Всех индивидуумов T1D+ESRD подвергали интенсивному лечению инсулином на момент включения в исследование, в то время как группе CTRL не вводили какое-либо лекарственное средство. Всем индивидуумам T1D+ESRD проводили одинаковое лечение в виде терапии антиагрегантами (ASA) и антигипертензивными средствами (ингибиторами ангиотензинпревращающего фермента, в то же время 40 из 60 вводили статины на момент включения в исследование. Не включали индивидуумов с четкими признаками воспалительных заболеваний кишечника, а также целиакии.

Индивидуумов T1D+ESRD наблюдали в течение до 8 лет (средний период последующего наблюдения: 8,6±1,1 лет) после проведения трансплантации SPK (n=30) или K+T1D (n=30) в соответствии с макроскопической хирургической оценкой на момент трансплантации. Не включали индивидуумов, которым вводили пероральные антикоагулянты. Все из индивидуумов SPK являлись инсулиннезависимыми в течение всего периода последующего наблюдения, в то время как индивидуумам K+T1D проводили интенсивную подкожную терапию инсулином. От всех индивидуумов получали информированное согласие перед включением в исследование. Исследования, не включенные в рутинное клиническое последующее наблюдение, разрешены с соответствующим одобрением экспертного совета (Enteropatia-trapianto/01 Secchi/Fiorina).

Оценка IGFBP3 в моче и сыворотке.

Сыворотку получали из 3 мл свежей крови после центрифугирования. Образцы мочи собирали свежими, центрифугировали и хранили при -80°C. Уровни IGFBP3 во всех группах индивидуумов оценивали в замороженных образцах сыворотки и мочи с использованием коммерчески доступных наборов для ELISA по инструкциям производителя (R&D).

Статистический анализ.

Корреляционный анализ и построение графиков осуществляли с использованием программного обеспечения GraphPad Prism. Корреляционный анализ включал оценку уровней IGFBP3 в сыворотке по сравнению с мочой исследуемых индивидуумов, уровни IGFBP3 в сыворотке по сравнению с расчетным уровнем клубочковой фильтрации (eGFR). Статистическую значимость определяли при значении $p < 0,05$.

Измерение функции почек и гликометаболических параметров.

Формулу MDRD использовали для оценки расчетного уровня клубочковой фильтрации (eGFR) в мл/мин/м². Анализы крови включали оценку креатинина, глюкозы крови, гликированного гемоглобина у всех индивидуумов, включенных в исследование, фокусируясь на сравнении CTRL с индивидуумами с T1D и индивидуумами с длительным T1D (T1D+ESRD).

Результаты.

Уровни IGFBP3 в сыворотке коррелируют с уровнями IGFBP3 в моче.

При анализе уровней IGFBP3 в сыворотке и моче всех индивидуумов, включенных в исследование,

определяли значимое повышение уровней IGFBP3 в сыворотке (фиг. 7А) и моче (фиг. 7В) у индивидуумов T1D+ESRD по сравнению с CTRL и, в меньшей степени, индивидуумов с T1D. Значимую корреляцию между уровнями IGFBP3 в моче и уровнями IGFBP3 в сыворотке наблюдали у всех оцениваемых индивидуумов (фиг. 7С). Более высокие уровни IGFBP3 в сыворотке коррелируют с более высокими уровнями IGFBP3 в моче. Для исключения того, что это может быть связано с функцией почек, осуществляли анализ корреляции между уровнями IGFBP3 в сыворотке и функцией почек (eGFR). Уровни IGFBP3 в сыворотке были значимо выше у индивидуумов с ESRD (eGFR<15 мл/мин/м²) (фиг. 7D). Однако у индивидуумов с eGFR>15 мл/мин/м², таким образом, не страдающих ESRD, независимо от наличия и анамнеза T1D, не наблюдали какой-либо статистически значимой корреляции между eGFR и уровнями IGFBP3 в сыворотке (фиг. 7E). Учитывая корреляцию между уровнями IGFBP3 в моче и сыворотке у CTRL и сравнивая их средние значения и медианы в 25-й и 75-й процентилях, авторы настоящего изобретения могли устанавливать диапазон для IGFBP3 в моче следующим образом:

<350 пг/мл: нормальные уровни (уровни, наблюдаемые у здоровых индивидуумов),

350-500 пг/мл: измененные уровни (уровни, наблюдаемые при T1D с анамнезом заболевания <5 лет),

>500 пг/мл: показательный для энтеропатии (уровни, наблюдаемые при длительном T1D, у индивидуумов с T1D с другими осложнениями T1D, анамнезом T1D >5 лет).

Авторы настоящего изобретения также могли идентифицировать нормальный диапазон уровней IGFBP3 в моче (<350 пг/мл), учитывая их корреляцию с уровнями IGFBP3 в сыворотке, как указано на серой области на фиг. 7F.

Пример 3.

Включали пять индивидуумов с длительным воспалительным заболеванием кишечника (IBD) и подвергали их скринингу на периферические уровни IGFBP3, IGF-1 и соотношение IGFBP-3/IGF-1 способом, описанным выше, для анализа образцов больных диабетом.

Обнаруживали, что хотя IGFBP3 немного повышался, уровни IGF1 значительно снижались с общим изменением соотношения IGFBP3/IGF1 (фиг. 18). Таким образом при воспалительном заболевании кишечника большое количество IGFBP3 является свободным и доступным для осуществления своего токсического эффекта в отношении стволовых клеток кишечника.

Таким образом, ингибитор IGFBP3 также полезен для лечения и/или профилактики воспалительных заболеваний кишечника.

Пример 4.

Материалы и способы.

Пациенты и дизайн исследования.

Шестьдесят образцов сыворотки индивидуумов с диабетом типа 1 (T1D), длительным T1D (>15 лет) (длительный T1D) и здоровых добровольцев (CTRL), совпадающих по возрасту и полу, получали из коллекции крови San Raffaele Hospital. Двадцать образцов сыворотки индивидуумов, положительных по результатам скрининга на аутоантитела против островков, собирали в партнерском центре в Gainesville (Florida). 235, 200 и 81 образцов сыворотки индивидуумов с нормальной толерантностью к глюкозе (NGT), нарушенной толерантностью к глюкозе (IGT) и индивидуумов с диабетом типа 2 (T2D) собирали в University of Pisa (Italy) в рамках исследования Genfiev. NGT, IGT, и T2D определяли на основе результатов теста OGTT в соответствии с критериями ADA 2003 г.

Индивидуумов с T1D и с длительным T1D подвергали интенсивному лечению инсулином на момент включения в исследование, в то время как группе CTRL не вводили какое-либо терапевтическое средство. Всем индивидуумам T1D+ESRD проводили одинаковое лечение в виде терапии антиагрегантами (ASA) и антигипертензивными средствами (ингибиторами ангиотензинпревращающего фермента). Одновременное лечение, критерии включения и исключения уже описаны (Diabetes Care 2015) и приведены на следующем веб-сайте <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/record/NCT00879801?term=GENF IEV>.

От всех индивидуумов получали информированное согласие перед включением в исследование. Исследования, не включенные в рутинное клиническое последующее наблюдение, разрешены с соответствующим одобрением экспертного совета (Enteropatia-trapianto/01 Secchi/Fiorina).

Панкреатические островки.

Островки человека, используемые в этом исследовании, выделяли из доноров трупных органов уже описанным способом (Petrelli et al., 2011) в соответствии с этическими требованиями, одобренными Niguarda Ca Granda Ethics Board. В кратком изложении островки выделяли уже описанным автоматизированным способом (D'Addio et al., 2014). Использовали два типа ферментов: коллагеназу типа P (1-3 мг/мл) и либеразу (0,5-1,4 мг/мл) (Roche, Indianapolis, IN, USA). Островки очищали с помощью ступенчатого градиента в шприцах (градиент плотности: 1,108; 1,096; 1,037: Euroficoll (Sigma-Aldrich, Milan, Italy) или непрерывного градиента с использованием процессора COBE с охлаждением, как описано выше (Nano et al., 2005). После выделения островки культивировали при 22°C во влажной камере (5% CO₂) в среде M199 (Euroclone, Celbio, Milan, Italy) или CMRL (Mediatech, Cellgro, VA, USA), дополненной 10% FCS, 100 Ед./мл пенициллина, 100 мкг/мл сульфата стрептомицина (Euroclone, Celbio) и 2 ммоль/л глутамина (Mediatech, Cellgro, VA, USA). Характеризацию *in vitro* и культивирование островков осуществ-

ляли с использованием материала островков, обработанных в пределах 72 ч после выделения. Островки культивировали в CMRL с 10% FCS, дополненной 100 мкг/мл сульфата стрептомицина (Euroclone, Celbio) и 2 ммоль/л глутамин (Mediatech, Cellgro, VA, USA), с концентрацией глюкозы 5 мМ в течение 4 дней. Островки мыши были любезно предоставлены проф. James Markmann (Transplantation Unit, Department of Surgery, Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School, Boston) (Ben Nasr et al., 2015b; Vergani et al., 2010). Панкреатические островки выделяли из мышц C57B16/J посредством расщепления коллагеназой с последующим разделением в градиенте плотности, а затем сбора вручную, как описано ранее (Forbes et al., 2010). Затем островки помещали и культивировали в среде RPMI 1640, дополненной L-глутамином, пенициллином и 10%, как описано ранее, с концентрацией глюкозы 5 мМ в течение 4 дней.

Линии β -клеток.

Клетки β TC3 и α TC1 мыши были любезно предоставлены Carla Perego, University of Milan с разрешения проф. Douglas Hanahan (Department of Biochemistry and Biophysics, University of California, San Francisco, CA) (Di Cairano et al., 2011). β TC3 культивировали в среде RPMI 1640 (Sigma), содержащей 0,1 мМ глутаминовой кислоты и дополненной 0,7 мМ глутамин, как описано ранее (Di Cairano et al., 2011). Концентрация глюкозы для линии клеток составляла 11 мМ.

Патологическое исследование и иммуногистохимия.

Образцы фиксировали в забуференном формалине (формальдегид 4% мас./об. и ацетатный буфер 0,05M) и общепринятым образом заливали парафиновым воском. Срезы толщиной 3 мкм для каждого включенного пациента окрашивали гематоксилином и эозином (H&E) для морфологической оценки. В случае иммуногистохимии срезы толщиной 3 мкм помещали на покрытые поли-L-лизином стекла, депарафинизировали и гидратировали спиртами повышающейся концентрации и водой. После демаскирования антигена, осуществляемого посредством погружения срезов в 0,01M цитратный буфер, pH 6, в течение 10 мин в микроволновой печи при 650 Вт, а также ингибирования активности эндогенной пероксидазы, осуществляемого посредством погружения срезов в 3% пероксид водорода в течение 10 мин, осуществляли инкубацию с первичными антителами при 4°C в течение 18-20 ч с последующим получением авидин-биотиновых комплексов. Имунные реакции проявляли с использованием 0,03% 3,3'-диаминобензидинтетрагидрохлорида, а затем срезы докрашивали гематоксилином Гарриса. Использовали следующие антитела: против инсулина (Dako, A0564), первичное антитело против IGFBP3 (поликлональное, разведение 1:50, Sigma Aldrich HP AO 13357) и первичное антитело против TМЕМ219 (поликлональное, 1:100, Sigma HPA059185). Эти антитела иммуногистохимически тестировали на тканях поджелудочной железы здоровых индивидуумов, мышей B6 и NOD и биоптатах печени пациентов с T1D/T2D, пациентов с трансплантированными островками, у которых не развилась независимость от инсулина. Ткани без признаков патологии использовали в качестве контролей. Все эти образцы ткани получали из архива отделения патологии Department of Biomedical, Biotechnological, and Translational Sciences, University of Parma, Parma, Italy. Интенсивность иммуноокрашивания классифицировали как 1 (слабая), 2 (умеренная) и 3 (сильная), в то время как его диффузию как 1 (фокальная), 2 (зональная) и 3 (диффузная).

Имунофлуоресценция.

Образцы для иммунофлуоресцентного анализа исследовали с использованием конфокальной системы (Leica TCS SP2 Laser Scanning Confocal). Изображения получали в многоканальном режиме с использованием последовательных и независимых оптических путей. Для окрашивания тканей/клеток человека использовали следующие первичные антитела: моноклональное антитело мыши против продукта расщепления цитокератина 18 каспазой M30 (клон M30, Hoffmann-LaRoche, Basel, Switzerland), поликлональное антитело кролика против IGFBP3 (1:250, Sigma, HPA013357), поликлональное антитело кролика против TМЕМ219 (1:250, Sigma, HPA059185) и поликлональное антитело морской свинки против инсулина (1:50, DAKO, A0564). Для окрашивания тканей/клеток мыши использовали следующие первичные антитела: поликлональное антитело кролика против IGFBP3 (1:250, Sigma, SAB4501527), поликлональное антитело козы против TМЕМ219 (1:50, Santa Cruz, 244405), поликлональное антитело морской свинки против инсулина (1:50, DAKO, A0564). Для окрашивания тканей/клеток человека использовали следующие вторичные антитела: антитело осла против кролика с FITC (Jackson) и антитело осла против морской свинки с TRITC (Jackson). Для окрашивания тканей/клеток мыши использовали следующее антитело: антитело осла против козы FITC (Jackson).

Панкреатические островки человека и мыши сокультивировали с/без IGFBP3 (Life Technologies, 10430H07H5), с/без ecto-TМЕМ219 (полученного авторами настоящего изобретения в сотрудничестве с Genscript, 130 нг/мл), с/без высокой концентрации глюкозы (20 мМ глюкоза), с/без ИФН γ и ИЛ-1 β (R&D Systems, Minneapolis, MN 201-LB-005, 2 нг/мл и PeProTech, 300-02, 1000 Ед./мл), окрашивали с использованием TМЕМ219, инсулина и M30 в случае иммунофлуоресценции для исследований колокализации. Бета-клетки мыши сокультивировали в тех же условиях, что и панкреатические островки, фиксировали в 10% нейтральном буфере в течение 30 мин, три раза промывали PBS и пермеабилizовали с использованием PBS с 2% BSA и 0,3% Triton X100 в течение 20 мин, блокировали с использованием сыворотки 10%

и, наконец, инкубировали с использованием первичных антител в течение ночи при 4°C, а затем метили флуоресцентными вторичными антителами в течение 2 ч при комнатной температуре. Первичные и вторичные антитела выбирали, как описано выше.

Исследования и характеристика *in vitro* островков и β -клеток.

Условия культивирования.

Островки человека и мыши культивировали с различными концентрациями глюкозы (5 мМ, 20 мМ, Sigma), с/без воспалительными стимулами/смесью (ИФН γ +ИЛ-1 β , 2 нг/мл R&D Systems и 1000 Ед./мл Peprotech соответственно), с/без IGFBP3 (Life Technologies, 50 нг/мл), с/без ecto-TMEM219 (130 нг/мл, см. Рекомбинантные белки и интервенционные исследования) и островки собирали для иммуофлуоресцентных исследований, выделения РНК, определения апоптоза и анализа белков. Супернатанты собирали для оценки секреции инсулина, IGFBP3 и IGF-I.

β -ТС культивировали, как описано выше, с/без смеси воспалительных стимулов (ИФН γ +ИЛ-1 β), с/без IGFBP3, с/без ecto-TMEM219 (см. Рекомбинантные белки и интервенционные исследования) и собирали клетки для исследований островков.

Иммуоблоттинг.

Все белки биоплатов кишечника выделяли в буфер Лэммли (Трис-НСI 62,5 ммоль/л, рН 6,8, 20% глицерина, 2% SDS, 5% β -меркаптоэтанола) и измеряли их концентрацию. 35 мг всего белка подвергали электрофорезу на 7% гелях для SDS-PAGE и блоттингу на нитроцеллюлозе (Schleicher & Schuell, Dassel, Germany). Затем блоты окрашивали понсо S. Мембраны блокировали в течение 1 ч в TBS (Трис [10 ммоль/л], NaCl [150 ммоль/л]), 0,1% Tween-20, 5% обезжиренного сухого молока, рН 7,4, при 25°C, инкубировали в течение 12 ч с поликлональным антителом кролика против IGFBP3 (Sigma, HPA013357), разведенным 1:250, или поликлональным антителом козы против TMEM219 (Santa Cruz Biotechnology, 244404 или 244405), разведенным 1:200, или моноклональным антителом мыши против β -актина (Santa Cruz Biotechnology), разведенным 1:500 в TBS с 5% молока при 4°C, промывали четыре раза TBS-0,1% Tween-20, затем инкубировали с меченым пероксидазой вторичным антителом мыши против IgG кролика (DAKO) (в случае IGFBP3), или антителом кролика против козы (в случае TMEM219), или антителом кролика против мыши в случае β -актина, разведенным 1:1000 (Santa Cruz Biotechnology) в TBS с 5% молока, и, наконец, промывали TBS-0,1% Tween-20. Полученные полосы визуализировали с использованием усиленной хемилюминесценции (SuperSignal; Pierce, Rockford, IL, USA). Анализ qRT-ПЦР РНК из очищенных кишечных крипт выделяли с использованием тризолового реагента (Invitrogen) и анализ qRT-ПЦР осуществляли с использованием анализов TaqMan (Life Technologies, Grand Island, NY) по инструкциям производителя. Нормализованные значения экспрессии определяли с использованием способа $\Delta\Delta C_t$. Данные количественной полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (qRT-ПЦР) нормализовали по экспрессии ACTB и вычисляли значения $\Delta\Delta C_t$. С помощью статистического анализа сравнивали экспрессию генов во всех популяциях клеток для каждого пациента с помощью одностороннего ANOVA и поправки Бонферрони для множественных сравнений между интересующей популяцией и всеми другими популяциями. Статистический анализ также осуществляли с использованием доступного программного обеспечения RT² profiler PCR Array Data Analysis (Qiagen). Для двух группы использовали t-критерий Стьюдента. Анализ осуществляли в трех параллелях до/после 3 дней культивирования. Ниже приведены основные характеристики праймеров, используемых для генов человека

Обозначение гена	UniGene #	Регистрационный номер Refseq	Размер полосы (п.н.)	Референсное положение
INS	Hs.272259	NM_000207.2	126	252
IGF-IR	Hs.643120	NM_000875.3	64	2248
TMEM219	Hs.460574	NM_001083613.1	60	726
LRP1	Hs.162757	NM_002332.2	64	656
TGF β R1	Hs.494622	NM_001130916.1	73	646
TGF β R2	Hs.604277	NM_001024847.2	70	1981
Каспаса 8	Hs.599762	NM_001080124.1	124	648
ACTB	Hs.520640	NM_001101	174	730

Ниже приведены основные характеристики праймеров, используемых для генов мыши

Обозначение гена	UniGene #	Регистрационный номер Refseq	Размер полосы (п.н.)	Референсное положение
INS	Mm.4626	NM_008386.3	80	533
IGF-IR	Mm.275742	NM_010513.2	106	3901
TMEM219	Mm.248646	NM_026827.1	78	677
LRP1	Mm.271854	NM_032538.2	104	2995
TGFbR1	Mm.197552	NM_009370.2	85	90
TGFbR2	Mm.172346	NM_033397.3	132	1656
Каспаса 8	Mm.336851	NM_001080126.1	96	1525
ACTB	Mm.304088	NM_008084.2	107	75

Анализ ELISA.

Уровни IGF-I и IGFBP3 в объединенных сыворотках/плазме всех групп индивидуумов и всех групп мышей, которым осуществляли или не осуществляли введение, оценивали с использованием коммерчески доступных наборов для ELISA по инструкциям производителя (R&D SG300 и Sigma RAB0235).

Первичные гепатоциты человека (объединенные гепатоциты человека HEP10™, Thermo Fisher Scientific) культивировали в течение 3 дней в среде Уильямса по инструкциям производителя с различными концентрациями глюкозы: 11, 20 и 35 мМ.

Собирали супернатант культуры и оценивали IGFBP3 с использованием набора для ELISA IGFBP3 (Sigma, RAB0235) по инструкциям производителя. Собранные клетки отделяли с помощью трипсина и подсчитывали с использованием гемоцитометра.

Уровни инсулина анализировали с помощью ферментативного иммунологического анализа с использованием микрочастиц (Mercodia Iso-Insulin ELISA, 10-11 13-01) с использованием коэффициентов (CV) вариации для одного анализа и серии анализов 3,0 и 5,0%. Рекombинантные белки и интервенционные исследования 100 нг/мл рекombинантного IGF-I человека (Sigma, 13769) (IGF-I), 50 нг/мл рекombинантного IGFBP3 человека (Life Technologies, 10430H07H5) (IGFBP3), 1 мкМ/л антитела против IGF-IR (Selleckchem, Boston, OSI-906) и 130 нг/мл ecto-TMEM219 (D'Addio et al., 2015) добавляли в культуры островков/клеток в день +1 после сбора островков/культивирования клеток. Панкреатические островки и β-клетки также подвергали воздействию сложных диабетогенных условий: 20 мМ глюкозы, смесь 2 нг/мл рекombинантного ИЛ-1β человек (R&D Systems, Minneapolis, M 201-LB-005) и 1000 Ед./мл рекombинантного ИФНγ человека (PeProTech, 300-02) в течение 72 ч.

IGFBP3 (Reprokine, Valley Cottage, NY) интраперитонеально (i.p.) вводили наивным мышам B6 в количестве 150 мкг/мышь/день в течение 15 дней; ecto-TMEM219 вводили in vivo мышам B6, которым вводили STZ, мышам NOD возрастом 10 недель и мышам B6, которых кормили кормом с высоким содержанием жира (HFD-B6), интраперитонеально (i.p.) в дозе 150 мкг/мышь/день в течение 15 дней в случае мышей B6, которым вводили STZ, и NOD, и 100 мкг/мышь через день в течение 8 недель в случае мышей HFD-B6.

Исследования на животных.

Самцов мышей C57BL/6 (B6) и самок мышей с диабетом без ожирения (NOD) (возрастом 4 недели и 10 недель) получали из Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine. Всех мышей содержали и использовали в соответствии с руководствами учреждения, одобренными Harvard Medical School Institutional Animal Care and Use Committee. У мышей B6 вызывали диабет посредством химического подхода с использованием инъекции стрептозотоцина (STZ) (225 мг/кг, введение i.p.; Sigma S0130), эта модель принята и валидирована в качестве модели диабета T1D (Carvello et al., 2012; Petrelli et al., 2011; Vergani et al., 2013). Диабет определяли у мышей B6, которым вводили STZ, и мышей NOD как уровни глюкозы в крови >250 мг/дл для 3 последовательных измерений.

Для исследования дебюта и прогрессирования T2D мышей B6 (возрастом 6 недель) держали в стерильном помещении в соответствии с Principles of Laboratory Animal Care (публикация NIH № 85-23, редакция 1985 г.), и они получали воду и пищу не ограничено. Протокол исследования одобрен местным этическим комитетом. Мышей кормили кормом с высоким содержанием жира (HFD) (корм DIO D12492, 60% всех калорий из жира) или с нормальным содержанием жира (NFD; корм DIO D12450B; 10% всех калорий из жира), приобретенным в Research Diets (Mucedola, Settimo Milanese, Italy). Каждая исследуемая или контрольная группа состояла из 10 животных. Через 16 недель измеряли гликемию и осуществляли тест IV толерантности к глюкозе (IVGTT). На следующий день мышей умерщвляли, а затем получали образец крови и собирали поджелудочные железы для гистологических исследований. Часть ткани также быстро замораживали и хранили в тризоле для осуществления исследований с помощью RT-ПЦР.

В конечном итоге, плазму и сыворотку собирали для анализа уровней IGF-I (набор для ELISA IGF-I, R&D MG100), IGFBP3 (набор для ELISA IGFBP3, R&D MGB300) и инсулина (набор для ELISA инсулина мыши, Mercodia, 10-1247-01). Глюкозу крови подвергали мониторингу дважды в неделю в течение 12 недель в HFD-B6 для подтверждения дебюта и устойчивого состояния диабета.

Статистический анализ.

Данные представлены в виде среднего со стандартной ошибкой среднего (SEM), и их тестировали на нормальное распределение с использованием критерия Колмогорова-Смирнова и на однородность дисперсии с использованием критерия Левена. Статистическую значимость различий тестировали с помощью двустороннего t-критерия и критерия хи-квадрат (χ^2). Значимость различий между двумя группами определяли с помощью непарного двустороннего t-критерия Стьюдента. В случае множественных сравнений использовали анализ ANOVA с поправкой Бонферрони. Все данные вводили в Statistical Package for the Social Science (SPSS®, IBM®, SPSS Inc., Chicago, IL) и анализировали. Графики получали с использованием GraphPad Prism версии 5.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA). Все статистические тесты осуществляли при уровне значимости 5%.

Результаты.

Периферические уровни IGFBP3 повышены у мышей с преддиабетом и диабетом.

Для идентификации потенциальных циркулирующих факторов, которые могут играть роль в индуцировании гибели β -клеток, авторы настоящего изобретения осуществляли профилирование протеома сыворотки здоровых индивидуумов и индивидуумы с риском развития T1D, с учетом наличия одного или нескольких аутоантител против островков с использованием объективного протеомного анализа. Белки, значимо отличающиеся (значение $p < 0,01$) в контрольной совокупности относительно совокупности индивидуумов с риском развития T1D, дополнительно подвергали иерархической кластеризации. Чистый протеомный профиль выявляли у индивидуумов с риском развития T1D (и также при очевидном T1D) по сравнению со здоровыми индивидуумами, при этом более 50% определенных белков попадали в одну группу или другую. В частности, уровни IGF-I-связывающих белков 3 (IGFBP3) повышались у индивидуумов с риском развития T1D, при использовании иммунологического анализа (фиг. 19A) и, таким образом, предшествовали началу гипергликемии. Примечательно, что уровни IGFBP3 также были изменены в образцах, полученных в исследовании Genfiev, включавшем более 800 индивидуумов, и их классифицировали с учетом результатов теста OGTT по трем основным категориям: индивидуумы с нормальной толерантностью к глюкозе (NGT), индивидуумы с нарушенной толерантностью к глюкозе (IGT) и индивидуумы с T2D (T2D). Авторы настоящего изобретения наблюдали, что уровни IGFBP3 повышались у индивидуумов с IGT и T2D по сравнению с NGT индивидуумами, что подтверждает, что высокие периферические уровни IGFBP3, в основном, характеризуют преддиабетические состояния (фиг. 19B). Для демонстрации неблагоприятного эффекта IGFBP3 в отношении островков и β -клеток авторы настоящего изобретения сначала демонстрировали, что у мышей NOD с преддиабетом, а также мышей NOD с диабетом и мышей C57BL/6 со стрептозотоцин-индуцированным диабетом (STZ-B6) наблюдали повышенные периферические уровни IGFBP3 по сравнению с наивными мышами B6 (фиг. 20A). Затем авторы настоящего изобретения подтверждали это на модели T2D мыши, модели HFD. У мышей C57B16/J (B6), которых кормили кормом с высоким содержанием жира, у которых T2D развивался за 16 недель, наблюдали повышенные уровни периферического IGFBP3 по сравнению с мышами B6, которых кормили кормом с нормальным содержанием жира (фиг. 20B).

Повышенная продукция IGFBP3 гепатоцитами в воспалительном окружении и при T1D.

Известно, что печень является местом продукции IGFBP3. Для исследования того, могут ли воспалительные стимулы влиять на продукцию IGFBP3 в печени, авторы настоящего изобретения культивировали первичные гепатоциты человека с различными цитокинами и различными концентрациями глюкозы (11, 20 и 35 mM) и демонстрировали, что уровни IGFBP3 в супернатантах быстро повышались после воздействия различных провоспалительных стимулов и повышенных уровней глюкозы (фиг. 21A-B).

TMEM219 экспрессируется в островках человека.

Для оценки эффекта оси IGFBP3/TMEM219 в отношении островков и β -клеток авторы настоящего изобретения сначала оценивали экспрессию TMEM219 с использованием иммунофлуоресцентного анализа и его колокализацию с инсулином с помощью конфокальной микроскопии (фиг. 22A1-A2). Исследовали островки человека, полученные из доноров трупной ткани, поджелудочная железа которых не подходила для донорства органов. TMEM219 (зеленое окрашивание) диффузно экспрессировался в островках и колокализовался с инсулином (красное окрашивание) (фиг. 22A1-A2). Авторы настоящего изобретения дополнительно оценивали экспрессию других известных рецепторов IGFBP3 (т.е. LRP1, TGF- β R1 и TGF- β R2), но ни один из них, по-видимому, не экспрессировался (фиг. 22B). Затем авторы настоящего изобретения подтверждали экспрессию TMEM219 с использованием RT-ПЦР и WB (фиг. 22B-C). Авторы настоящего изобретения дополнительно подтверждали экспрессию TMEM219 в островках мыши с использованием RT-ПЦР и исключали экспрессию других известных рецепторов IGFBP3 (LRP1, TGF- β типа 1 и TGF- β типа 2), уже описанных на других клетках и моделях (Baxter, 2013; Forbes et al., 2010) (фиг. 23A). Наконец, авторы настоящего изобретения использовали доступность линий β - и α -клеток мыши (α TC и β TC) и с помощью RT-ПЦР определяли, что экспрессия TMEM219 ограничена β -клетками, в то время как другие клетки островков, такие как α -клетки, его не экспрессируют (фиг. 23B), и дополнительно подтверждали экспрессию TMEM219 посредством WB (фиг. 23C). Иммунофлуоресцентное окрашивание TMEM219 (зеленым) и его колокализацию с инсулином также подтверждали на

линии β -клеток с помощью конфокальной микроскопии (фиг. 23D).

IGFBP3 повреждает линию β -клеток *in vitro*.

Для демонстрации того, что IGFBP3 направленно воздействует на β -клетки в островках, авторы настоящего изобретения культивировали линию β -клеток (β TC) в течение 3 дней с/без IGFBP3. Используя анализ жизнеспособности/апоптоза, авторы настоящего изобретения могли продемонстрировать снижение процента жизнеспособных β -клеток в условиях с введением IGFBP3 по сравнению с условиями без введения (фиг. 24A). Примечательно, что обработанные IGFBP3 β -клетки также демонстрировали значительное повышение экспрессии каспазы 8 (фиг. 24B) и снижение экспрессии инсулина при иммунофлуоресцентном анализе и RT-ПЦР (фиг. 24C, D1-D2, E). Примечательно, что IGFBP3-индуцируемый апоптоз был значимо выше, чем апоптоз, индуцируемый провоспалительными стимулами ИЛ-1 β и ИФН γ (фиг. 24A-B), и экспрессия и высвобождение инсулина снижались лишь немного (фиг. 24C-E).

IGFBP3 повреждает островки мыши *in vitro*.

Для дополнительной демонстрации опосредованного IGFBP3 неблагоприятного эффекта в отношении островков авторы настоящего изобретения культивировали островки мыши, выделенные из мышей C57BL/6, в течение 4 дней с/без IGFBP3. Возникновение обширного апоптоза по данным FACS (аннексии V⁺7AAD⁻) свидетельствовало о том, что обработанные IGFBP3 островки подвергались раннему апоптозу (87 \pm 2 по сравнению с 67 \pm 2%, $p=0,004$), ассоциированному с повышением экспрессии каспазы 8 и снижением экспрессии инсулина по данным RT-ПЦР (фиг. 25A-C).

IGFBP3 повреждает островки человека *in vitro*.

В конечном итоге авторы настоящего изобретения подтверждали опосредованные IGFBP3 неблагоприятные эффекты в островках человека посредством демонстрации того, что культивируемые *in vitro* островки человека, полученные из доноров трупной ткани, поджелудочная железа которых не подходила для донорства органов, подвергнутые воздействию IGFBP3 в течение 4 дней, в значительной степени подвергались апоптозу (фиг. 26A), демонстрируя повышение экспрессии каспазы 8 (фиг. 26B) и повышение экспрессии M30 (фиг. 8C1-C2), маркера апоптоза, ассоциированного со снижением экспрессии инсулина по данным иммуноокрашивания (фиг. 26D1-D2) и RT-ПЦР (фиг. 26E).

Инъекция IGFBP3 мышам C57BL/6 изменяет морфологию островков *in vivo*.

Для подтверждения того, что IGFBP3 изменяет морфологию островков, авторы настоящего изобретения инъецировали рекомбинантный IGFBP3 (Reprokine) наивным мышам B6 и мышам B6, которым вводили STZ (150 мкг ежедневно в течение 15 дней). При гистологическом анализе (H&E) собранных поджелудочных желез наблюдали нарушения островков мышей STZ-B6, которым вводили IGFBP3, по сравнению с островками наивных мышей и мышей STZ-B6, что подтверждалось рассеянной экспрессией инсулина по данным иммуноокрашивания (фиг. 27A1-A6).

Рекомбинантный белок ecto-TMEM219 предотвращает IGFBP3-ассоциированное повреждение в линии β -клеток *in vitro*.

Для демонстрации того, что ecto-TMEM219 предотвращает IGFBP3-ассоциированные неблагоприятные эффекты специфически в отношении β -клеток, авторы настоящего изобретения культивировали линию β -клеток с IGFBP3 и ecto-TMEM219 и наблюдали, что при добавлении ecto-TMEM219 апоптоз β -клеток значительно снижался. Эффект также подтверждали при анализе экспрессии каспазы 8, снижающейся в β -клетках, обработанных IGFBP3+ecto-TMEM219, по сравнению с клетками, культивируемыми только с IGFBP3 (фиг. 28A-B). По результатам RT-ПЦР и иммунофлуоресцентного анализа (красное) экспрессия инсулина последовательно повышалась при добавлении ecto-TMEM219 в культивируемые с IGFBP3 β -клетки (фиг. 28C1-C3).

Рекомбинантный белок ecto-TMEM219 предотвращает IGFBP3-ассоциированные неблагоприятные эффекты в островках мыши *in vitro*.

Для дополнительного подтверждения терапевтических свойств ecto-TMEM219 в предотвращении IGFBP3-ассоциированного повреждения авторы настоящего изобретения тестировали эффект ecto-TMEM219 в культивируемых островках мыши *in vitro*. Добавление ecto-TMEM219 (молярное соотношение 2:1 с IGFBP3) к выделенным островкам C57BL/6, сокультивируемым с IGFBP3, отменяло проапоптотический эффект IGFBP3. Кроме того, экспрессия каспазы 8 значительно снижалась в островках, культивируемых с IGFBP3 и ecto-TMEM219 (фиг. 29A). Экспрессия инсулина повышалась при добавлении ecto-TMEM219 к островкам мыши, культивируемым с IGFBP3 (фиг. 29B), что подчеркивает благоприятный эффект ecto-TMEM219 в сохранении функции островков.

Рекомбинантный белок ecto-TMEM219 предотвращает неблагоприятные эффекты IGFBP3 в отношении островков человека *in vitro*.

Для демонстрации положительного воздействия ecto-TMEM219 в предотвращении деструкции островков авторы настоящего изобретения культивировали островки человека с IGFBP3 и ecto-TMEM219 в течение 4 дней и демонстрировали восстановление при IGFBP3-опосредованном повреждении островков с помощью ecto-TMEM219, ассоциированное с повышением экспрессии инсулина и снижением экспрессии каспазы 8 по данным RT-ПЦР (фиг. 30A-B).

Примечательно, что с помощью совместного окрашивания на инсулин (красное окрашивание) и

M30 (зеленое окрашивание), маркер апоптоза, подтверждали, что инсулин-продуцирующие клетки были защищены ecto-TMEM219 при сокультивировании с IGFBP3 (фиг. 30C1-C3).

Рекомбинантный белок ecto-TMEM219 предотвращает IGFBP3-ассоциированные изменения островков.

Для подтверждения эффекта ecto-TMEM219 в лечении диабета авторы настоящего изобретения измеряли уровни инсулина в сыворотке мышей с диабетом, которым вводили STZ, через 8 недель и наблюдали, что инсулин значительно повышался у мышей, которым вводили ecto-TMEM219 (i.p. 150 мкг через день в течение 2 недель), по сравнению с мышами STZ-B6, которым его не вводили (фиг. 31A). Наконец, в другой модели повреждения островков *in vivo* у мышей B6, которых кормили кормом с высоким содержанием жира (B6-HFD), наблюдали измененные уровни глюкозы и инсулина в крови, в то время как у мышей B6-HFD, которым вводили ecto-TMEM219 (i.p. 100 мкг через день в течение 6 недель), сохранялись почти нормальные уровни глюкозы и инсулина (фиг. 31B), что, таким образом, позволяет предполагать лечебный эффект ecto-TMEM219 при диабете типа 1 и типа 2.

Обсуждение.

Исторически диабет типа 1 (T1D) рассматривают как опосредованное T-клетками аутоиммунное заболевание, приводящее к деструкции инсулин-продуцирующих β -клеток поджелудочной железы (Bluestone et al., 2010; Eisenbarth, 1986). С этой точки зрения, иницирующий фактор запускает иммунный ответ против аутоантигенов, а затем недавно активированные аутореактивные T-клетки направленно воздействуют и разрушают панкреатические островки и инсулин-продуцирующие β -клетки (Bluestone et al., 2010). То, определена ли деструкция β -клеток исключительно аутоиммунной атакой, или в патогенезе T1D участвуют другие механизмы, такие как паракринная модуляция, метаболическая дисрегуляция, неиммунный апоптоз β -клеток и прекращение регенерации β -клеток, в настоящее время являются предметом дискуссии (Atkinson and Chervonsky, 2012; Atkinson et al., 2015). Недавно было замечено, что факторы окружающей среды (например; вирусные инфекции, питание, неонатальное воздействие молока и микрофлора) необходимы для инициации аутоиммунного ответа при T1D (Filippi and von Herrath, 2008; McLean et al., 2015). Таким образом, постепенно возникает новый подход к исследованию патогенеза T1D (McLean et al., 2015), таким образом, уже не считают, что иммунологические и генетические факторы являются исключительной детерминантой T1D (Alper et al., 2006; Oilinki et al., 2012). Кроме того, эффективность иммунотерапевтических стратегий, которые в последнее десятилетие считают основным путем разработки лечения T1D, в настоящее время подвергается сомнению (Ben Nasr et al., 2015a). Хотя показано, что направленное воздействие на аутоиммунный ответ с использованием иммуносупрессорного лечения или прорегуляторной схемы лечения является удовлетворительным у грызунов, такие стратегии наоборот позволяют достигать независимости от инсулина у ничтожно малого количества индивидуумов с T1D (Atkinson et al., 2015). Помимо того, что эти данные подчеркивают различия между моделями на животных и людях, они также проливают свет на тот факт, что при исследовании иммунного ответа, главным образом, изучают иммунные явления, происходящие на периферии, хотя мало что известно о патологическом процессе, происходящем в островках, и, в частности, β -клетках. В связи с этим, открытие новых факторов, участвующих в инициации/облегчении потери β -клеток при T1D, будет иметь большое значение. Такое открытие может проложить путь для новых терапевтических подходов, с помощью которых можно останавливать или замедлять самую первую фазу заболевания. В настоящем исследовании обнаруживали, что у индивидуумов с высоким риском T1D и индивидуумов с выраженным T1D повышены периферические уровни IGFBP3. Примечательно, что схожий паттерн также наблюдали у индивидуумов с риском развития T2D (IGT, IFG), когда непереносимость глюкозы была уже определяемой, и у индивидуумов с развившимся T2D, что подтверждает то, что, несмотря на разную этиологию, медиатор потери β -клеток, происходящей при обоих типах диабета, может быть одинаковым, а именно β -токсином под названием IGFBP3. Фактически, T1D и T2D отличаются потерей β -клеток, приводящей к сниженной секреции инсулина, неспособности контролировать уровни глюкозы в крови и гипергликемии (Brennan and Melton, 2009; Yi et al., 2014). Несмотря на различные этиологические механизмы, аутоиммунный ответ при T1D или резистентность к инсулину/воспаление при T2D приводят к прогрессирующему снижению массы β -клеток. В настоящее время доступно несколько подходов для лечения T1D и T2D, но ни один из них не направлен на потерю β -клеток, защиту от повреждения β -клеток и сохранение массы β -клеток, таким образом, предотвращение дебюта диабета. IGFBP3 также может представлять собой механизм для объяснения декомпенсации, наблюдаемой у пациентов с T2D, медленно, но неуклонно, теряющих функцию своих β -клеток и прекращающих продуцировать инсулин. Хроническая гиперпродукция IGFBP3, наблюдаемая при T2D, может благоприятствовать деструкции β -клеток и приводить к бездействию, например, перорального противодиабетического средства. Авторы настоящего изобретения также наблюдали, что рецептор IGFBP3 (TMEM219) экспрессируется в островках мыши/человека, и что его лигирование IGFBP3 токсично для β -клеток, что повышает вероятность существования эндогенного β -клеточного токсина (бетатоксина), который может участвовать в ранней фазе T1D и развитии диабета в целом. Неиммунологический фактор может определять повреждение островков/ β -клеток и облегчать воздействие аутоантигенов на иммунные клетки, таким образом, создавая

локальное воспалительное окружение и поддерживая иммунную реакцию. Уже описано, что печень является основным источником IGFBP3, и воздействие на нее воспаления и высоких уровней глюкозы значительно повышает высвобождение IGFBP3 в кровотоке. В результате, IGFBP3 направленно воздействует на островки и β -клетки, таким образом, способствуя их повреждению и потере. Таким образом, нейтрализация IGFBP3-опосредованного повреждения β -клеток с использованием недавно полученных ингибиторов оси IGFBP3/ТМЕМ219, таких как рекомбинантный ecto-ТМЕМ219, может предотвращать потерю β -клеток, подавляя периферический IGFBP3, таким образом, блокируя передачу его сигнала через ТМЕМ219 и останавливая/замедляя прогрессирование Т1D (фиг. 32). Это может привести к клиническому применению в области профилактики диабета, приводя к применению ecto-ТМЕМ219 у индивидуумов с высоким риском Т1D и, в конечном итоге, Т2D. Таким образом, ингибиторы оси IGFBP3/ТМЕМ219 могут предотвращать раннее повреждение β -клеток, ассоциированное с ранней стадией Т1D, посредством ингибирования связывания IGFBP3 с ТМЕМ219, экспрессирующимся на ткани-мишени. Учитывая их роль в предотвращении ранней потери β -клеток, ингибиторы оси IGFBP3/ТМЕМ219 также можно считать полезными для раннего лечения Т2D. Таким образом, ингибиторы оси IGFBP3/ТМЕМ219 могут представлять собой терапевтическую стратегию для предотвращения дебюта диабета и защиты β -клеток от потери и повреждения, что, таким образом, делает их важным клиническим вариантом для индивидуумов с риском развития диабета Т1D и Т2D и индивидуумов с диабетом на ранних стадиях. Индивидуумы с риском развития Т1D, в основном, отличаются ранним определением в сыворотке многочисленных аутоантител против пептидов островков, как правило, отсутствующих у здоровых индивидуумов (Ziegler et al., 2013). Эти индивидуумы, как правило, являются родственниками (братьями, сестрами) индивидуумов с Т1D, но не имеющими какого-либо признака или симптома, связанного с Т1D. Вероятность прогрессирования до Т1D в течение 10 лет у этих индивидуумов является высокой, при этом у большинства из них (70%) Т1D развивается в следующие 15 лет, но они зачастую неправильно определены (Ziegler et al., 2013). Индивидуумы с риском развития Т2D трудны для идентификации, особенно на ранней стадии. Профилактика, в основном, состоит из модификаций образа жизни, которые могут замедлить дебют заболевания, но не могут предотвратить его (Schwarz et al., 2012). Различные способы скрининга (генетический анализ, метаболическое профилирование, оценка ожирения и факторов риска) для ранней детекции изменений метаболизма глюкозы находятся в стадии разработки, но терапевтические средства, способные предотвращать или защищать от дебюта Т2D, недоступны, а существующие варианты включают лишь противодиабетические средства, контролирующие гипергликемию и замедляющие прогрессирование Т2D (метформин), или средства, контролирующие другие факторы риска (средства, снижающие липиды, и средства, снижающие артериальное давление) (Nathan, 2015). Таким образом, способы лечения, направленные на снижение бремени диабета Т1D и Т2D в общей популяции, должны фокусироваться на этих популяциях с высоким риском. Настоящее изобретение рассматривают как новое клиническое терапевтическое средство, подлежащее применению индивидуумами с риском развития диабета для профилактики его дебюта и индивидуумами на ранних стадиях заболевания (впервые выявленного) для защиты от прогрессирования в развитый диабет посредством противодействия потере бета-клеток и сохранения массы бета-клеток. Учитывая их роль в профилактике потери и повреждения бета-клеток, ингибиторы оси IGFBP3/ТМЕМ219 предназначены для применения индивидуумами с риском развития Т1D или Т2D и индивидуумами с заболеванием на ранних стадиях.

Ссылки.

(1993). The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. *N Engl J Med* 329, 977-986.

Alper, C.A., Husain, Z., Larsen, C.E., Dubey, D.P., Stein, R., Day, C, Baker, A., Beyan, H., Hawa, M., Ola, T.O., et al. (2006). Incomplete penetrance of susceptibility genes for MHC-determined immunoglobulin deficiencies in monozygotic twins discordant for type 1 diabetes. *Journal of autoimmunity* 27, 89-95.

Atkinson, M.A., and Chervonsky, A. (2012). Does the gut microbiota have a role in type 1 diabetes? Early evidence from humans and animal models of the disease. *Diabetologia* 55, 2868-2877.

Atkinson, M.A., Eisenbarth, G.S., and Michels, A.W. (2013). Type 1 diabetes. *Lancet*. Atkinson, M.A., von Herrath, M., Powers, A.C., and Clare-Salzler, M. (2015). Current concepts on the pathogenesis of type 1 diabetes-considerations for attempts to prevent and reverse the disease. *Diabetes care* 38, 979-988.

Barker, N. (2014). Adult intestinal stem cells: critical drivers of epithelial homeostasis and regeneration. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15, 19-33.

Baxter, R.C. (2013). Insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3): Novel ligands mediate unexpected functions. *Journal of cell communication and signaling* 7, 179-189.

Ben Nasr, M., D'Addio, F., Usuelli, V., Tezza, S., Abdi, R., and Fiorina, P. (2015a). The rise, fall, and resurgence of immunotherapy in type 1 diabetes. *Pharmacological research: the official journal of the Italian Pharmacological Society* 98, 31-38.

Ben Nasr, M, Vergani, A., Avruch, J., Liu, L., efaloyianni, E., D'Addio, F., Tezza, S., Corradi, D., Bassi, R., Valderrama-Vasquez, A., et al. (2015b). Co-transplantation of autologous MSCs delays islet allograft rejection and generates a local immunoprivileged site. *Acta diabetologica* 52, 917-927.

Bluestone, J. A., Herold, K., and Eisenbarth, G. (2010). Genetics, pathogenesis and clinical interventions in type 1 diabetes. *Nature* 464, 1293-1300.

Bondy, C.A., Underwood, L.E., Clemmons, D.R., Guler, H.P., Bach, M.A., and Skarulis, M. (1994). Clinical uses of insulin-like growth factor I. *Ann Intern Med* 120, 593-601.

Bortvedt, S.F., and Lund, P.K. (2012). Insulin-like growth factor 1: common mediator of multiple enterotrophic hormones and growth factors. *Curr Opin Gastroenterol* 28, 89-98.

Boucher, J., Macotela, Y., Bezy, O., Mori, M.A., Kriauciunas, K., and Kahn, C.R. (2010). A kinase-independent role for unoccupied insulin and IGF- 1 receptors in the control of apoptosis. *Sci Signal* 3, ra87.

Breault, D.T., Min, I.M., Carlone, D.L., Farilla, L.G., Ambruzs, D.M., Henderson, D.E., Algra, S., Montgomery, R.K., Wagers, A.J., and Hole, N. (2008). Generation of mTert-GFP mice as a model to identify and study tissue progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 10420- 10425.

Brennand, K., and Melton, D. (2009). Slow and steady is the key to beta-cell replication. *Journal of cellular and molecular*

medicine 13, 472-487.

Bytzer, P., Talley, N.J., Hammer, J., Young, L.J., Jones, M.P., and Horowitz, M. (2002). GI symptoms in diabetes mellitus are associated with both poor glycemic control and diabetic complications. *Am J Gastroenterol* 97, 604-611.

Camilleri, M. (2007). Clinical practice. Diabetic gastroparesis. *N Engl J Med* 356, 820-829. Cano, A.E., Neil, A.K., Kang, J.Y., Barnabas, A., Eastwood, J.B., Nelson, S.R., Hartley, I., and Maxwell, D. (2007). Gastrointestinal symptoms in patients with end-stage renal disease undergoing treatment by hemodialysis or peritoneal dialysis. *Am J Gastroenterol* 102, 1990-1997.

Carlone, D.L., and Breault, D.T. (2012). Tales from the crypt: the expanding role of slow cycling intestinal stem cells. *Cell Stem Cell* 10, 2-4.

Carpentino, J.E., Hynes, M.J., Appelman, H.D., Zheng, T., Steindler, D.A., Scott, E.W., and Huang, E.H. (2009). Aldehyde dehydrogenase-expressing colon stem cells contribute to tumorigenesis in the transition from colitis to cancer. *Cancer Res* 69, 8208-8215.

Carrington, E.V., Brokjaer, A., Craven, H., Zarate, N., Horrocks, E.J., Palit, S., Jackson, W., Duthie, G.S., Knowles, C.H., Lunniss, P.J., et al. (2014). Traditional measures of normal anal sphincter function using high-resolution anorectal manometry (HRAM) in 115 healthy volunteers. *Neurogastroenterol Motil*.

Carvello, M., Petrelli, A., Vergani, A., Lee, K.M., Tezza, S., Chin, M., Orsenigo, E., Staudacher, C, Secchi, A., Dunussi-Joannopoulos, K., et al. (2012). Inotuzumab ozogamicin murine analog-mediated B-cell depletion reduces anti-islet auto- and autoimmune responses. *Diabetes* 61, 155-165. Cox, J., Neuhauser, N., Michalski, A., Scheltema, R.A., Olsen, J.V., and Mann, M. (2011). Andromeda: a peptide search engine integrated into the MaxQuant environment. *J Proteome Res* 10, 1794-1805.

DAddio, F., La Rosa, S., Maestroni, A., Jung, P., Orsenigo, E., Ben asr, M., Tezza, S., Bassi, R., Finzi, G., Marando, A.,

et al. (2015). Circulating IGF-I and IGFBP3 Levels Control Human Colonic Stem Cell Function and Are Disrupted in Diabetic Enteropathy. *Cell Stem Cell* 17, 486- 498.

DAddio, F., Valderrama Vasquez, A., Ben Nasr, M., Franek, E., Zhu, D., Li, L., Ning, G., Snarski, E., and Fiorina, P. (2014). Autologous nonmyeloablative hematopoietic stem cell transplantation in new-onset type 1 diabetes: a multicenter analysis. *Diabetes* 63, 3041-3046.

Di Cairano, E.S., Davalli, A.M., Perego, L., Sala, S., Sacchi, V.F., La Rosa, S., Finzi, G., Placidi, C, Capella, C, Conti, P., et al. (2011). The glial glutamate transporter 1 (GLT1) is expressed by pancreatic beta-cells and prevents glutamate-induced beta-cell death. *The Journal of biological chemistry* 286, 14007-14018.

Domenech, A., Pasquinelli, G., De Giorgio, R., Gori, A., Bosch, F., Pumarola, M., and Jimenez, M. (2011). Μορφολογικοί Μῆνεις changes underlying intestinal dysmotility in diabetic RIP-1/hIFNβ transgenic mice. *Int J Exp Pathol* 92, 400-412.

Eisenbarth, G.S. (1986). Type I diabetes mellitus. A chronic autoimmune disease. *The New England journal of medicine* 314, 1360-1368.

Faraj, J., Melander, O., Sundkvist, G., Olsson, R., Thorsson, O., Ekberg, O., and Ohlsson, B. (2007). Oesophageal dysmotility, delayed gastric emptying and gastrointestinal symptoms in patients with diabetes mellitus. *Diabet Med* 24, 1235-1239.

Feldman, M., and Schiller, L.R. (1983). Disorders of gastrointestinal motility associated with diabetes mellitus. *Ann Intern Med* 98, 378-384.

Filippi, CM., and von Herrath, M.G. (2008). Viral trigger for type 1 diabetes: pros and cons. *Diabetes* 57, 2863-2871.

Fiorina, P., Folli, F., Bertuzzi, F., Maffi, P., Finzi, G., Venturini, M., Socci, C, Davalli, A., Orsenigo, E., Monti, L., et al. (2003). Long-term beneficial effect of islet transplantation on diabetic macro-/microangiopathy in type 1

diabetic kidney-transplanted patients. *Diabetes Care* 2(5), 1129-1136.

Fiorina, P., Folli, F., D'Angelo, A., Finzi, G., Pellegatta, F., Guzzi, V., Fedeli, C., Delia Valle, P., Usellini, L., Placidi, C, et al. (2004). Normalization of multiple hemostatic abnormalities in uremic type 1 diabetic patients after kidney-pancreas transplantation. *Diabetes* 53, 2291-2300. Fiorina, P., La Rocca, E., Venturini, M., Minicucci, F., Fermo, I., Paroni, R., D'Angelo, A., Sblendido, M., Di Carlo, V., Cristallo, M., et al. (2001). Effects of kidney-pancreas transplantation on atherosclerotic risk factors and endothelial function in patients with uremia and type 1 diabetes. *Diabetes* 50, 496-501.

Fiorina, P., Venturini, M., Folli, F., Losio, C, Maffi, P., Placidi, C, La Rosa, S., Orsenigo, E., Socci, C, Capella, C, et al. (2005). Natural history of kidney graft survival, hypertrophy, and vascular function in end-stage renal disease type 1 diabetic kidney-transplanted patients: beneficial impact of pancreas and successful islet cotransplantation. *Diabetes Care* 28, 1303- 1310.

Folli, F., Guzzi, V., Perego, L., Coletta, D.K., Finzi, G., Placidi, C, La Rosa, S., Capella, C, Socci, C, Lauro, D., et al. (2010). Proteomics reveals novel oxidative and glycolytic mechanisms in type 1 diabetic patients' skin which are normalized by kidney-pancreas transplantation. *PLoS One* 5, e9923.

Forbes, K., Souquet, B., Garside, R., Aplin, J.D., and Westwood, M. (2010). Transforming growth factor- {beta} (TGF{beta}) receptors I/II differentially regulate TGF{beta} 1 and IGF- binding protein-3 mitogenic effects in the human placenta. *Endocrinology* 151, 1723-1731. Giustina, A., Berardelli, R., Gazzaruso, C, and Mazziotti, G. (2014). Insulin and GH-IGF-I axis: endocrine pacer or endocrine disruptor? *Acta Diabetol.* Gracz, A.D., Fuller, M.K., Wang, F., Li, L., Stelzner, M., Dunn, J.C., Martin, M.G., and Magness, S.T. (2013). Brief Report: CD24 and CD44 mark human intestinal epithelial cell populations with characteristics of active and facultative stem

cells. *Stem Cells* 31, 2024-2030. Hsu, S.M., Raine, L., and Fanger, H. (1981). Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* 29, 577-580.

Hughes, K.R., Sablitzky, F., and Mahida, Y.R. (2011). Expression profiling of Wnt family of genes in normal and inflammatory bowel disease primary human intestinal myofibroblasts and normal human colonic crypt epithelial cells. *Inflamm Bowel Dis* 17, 213-220.

Jung, P., Sato, T., Merlos-Suarez, A., Barriga, F.M., Iglesias, M., Rossell, D., Auer, H., Gallardo, M., Blasco, M.A., Sancho, E., et al. (2011). Isolation and in vitro expansion of human colonic stem cells. *Nat Med* 17, 1225-1227.

Kosinski, C, Li, V.S., Chan, A.S., Zhang, J., Ho, C, Tsui, W.Y., Chan, T.L., Mifflin, R.C., Powell, D.W., Yuen, S.T., et al. (2007). Gene expression patterns of human colon tops and basal crypts and BMP antagonists as intestinal stem cell niche factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 15418-15423.

Le Roith, D. (1997). Seminars in medicine of the Beth Israel Deaconess Medical Center. Insulin-like growth factors. *N Engl J Med* 336, 633-640.

Levey, A.S., Bosch, J.P., Lewis, J.B., Greene, T., Rogers, N., and Roth, D. (1999). A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: a new prediction equation. Modification of Diet in Renal Disease Study Group. *Ann Intern Med* 130, 461-470. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193, 265-275.

McLean, M.H., Dieguez, D., Jr., Miller, L.M., and Young, H.A. (2015). Does the microbiota play a role in the pathogenesis of autoimmune diseases? *Gut* 64, 332-341.

Medema, J.P., and Vermeulen, L. (2011). Microenvironmental regulation of stem cells in intestinal homeostasis and cancer. *Nature* 474, 318-326.

Merlos-Suarez, A., Barriga, F.M., Jung, P., Iglesias, M.,

Cespedes, M.V., Rossell, D., Sevillano, M., Hernando-Momblona, X., da Silva-Diz, V., Munoz, P., et al. (2011). The intestinal stem cell signature identifies colorectal cancer stem cells and predicts disease relapse. *Cell Stem Cell* 8, 511-524.

Munoz, J., Stange, D.E., Schepers, A.G., van de Wetering, M., Koo, B.K., Itzkovitz, S., Volckmann, R., Kung, K.S., Koster, J., Radulescu, S., et al. (2012). The Lgr5 intestinal stem cell signature: robust expression of proposed quiescent '+4' cell markers. *EMBO J* 31, 3079-3091. Muzumdar, R.H., Ma, X., Fishman, S., Yang, X., Atzmon, G., Vuguin, P., Einstein, F.H., Hwang, D., Cohen, P., and Barzilai, N. (2006). Central and opposing effects of IGF-I and IGF-binding protein-3 on systemic insulin action. *Diabetes* 55, 2788-2796.

Nano, R., Clissi, B., Melzi, R., Calori, G., Maffi, P., Antonioli, B., Marzorati, S., Aldrighetti, L., Freschi, M., Grochowicki, T., et al. (2005). Islet isolation for allotransplantation: variables associated with successful islet yield and graft function. *Diabetologia* 48, 906-912.

Nathan, D.M. (2015). Diabetes: Advances in Diagnosis and Treatment. *Jama* 314, 1052-1062.

Oilinki, T., Otonkoski, T., Ilonen, J., Knip, M., and Miettinen, P.J. (2012). Prevalence and characteristics of diabetes among Somali children and adolescents living in Helsinki, Finland. *Pediatric diabetes* 13, 176-180.

Pambianco, G., Costacou, T., Ellis, D., Becker, D.J., Klein, R., and Orchard, T.J. (2006). The 30-year natural history of type 1 diabetes complications: the Pittsburgh Epidemiology of Diabetes Complications Study experience. *Diabetes* 55, 1463-1469.

Petrelli, A., Carvello, M., Vergani, A., Lee, K.M., Tezza, S., Du, M., Kleffel, S., Chengwen, L., Mfarrej, B.G., Hwu, P., et al. (2011). IL-21 is an antitolerogenic cytokine of the late-phase alloimmune response. *Diabetes* 60, 3223-3234. Pupim, L.B., Heimbürger, O., Qureshi, A.R., Ikizler, T.A., and Stenvinkel, P. (2005). Accelerated lean body mass loss in incident chronic dialysis patients with diabetes mellitus. *Kidney Int* 68, 2368-2374.

Remes-Troche, J.M., De-Ocampo, S., Valestin, J., and Rao, S.S. (2010). Rectoanal reflexes and sensorimotor response in rectal hyposensitivity. *Dis Colon Rectum* 53, 1047-1054.

Sato, T., and Clevers, H. (2013). Growing self-organizing mini-guts from a single intestinal stem cell: mechanism and applications. *Science* 340, 1190-1194.

Schwarz, P.E., Greaves, C.J., Lindstrom, J., Yates, T., and Davies, M.J. (2012). Nonpharmacological interventions for the prevention of type 2 diabetes mellitus. *Nature reviews. Endocrinology* 8, 363-373.

Secchi, A., Caldara, R., La Rocca, E., Fiorina, P., and Di Carlo, V. (1998). Cardiovascular disease and neoplasms after pancreas transplantation. *Lancet* 352, 65; author reply 66.

Smets, Y.F., Westendorp, R.G., van der Pijl, J.W., de Charro, F.T., Ringers, J., de Fijter, J.W., and Lemkes, H.H. (1999). Effect of simultaneous pancreas-kidney transplantation on mortality of patients with type-1 diabetes mellitus and end-stage renal failure. *Lancet* 353, 1915-1919.

Sridhar, S.S., and Goodwin, P.J. (2009). Insulin-insulin-like growth factor axis and colon cancer. *J Clin Oncol* 27, 165-167.

Stange, D.E., and Clevers, H. (2013). Concise review: the yin and yang of intestinal (cancer) stem cells and their progenitors. *Stem Cells* 31, 2287-2295.

Svedlund, J., Sjodin, I., and Dotevall, G. (1988). GSRS- a clinical rating scale for gastrointestinal symptoms in patients with irritable bowel syndrome and peptic ulcer disease. *Dig Dis Sci* 33, 129-134.

Talley, N.J., Young, L., Bytzer, P., Hammer, J., Leemon, M., Jones, M., and Horowitz, M. (2001). Impact of chronic gastrointestinal symptoms in diabetes mellitus on health-related quality of life. *Am J Gastroenterol* 96, 71-76.

van der Flier, L.G., and Clevers, H. (2009). Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium. *Annual review of physiology* 71, 241-260.

Vergani, A., D'Addio, F., Jurewicz, M., Petrelli, A.,

Watanabe, T., Liu, K., Law, K., Schuetz, C., Carvello, M., Orsenigo, E., et al. (2010). A novel clinically relevant strategy to abrogate autoimmunity and regulate alloimmunity in NOD mice. *Diabetes* 59, 2253-2264.

Vergani, A., Fotino, C., D'Addio, F., Tezza, S., Podetta, M., Gatti, F., Chin, M., Bassi, R., Molano, R.D., Corradi, D., et al. (2013). Effect of the purinergic inhibitor oxidized ATP in a model of islet allograft rejection. *Diabetes* 62, 1665-1675.

Williams, A.C., Smartt, H., AM, H.Z., Macfarlane, M., Paraskeva, C, and Collard, T.J. (2007). Insulin-like growth factor binding protein 3 (IGFBP-3) potentiates TRAIL-induced apoptosis of human colorectal carcinoma cells through inhibition of NF-kappaB. *Cell Death Differ* 14, 137- 145.

Wisniewski, J.R., Zougman, A., Nagaraj, N., and Mann, M. (2009). Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nat Methods* 6, 359-362.

Wu, M.J., Chang, C.S., Cheng, C.H., Chen, C.H., Lee, W.C., Hsu, Y.H., Shu, K.H., and Tang, M.J. (2004). Colonic transit time in long-term dialysis patients. *Am J Kidney Dis* 44, 322-327. Yi, P., Park, J.S., and Melton, D.A. (2014). Perspectives on the activities of ANGPTL8/betatrophin. *Cell* 159, 467-468.

Zeki, S.S., Graham, T.A., and Wright, N.A. (2011). Stem cells and their implications for colorectal cancer. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology* 8, 90-100.

Zhao, J., Yang, J., and Gregersen, H. (2003). Biomechanical and morphometric intestinal remodelling during experimental diabetes in rats. *Diabetologia* 46, 1688-1697.

Ziegler, A.G., Rewers, M., Simell, O., Simell, T., Lempainen, J., Steck, A., Winkler, C, Ilonen, J., Veijola, R., Knip, M., et al. (2013). Seroconversion to multiple islet autoantibodies and risk of progression to diabetes in children. *Jama* 309, 2473-2479. Ziskin, J.L., Dunlap, D., Yaylaoglu, M., Fodor, I.K., Forrest, W.F., Patel, R., Ge, N., Hutchins, G.G., Pine, J.K., Quirke, P., et al. (2013). In situ validation of an intestinal stem cell signature in colorectal cancer. *Gut* 62, 1012-1023.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Применение ингибитора оси IGFBP3 (связывающий белок инсулиноподобного фактора роста 3)/TMEM219 (трансмембранный белок 219) в лечении и/или профилактике диабета у индивидуума, где указанный ингибитор представляет собой внеклеточный домен рецептора IGFBP3 (ecto-TMEM219).

2. Применение по п.1, где указанный ингибитор является растворимым.

3. Применение по любому из предшествующих пунктов, где указанный ингибитор является пегилированным.

4. Применение по любому из предшествующих пунктов, где указанный ингибитор представляет собой слитый белок на основе Fc, состоящий из Fc-домена иммуноглобулина, связанного с растворимым ecto-TMEM219.

5. Применение ингибитора оси IGFBP3/TMEM219 в лечении и/или профилактике диабета у индивидуума, где указанный ингибитор представляет собой полинуклеотид, кодирующий ecto-TMEM219, как определено в п.1 или 2.

6. Применение ингибитора оси IGFBP3/TMEM219 в лечении и/или профилактике диабета у индивидуума, где указанный ингибитор представляет собой вектор, содержащий или экспрессирующий полинуклеотид, как определено в п.5.

7. Применение ингибитора оси IGFBP3/TMEM219 в лечении и/или профилактике диабета у индивидуума, где указанный ингибитор представляет собой клетку-хозяин, генетически сконструированную для экспрессии ecto-TMEM219, как определено в п.1 или 2.

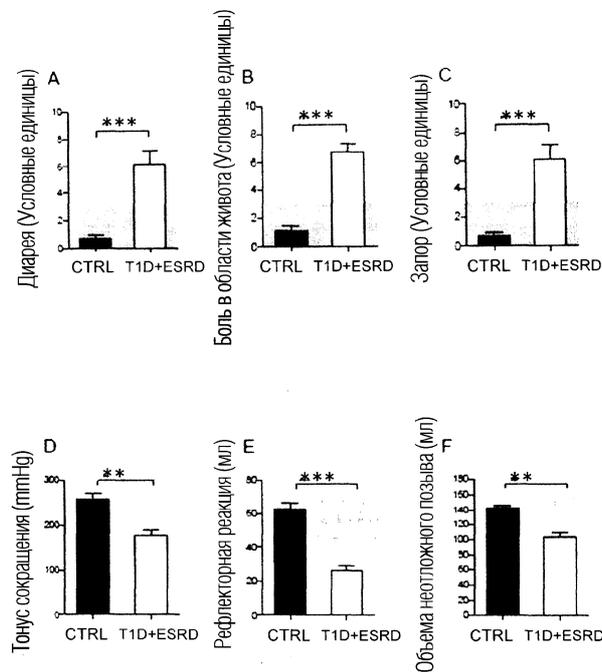
8. Применение по любому из предшествующих пунктов, где диабет является диабетом типа 1 или типа 2.

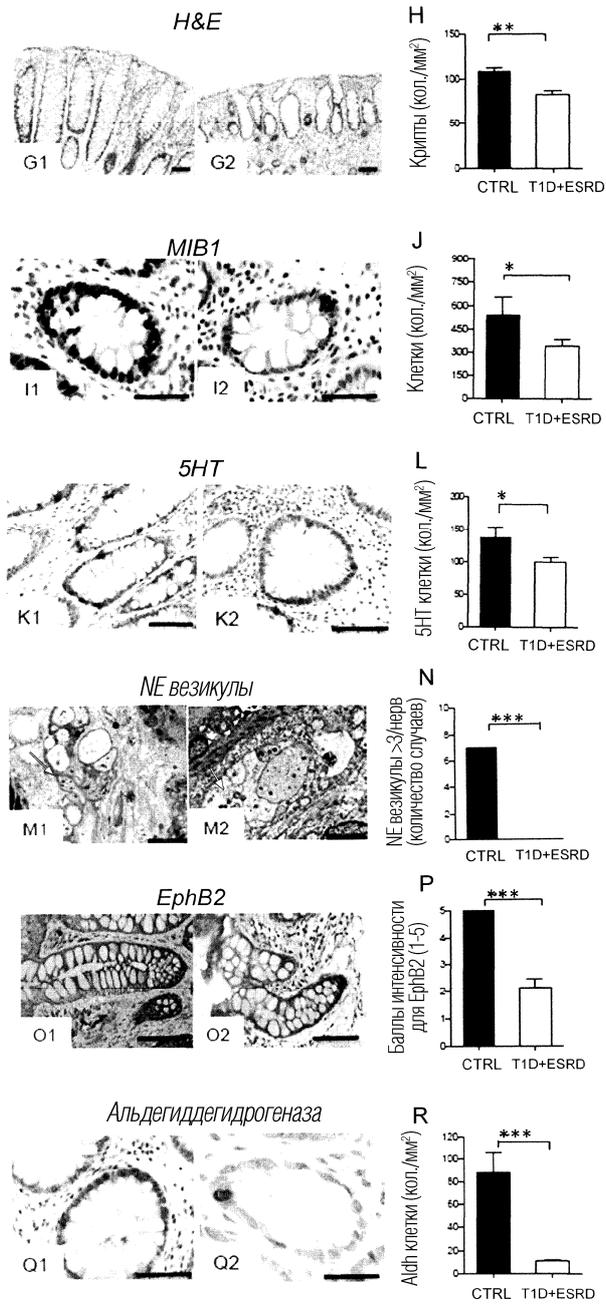
9. Применение по любому из предшествующих пунктов, где индивидуум выбран из группы, состоящей из индивидуума с риском развития диабета типа 1 и/или типа 2, индивидуума с ранней стадией диабета типа 1 и/или типа 2.

10. Фармацевтическая композиция для лечения и/или профилактики диабета, содержащая ингибитор оси IGFBP3/TMEM219, как описано в любом из пп. 1-7, и фармацевтически приемлемые носители.

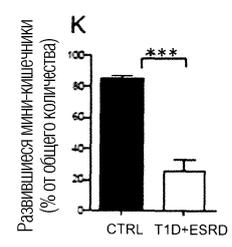
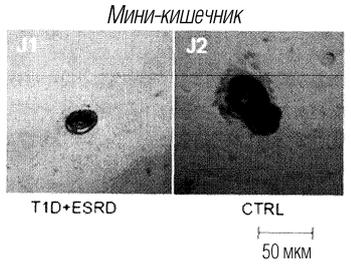
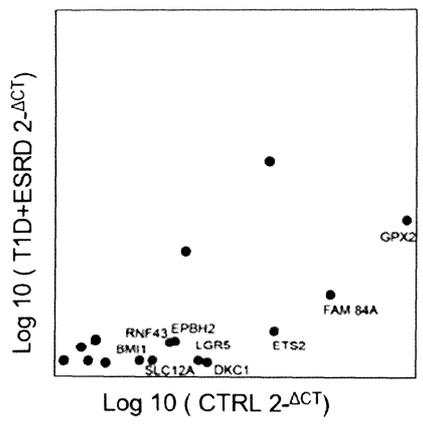
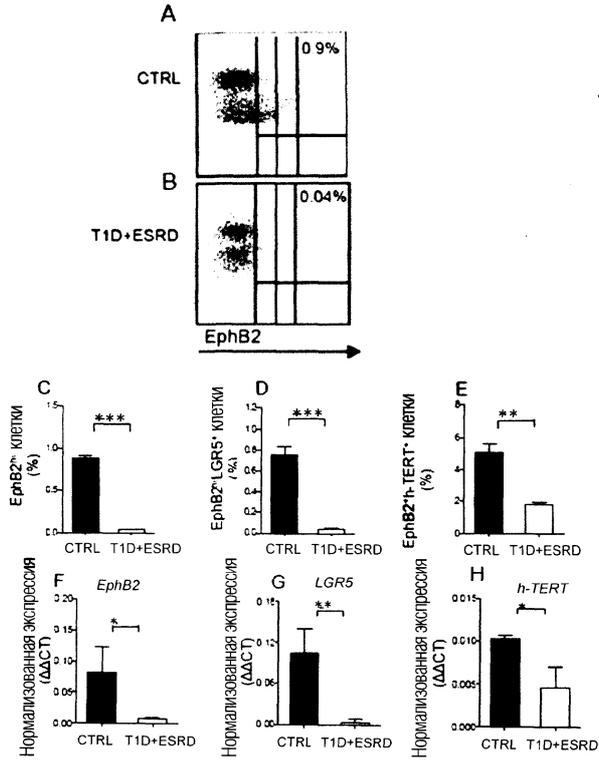
11. Фармацевтическая композиция по п.10, дополнительно содержащая терапевтическое средство, выбранное из инсулина в любой форме, прамлинтида, ингибиторов ангиотензин-превращающего фермента (ACE) или блокаторов рецептора ангиотензина II (ARB), аспирина, лекарственных средств, снижающих холестерин, метформина, сульфонилкарбамидов, меглитинидов, тиазолидиндионов, ингибиторов DPP-4, агонистов рецептора GLP-1, ингибиторов SGLT2.

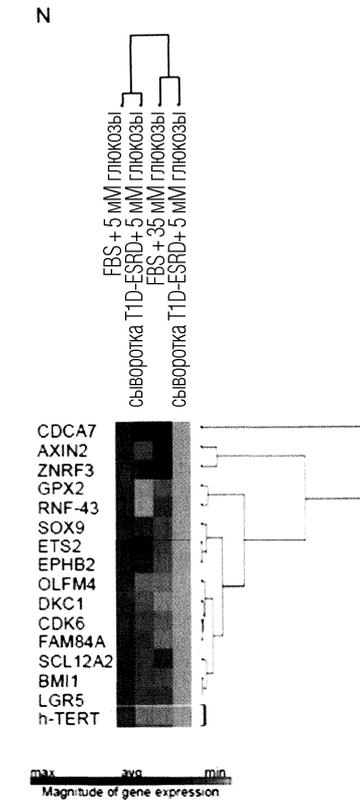
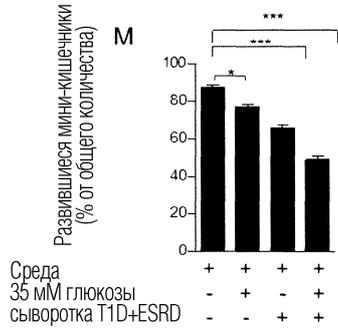
12. Фармацевтическая композиция по п.11, где сульфонилкарбамиды выбраны из глибурида, глипизида и глимепирида, меглитиниды выбраны из репаглинида и натеглинида, тиазолидиндионы выбраны из росиглитазона и пиоглитазона, ингибиторы DPP-4 выбраны из ситаглиптина, саксаглиптина и линаглиптина, агонисты рецептора GLP-1 выбраны из эксенатида и лираглутида, и ингибиторы SGLT2 выбраны из канаглифлозина и дапаглифлозина.



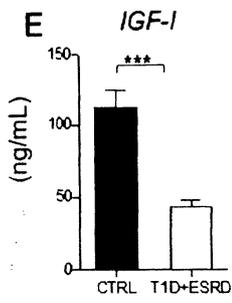
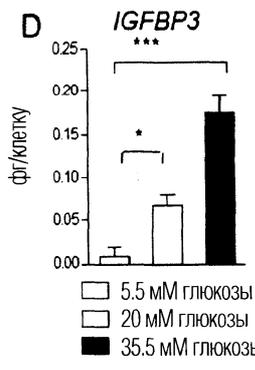
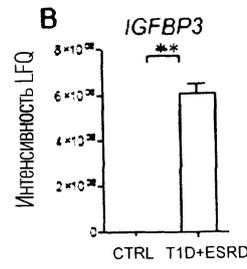
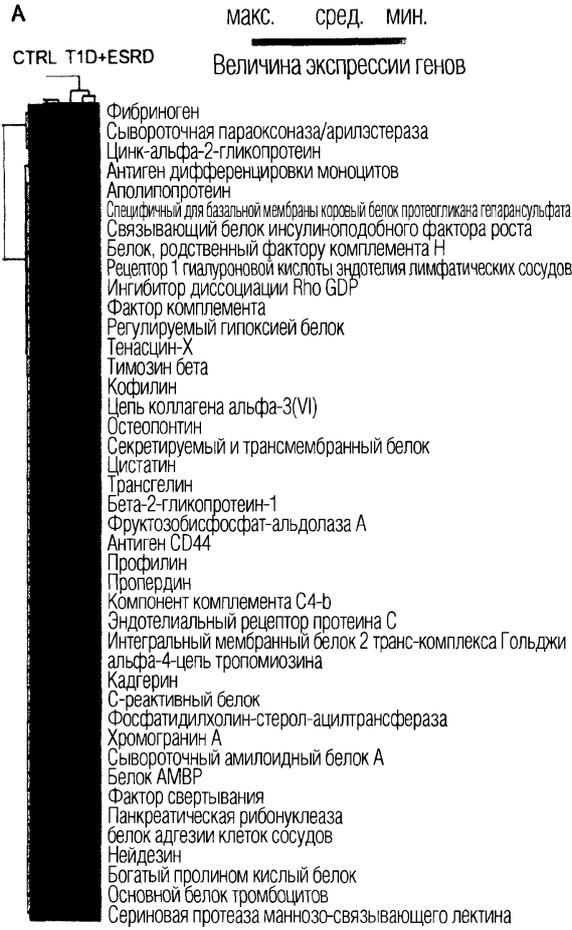


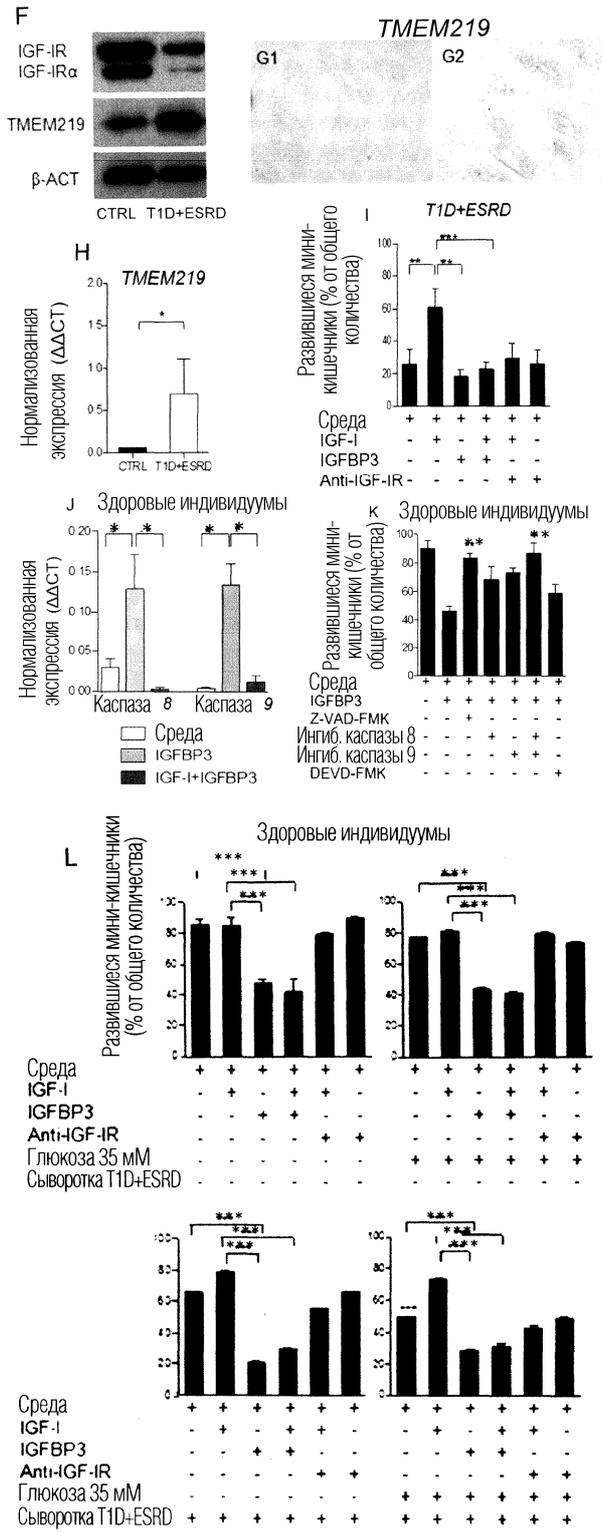
Фиг. 1



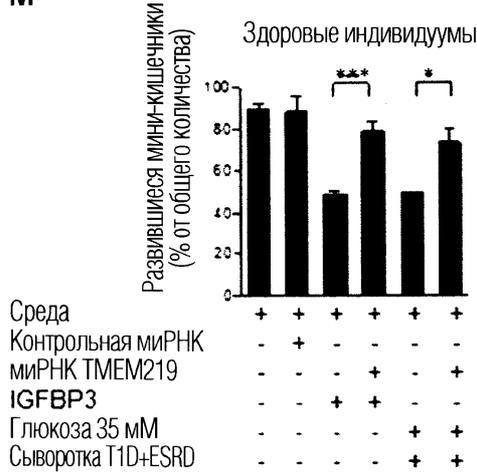


Фиг. 2

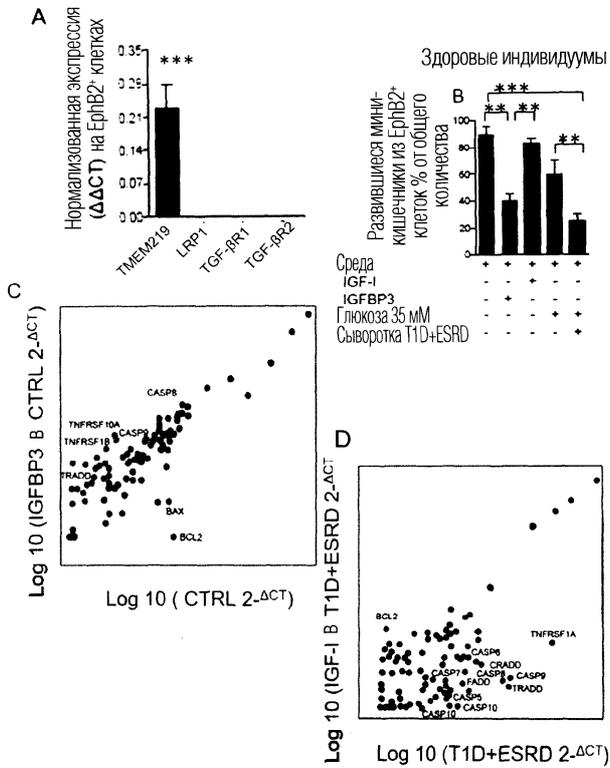




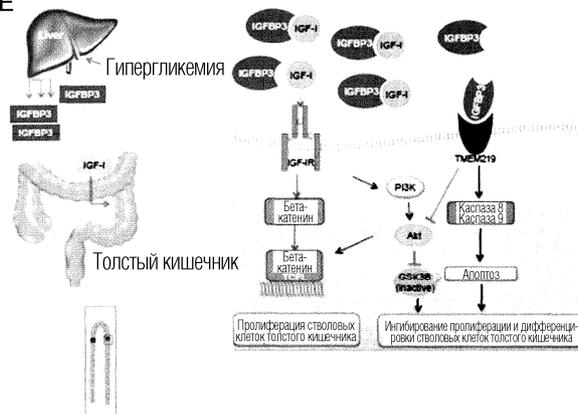
М

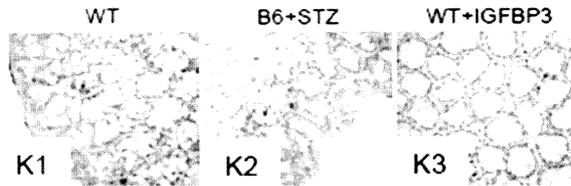
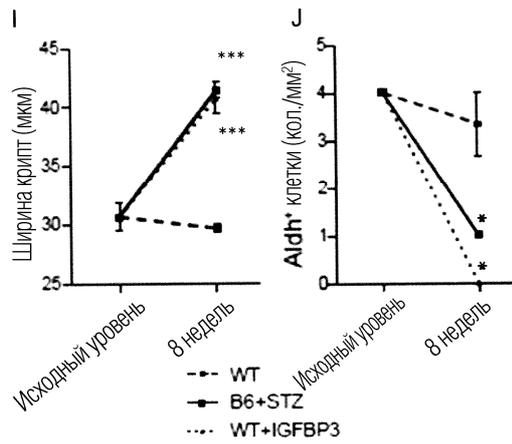
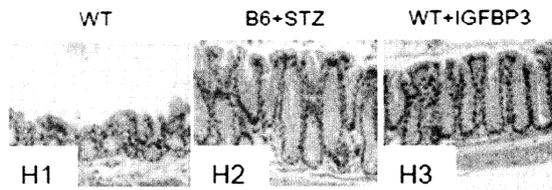
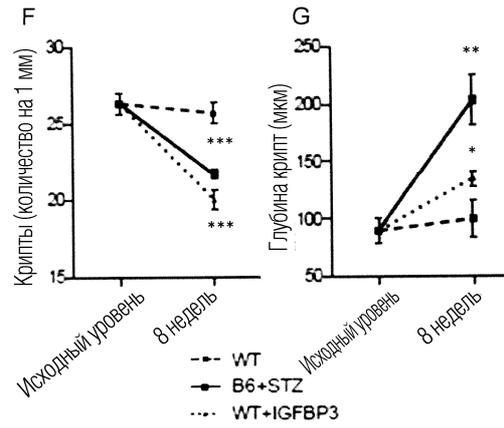


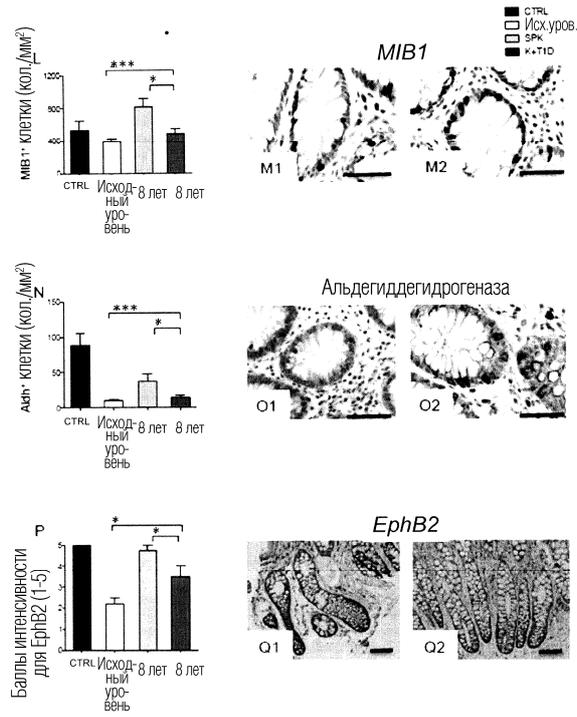
Фиг. 3



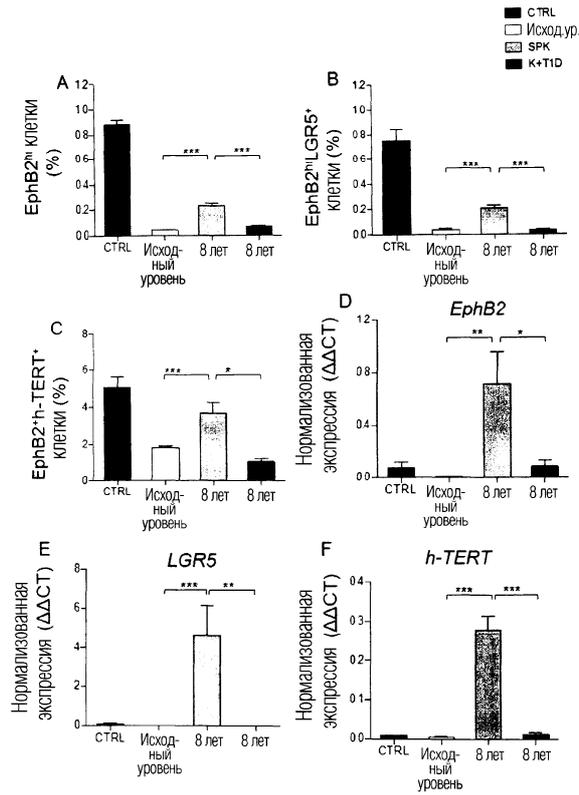
Е

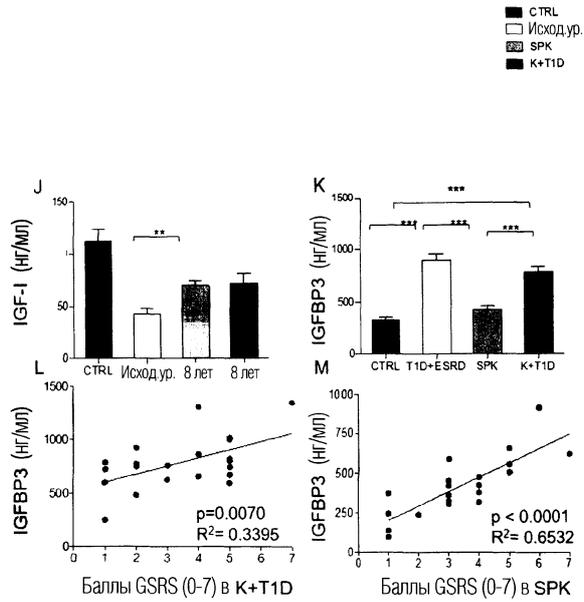
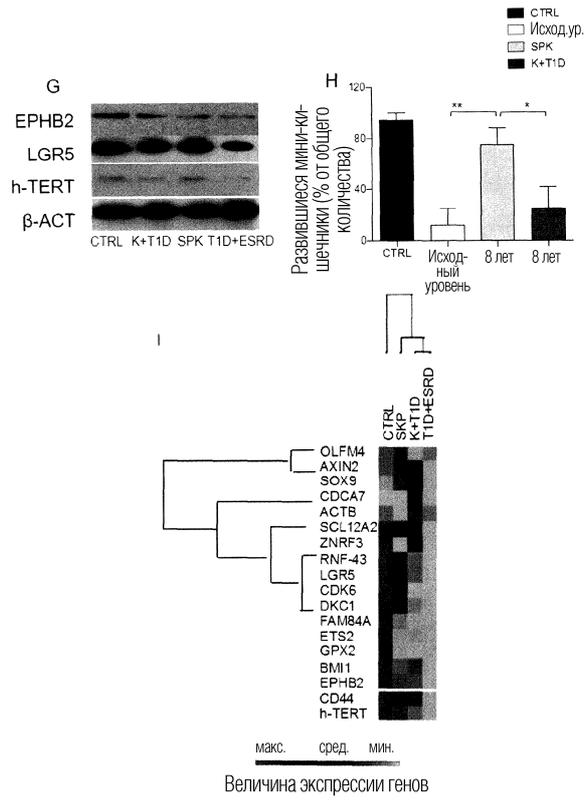




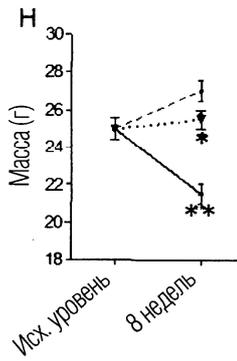
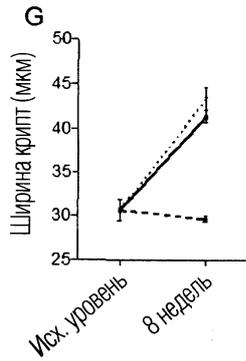
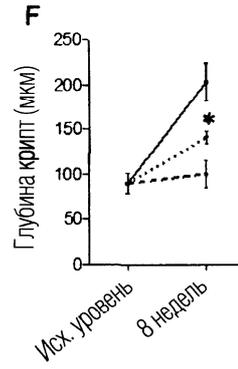
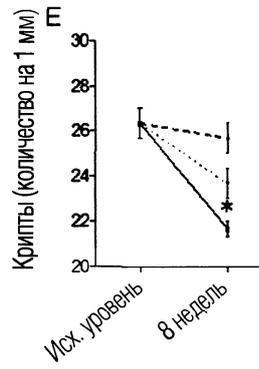
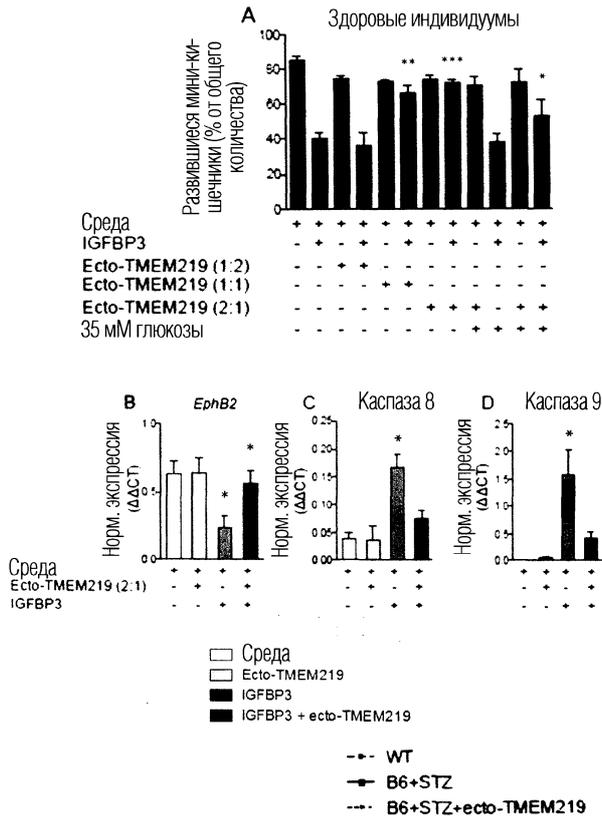


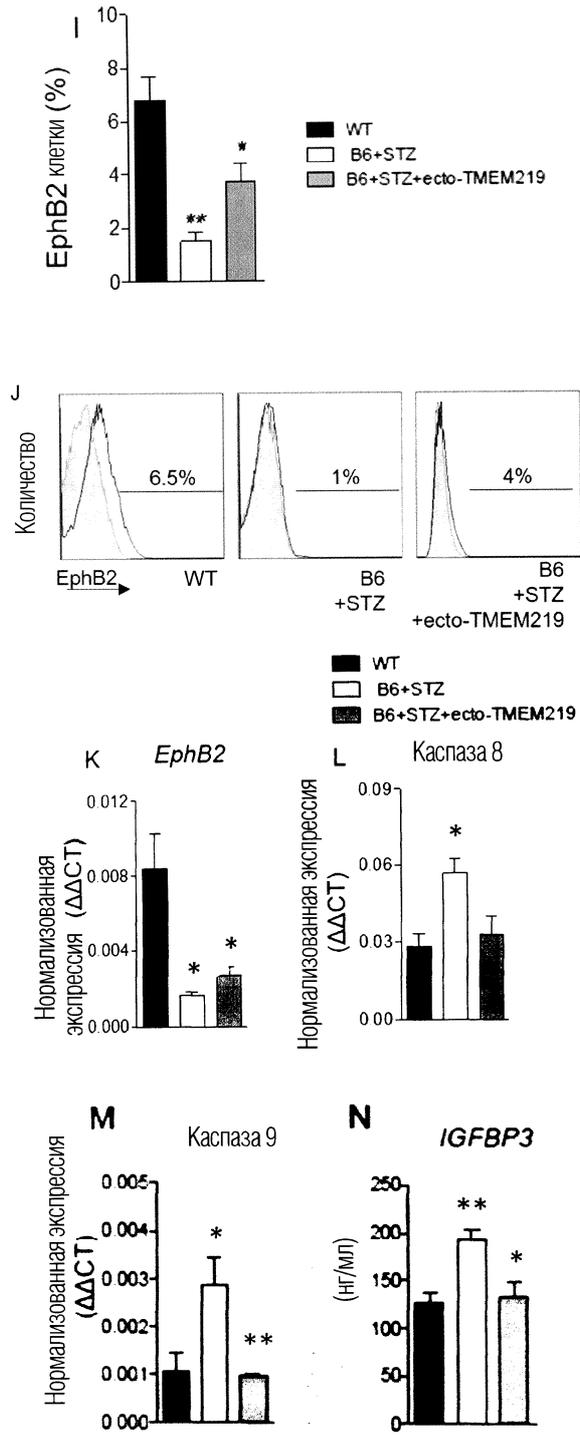
Фиг. 4



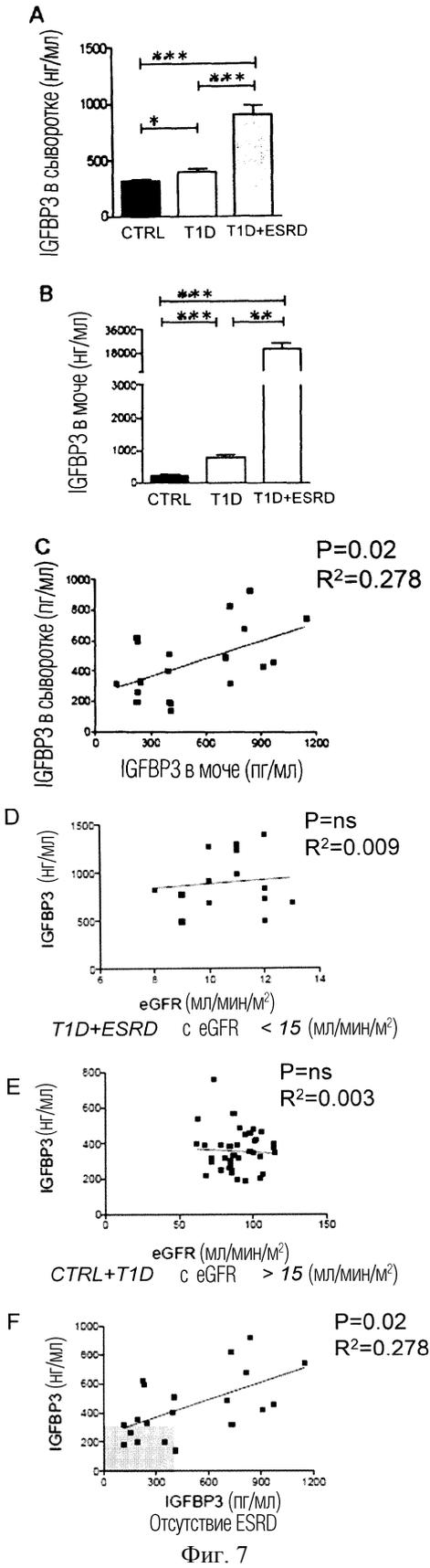


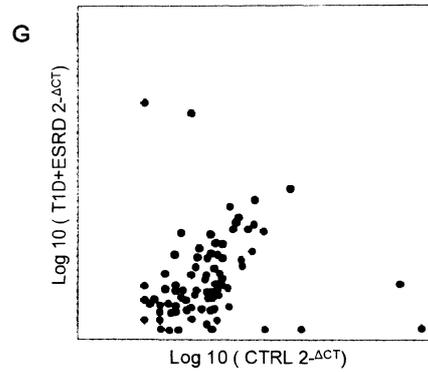
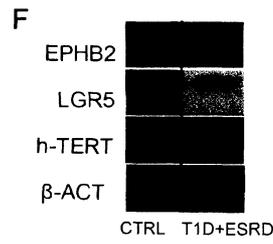
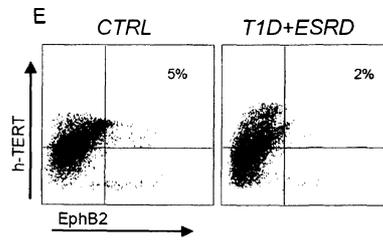
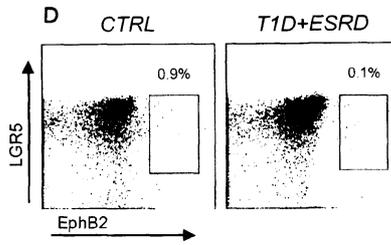
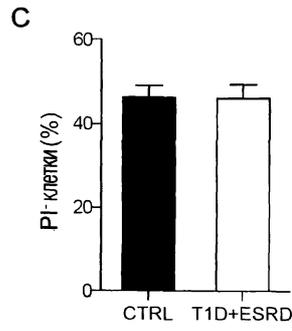
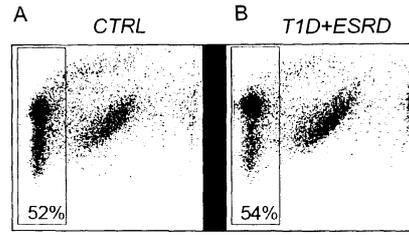
Фиг. 5

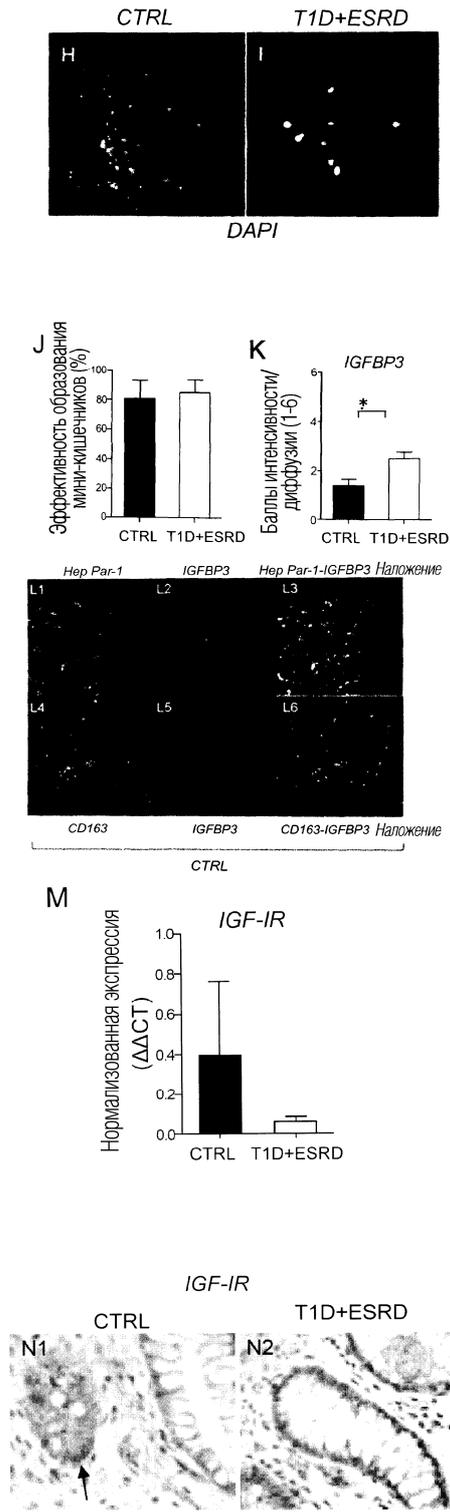




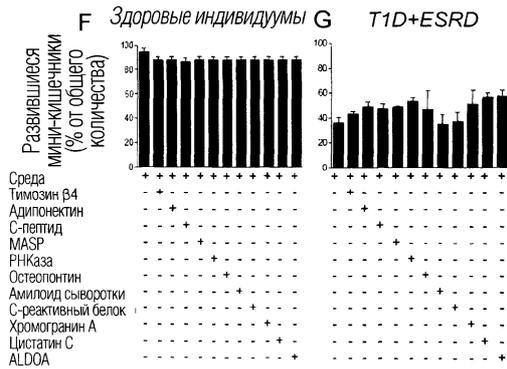
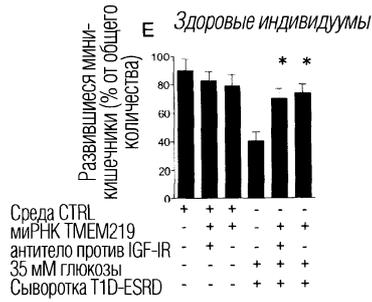
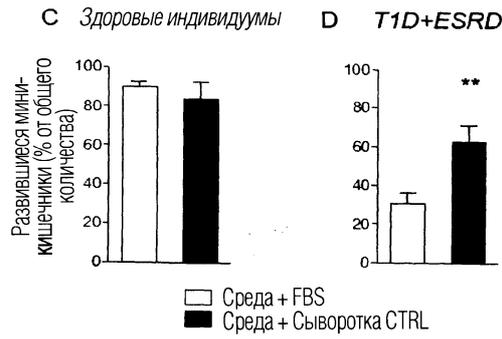
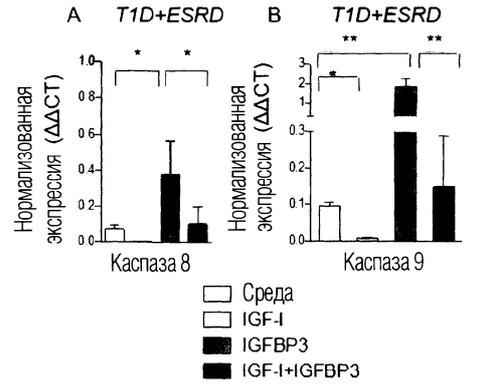
Фиг. 6





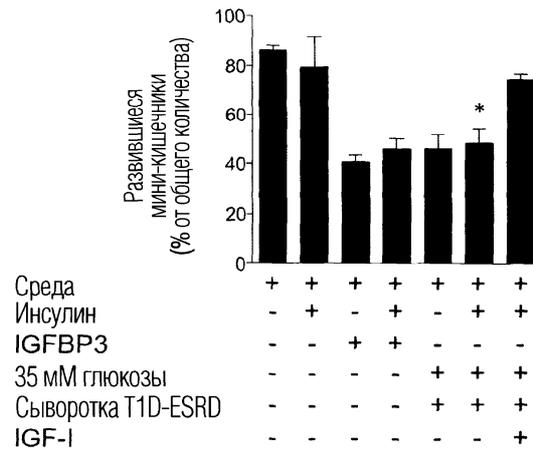


Фиг. 8

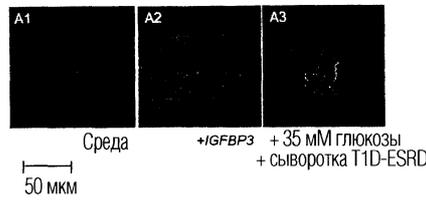


Н

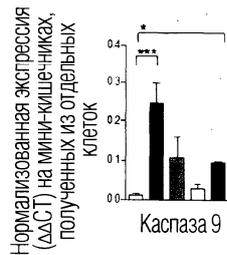
Здоровые индивидуумы



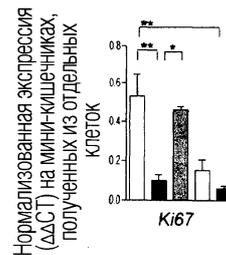
Фиг. 9

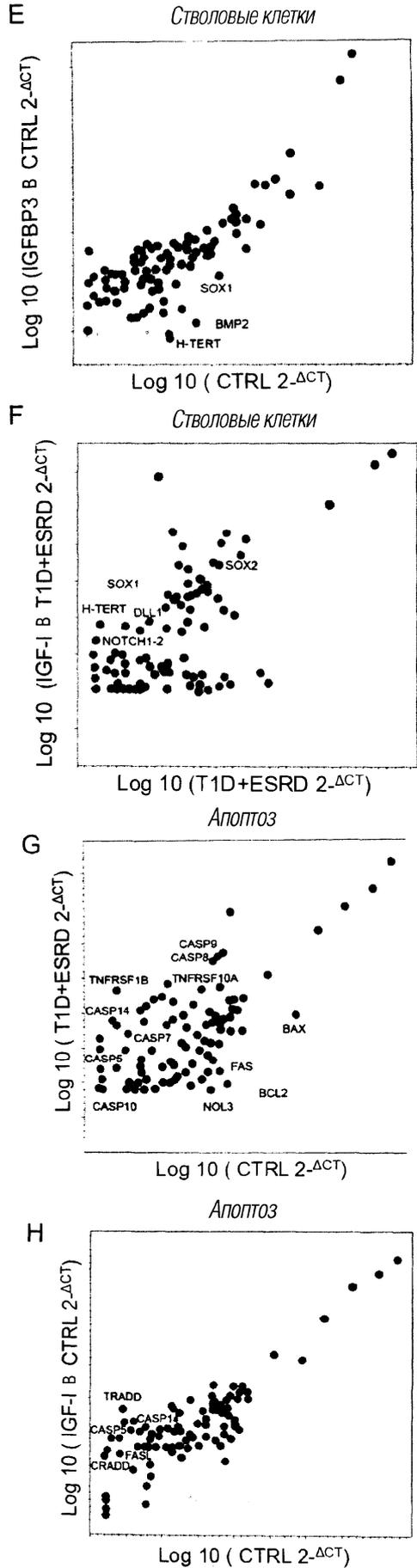


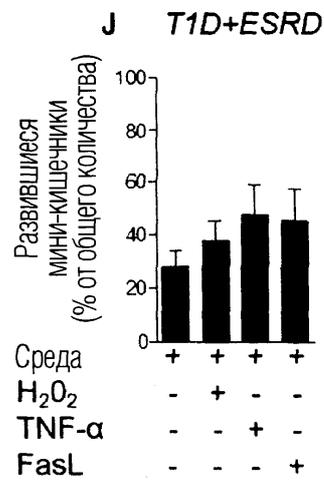
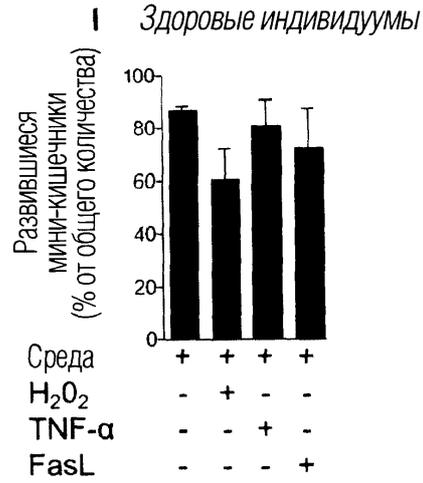
с Здоровые индивидуумы



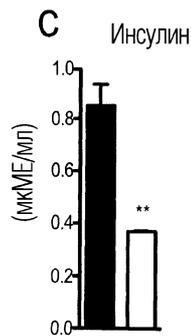
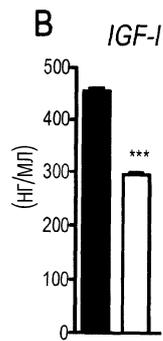
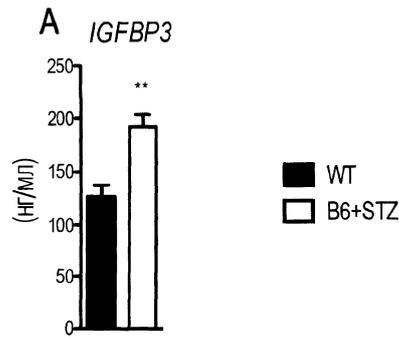
д Здоровые индивидуумы

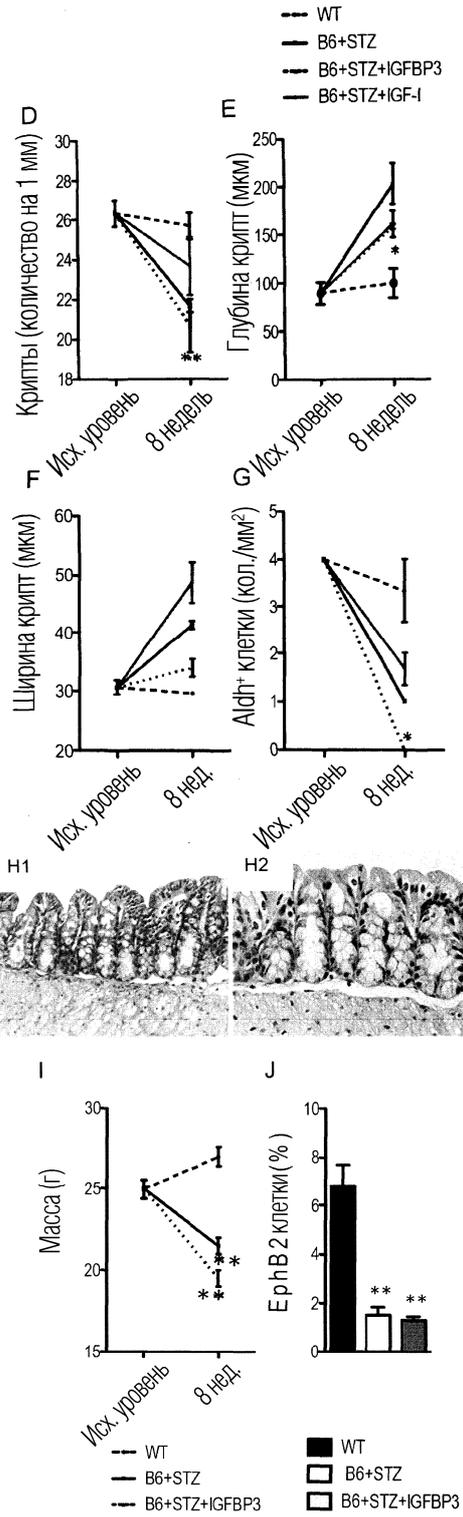


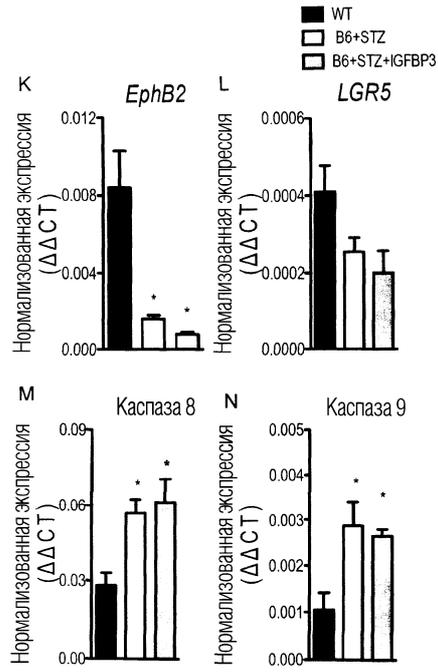




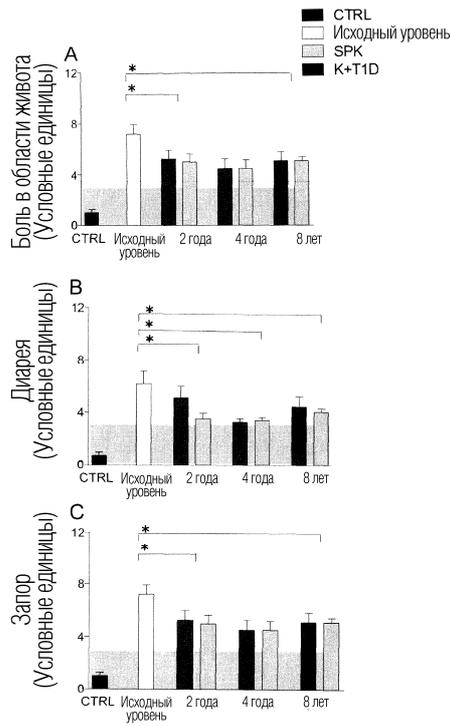
Фиг. 10

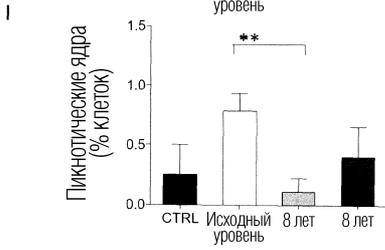
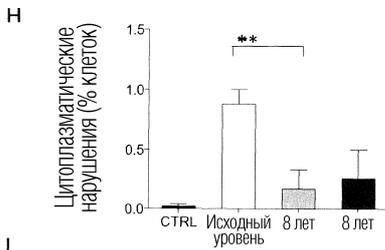
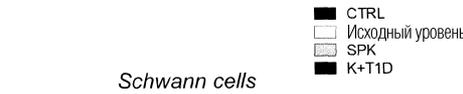
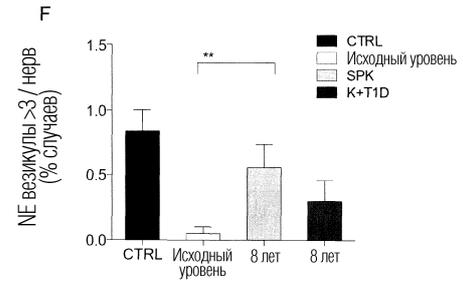
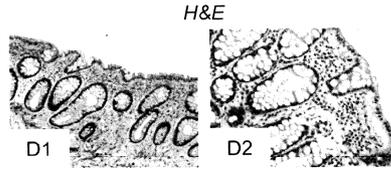


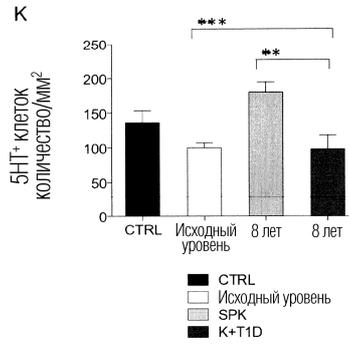
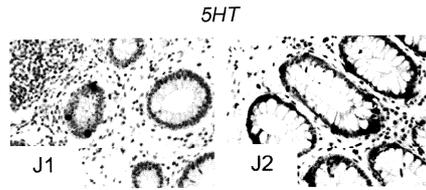




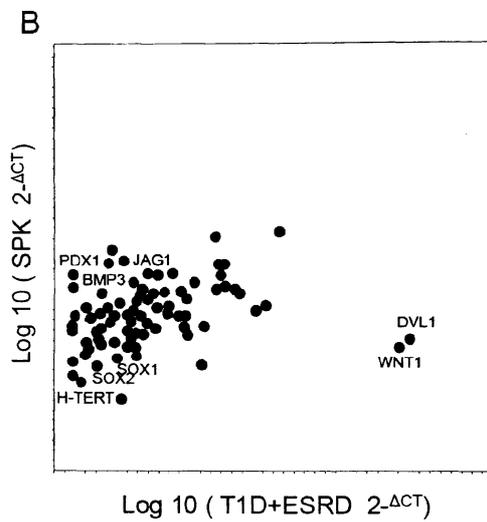
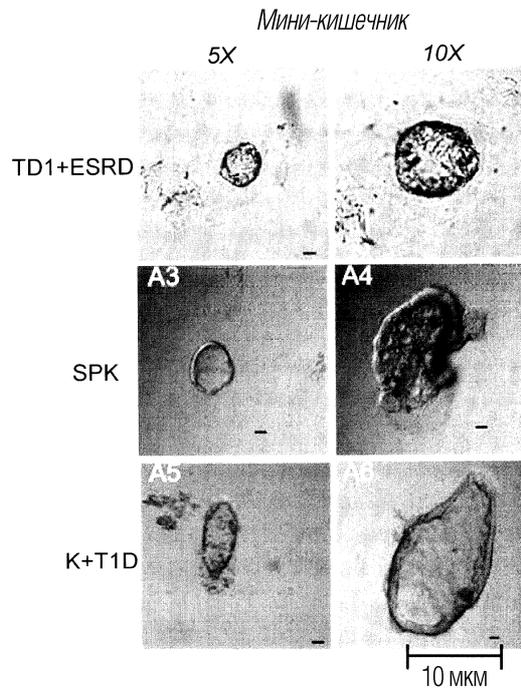
Фиг. 11

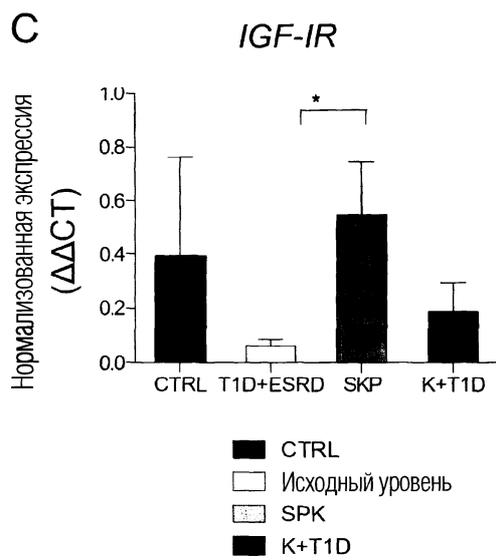




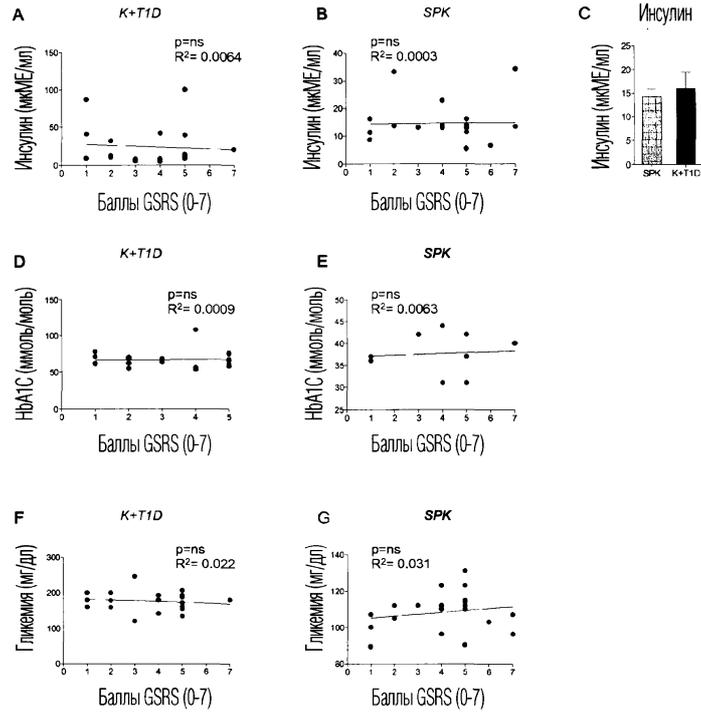


Фиг. 12

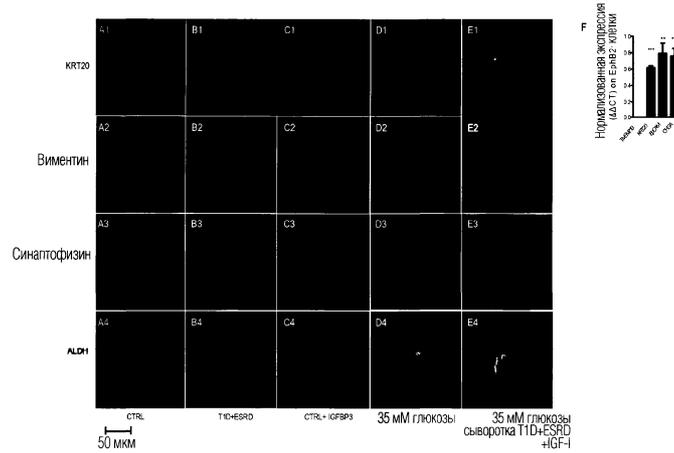




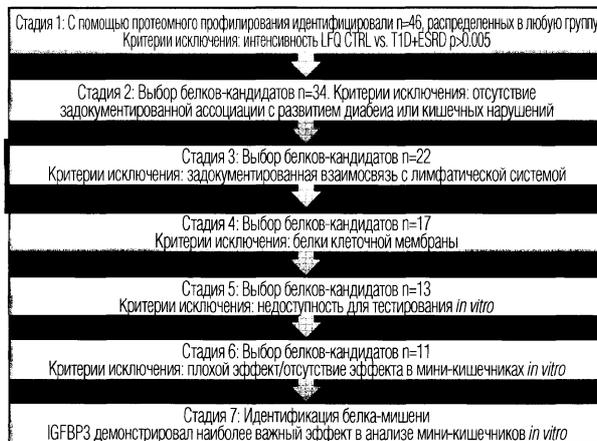
Фиг. 13



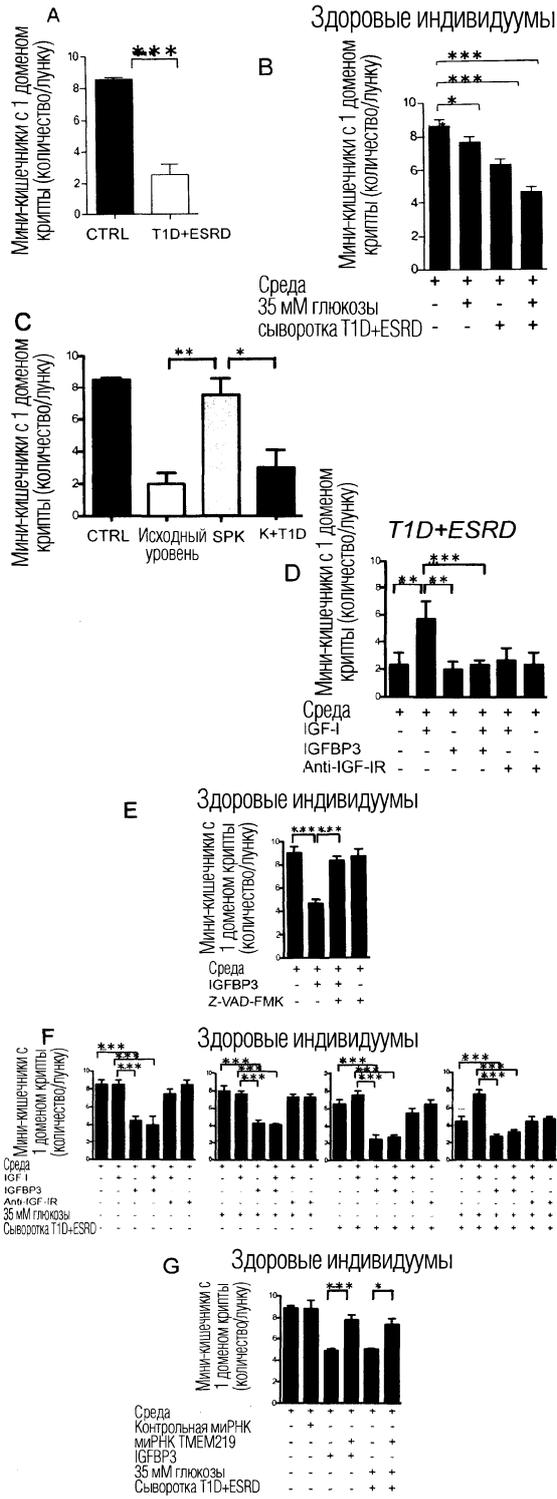
Фиг. 14

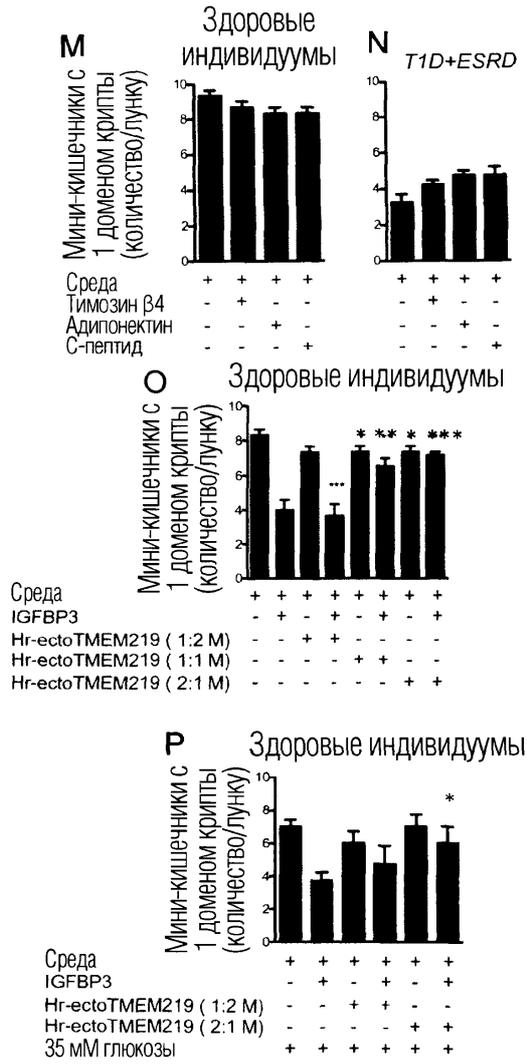


Фиг. 15

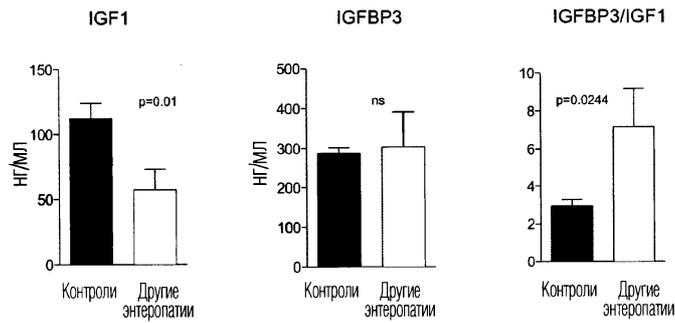


Фиг. 16

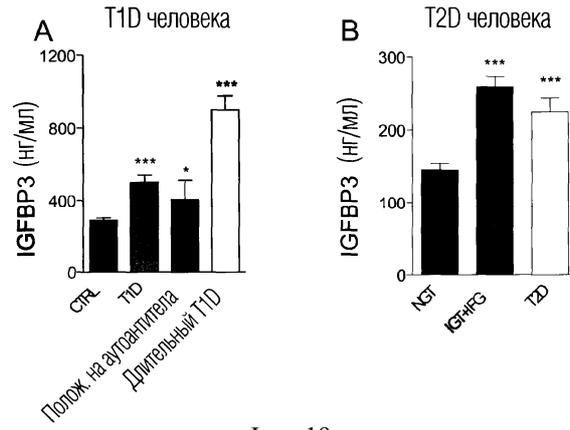




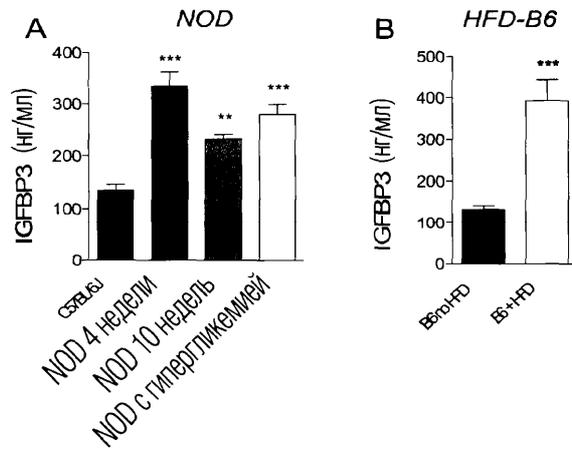
Фиг. 17



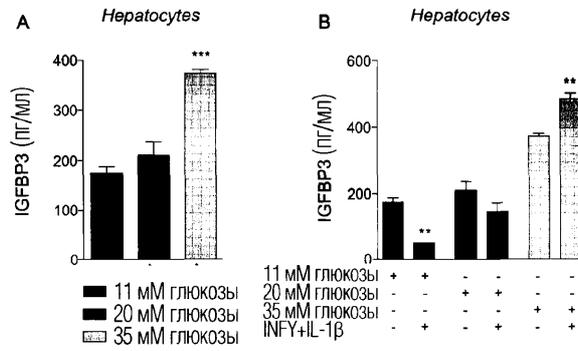
Фиг. 18



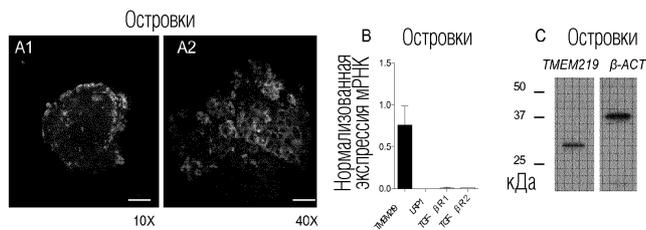
Фиг. 19



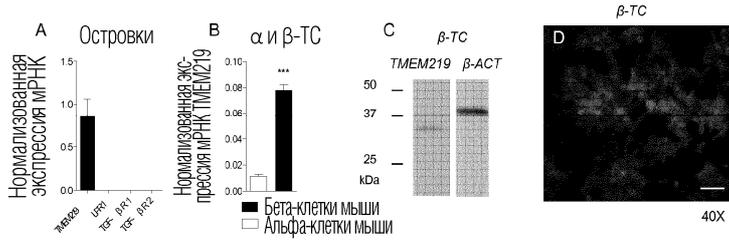
Фиг. 20



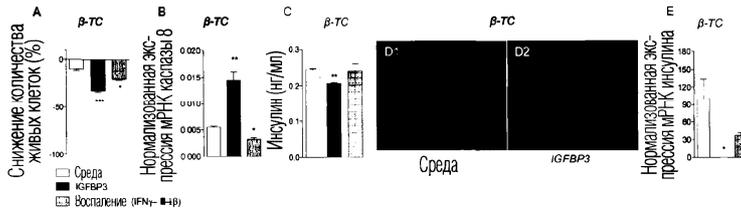
Фиг. 21



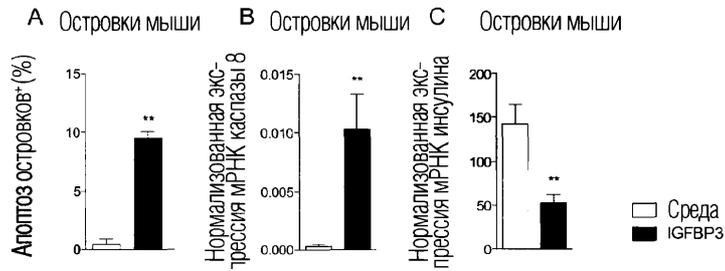
Фиг. 22



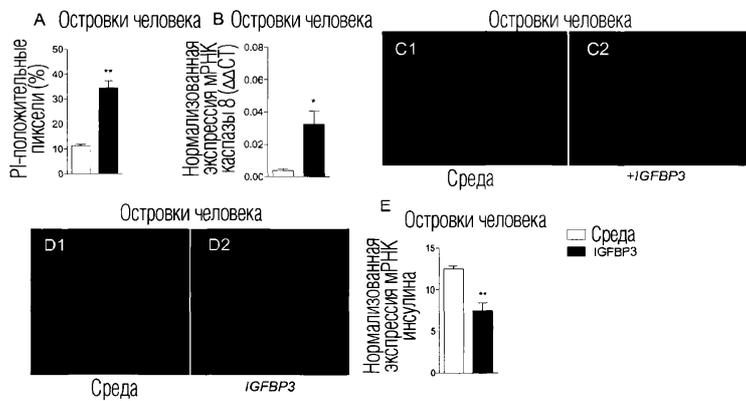
Фиг. 23



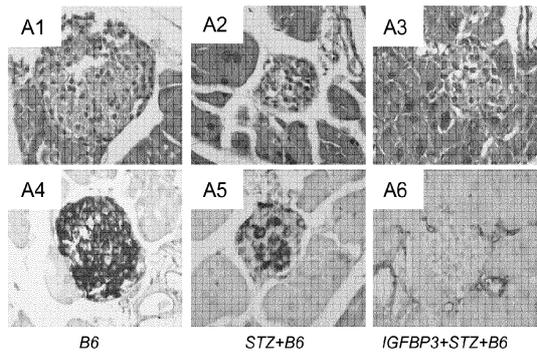
Фиг. 24



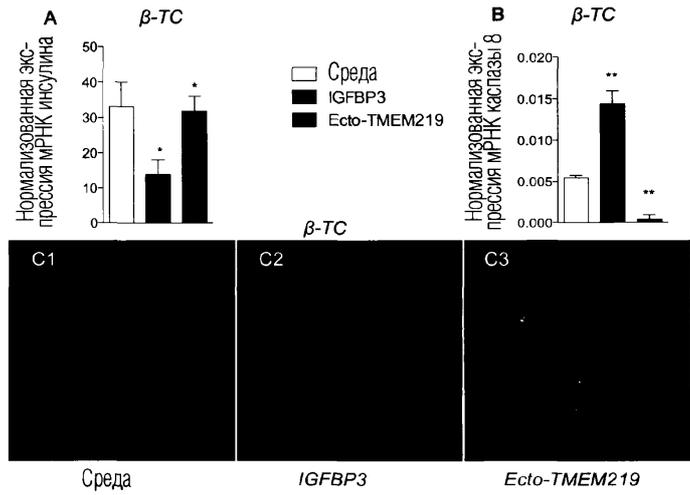
Фиг. 25



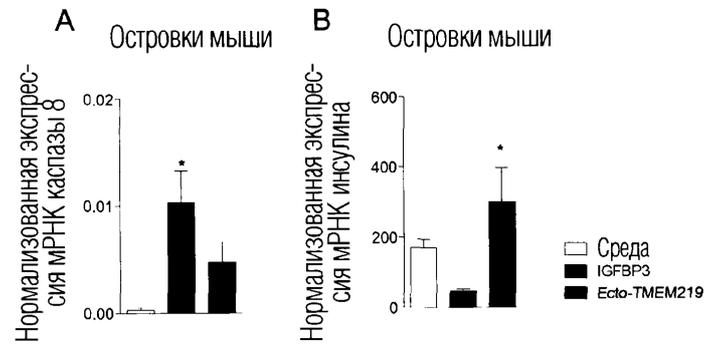
Фиг. 26



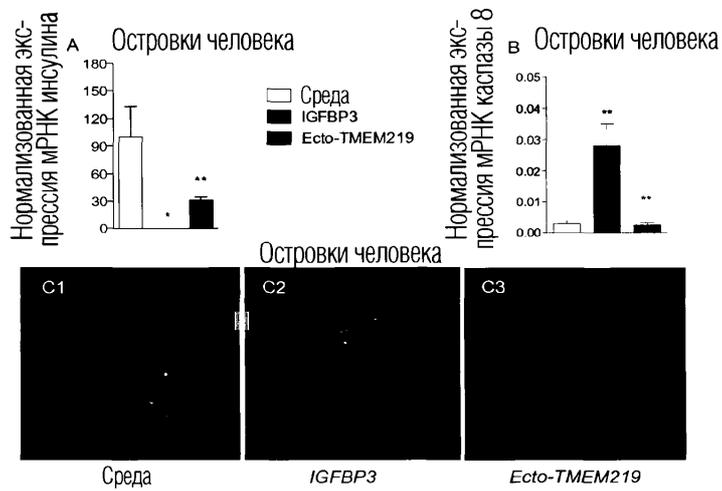
Фиг. 27



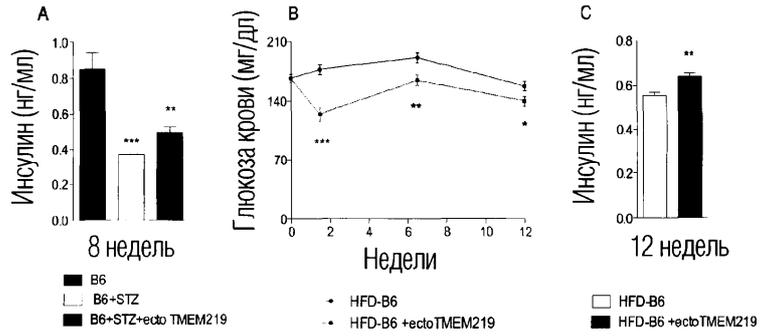
Фиг. 28



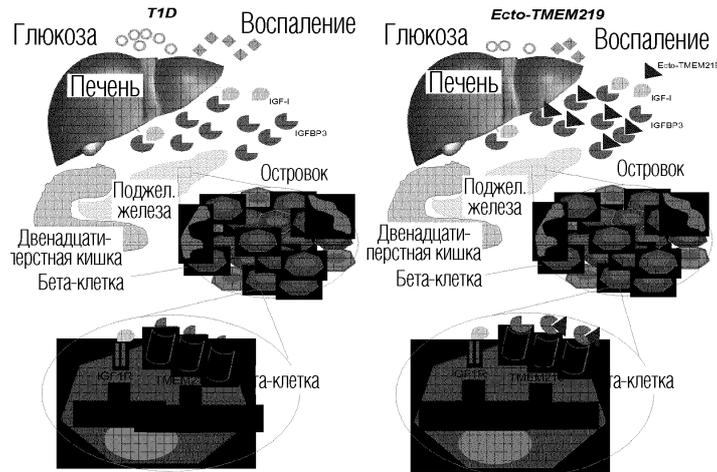
Фиг. 29



Фиг. 30



Фиг. 31



Фиг. 32

