



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.06.02

(21) Номер заявки
201791508

(22) Дата подачи заявки
2015.12.30

(51) Int. Cl. **A61K 48/00** (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)
C12N 15/861 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)
A61P 5/48 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)

(54) СПОСОБЫ ТРАНСДИФФЕРЕНЦИРОВКИ И СПОСОБЫ ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

(31) **62/098,050**

(32) **2014.12.30**

(33) **US**

(43) **2018.05.31**

(86) **PCT/IL2015/051267**

(87) **WO 2016/108237 2016.07.07**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ОРДЖЕНИСИС ЛТД.; ТЕЛ
ХАШОМЕР МЕДИКАЛ РИСЕРЧ,
ИНФРАСТРАКЧЕ ЭНД СЕРВИСИЗ
ЛТД (IL)

(72) Изобретатель:
Фербер Сара (IL)

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

(56) **WO-A2-2010022395**
WO-A1-2004098646

Sapir, Tamar et al.: "Cell-replacement therapy for diabetes: Generating functional insulin-producing tissue from adult human liver cells." Proceedings of the National Academy of Sciences 102.22 (31.05.2005): 7964-7969. Retrieved from the Internet on: 05.04.2016; URL: <http://www.pnas.org/content/102/22/7964.full.pdf>, 31 May 2005 (2005/05/31), whole document, page 7969 right hand col. last para., page 7964 right hand col. last para., page 7965 right hand col. last para., page 7966 left hand col. 2nd para., Fig. 2a, 3, 4

Sarah Ferber PhD, Sheba Medical ctr, Tel Aviv university and Orgenesis Ltd.; "Transdifferentiation And Its Implementation In Autologous Cell Replacement Therapy For Diabetes"; online presentation, pages 1-35; upload date: 29.05.2014. Retrieved from the Internet on: 11.04.2016; URL: <http://medical.wesrch.com/paper-details/pdf-MEIXX F8N4RZNR-transdifferentiation-and-its-implementation-in>

-autologous-cell-replacement-therapy-for-diabetes#page4, 29 May 2014 (2014/05/29), whole document, pages 7, 12, 14, 15, 22, 25, 29, 32, 35

WO-A2-2009126927

Meivar Levy, Irit et al.: "Pancreatic and duodenal homeobox gene 1 induces hepatic dedifferentiation by suppressing the expression of CCAAT/enhancer?binding protein?" Hepatology 46.3 (15.09.2007): 898-905. Retrieved from the Internet on: 11.04.2016; URL: https://www.researchgate.net/profile/Eli_Mor/publication/6135085_Pancreatic_and_duodenal_homeobox_gene_1_induces_hepatic_dedifferentiation_by_suppressing_the_expression_of_CCAAT_enhancer-binding_protein_/links/556cbc6c08aec226830547a2.pdf, 15 Sep 2007 (2007/09/15), Fig. 3

Berneman-Zeitouni, Dana, et al.: "The temporal and hierarchical control of transcription factors-induced liver to pancreas transdifferentiation." PloS one 9.2 (04.02.2014): e87812. Retrieved from the internet on: 05.04.2016; URL: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.008781204>, Feb 2014 (2014/02/04), whole document

Meivar-Levy, Irit et al.: "Human liver cells expressing albumin and mesenchymal characteristics give rise to insulin-producing cells." Journal of transplantation 2011 (24.08.2011). Retrieved from the Internet on: 12.04.2016; URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3163017/>, 24 Aug 2011 (2011/08/24), whole document, page 10 left hand col. 2nd para.

Yu-ting, A., Wilfred Ip, and Tianru Jin. "The role of the Wnt signaling pathway in incretin hormone production and function." Frontiers in physiology 3 (12.07.2012). Retrieved from the Internet on: 12.04.2016; URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3429047/>, 12 Jul 2012 (2012/07/12), page 4 left hand col. 2nd para., page 6 right hand col. last para. - page 8 left hand col. 1st para., Fig. 5

Ham, Dong-Sik, et al.: "Generation of insulin producing cells from the mouse primary hepatocytes." Tissue Eng Reg Med 8 (2011): 564-573. Retrieved from the internet on: 05.04.2016; URL: <http://www.pnas.org/content/102/22/7964.full.pdf>, 31 Dec 2011 (2011/12/31), whole document

(57) В изобретении раскрыт способ получения популяции клеток, продуцирующих человеческий инсулин, из непанкреатических β -клеток, причем полученные клетки, продуцирующие инсулин, имеют повышенное содержание инсулина или повышенную секрецию инсулина, регулируемую глюкозой, или их комбинацию.

Область техники

Представленное в настоящем документе раскрытие предусматривает способ крупномасштабного получения клеток, продуцирующих человеческий инсулин, причем клетки, продуцирующие инсулин, включают трансдифференцированные непанкреатические β -клетки, которые продуцируют инсулин под влиянием глюкозы.

Уровень техники

Бета-клетки островков Лангерганса в поджелудочной железе секретируют инсулин в ответ на такие факторы, как аминокислоты, глицеральдегид, свободные жирные кислоты и, наиболее отчетливо, на глюкозу. Способность нормальных бета-клеток островков воспринимать повышение концентрации глюкозы в крови и реагировать на повышенные уровни глюкозы путем секреции инсулина имеет решающее значение для контроля уровня глюкозы в крови. Повышенная секреция инсулина в ответ на углеводную нагрузку предотвращает гипергликемию у нормальных особей, путем стимуляции поглощения глюкозы в периферических тканях, особенно в мышцах и жировой ткани.

Особи, у которых нарушена функция бета-клеток островков, страдают диабетом. Инсулинзависимый сахарный диабет или ИЗСД (также известный как подростковый или диабет I типа) составляет примерно 10% всех случаев диабета человека. ИЗСД отличается от неинсулинзависимого диабета (НИЗСД), поскольку только ИЗСД включает специфическое разрушение бета-клеток островков Лангерганса, продуцирующих инсулин. Разрушение бета-клеток при ИЗСД, по-видимому, является результатом специфической аутоиммунной атаки, в которой собственная иммунная система пациента распознает и разрушает бета-клетки, но не окружающие альфа-клетки (продуцирующие глюкагон) или дельта-клетки (продуцирующие соматостатин), которые содержатся в островке.

Варианты лечения ИЗСД сосредоточены на самоинъекции инсулина, что является неудобным и неточным способом. Таким образом, разработка новых терапевтических стратегий весьма желательна. Была исследована возможность трансплантации фрагмента островков или поджелудочной железы как средства постоянной замены инсулина. В существующих методологиях используются как трупные материалы, так и свиные островки в качестве субстратов для трансплантации. Однако значительными проблемами, которые требуется преодолеть, являются низкая доступность донорской ткани, изменчивость и низкая производительность островков, полученных путем диссоциации, а также ферментативное и физическое разрушение, которое может возникнуть в результате процесса выделения. Кроме того, существуют проблемы иммунного отторжения и распространенные проблемы с ксенотрансплантацией при использовании островков свиней.

Понятно, что остается критическая необходимость в создании альтернатив лечению диабета путем самоинъекции инсулина. Хотя исследования стволовых клеток показали в этом отношении перспективу, успеха не было. Существует необходимость в улучшенных процедурах выделения, культивирования и трансдифференцировки непанкреатических клеток, которые будут использоваться для лечения диабета. Раскрытые в настоящем документе способы включают крупномасштабное производство трансдифференцированных не бета-клеток поджелудочной железы, которые секретируют инсулин. Эти трансдифференцированные клетки могут использоваться при трансплантационной терапии, устраняя необходимость в многочисленных самоинъекциях инсулина, которые теперь необходимы для лечения диабета.

Сущность изобретения

В одном аспекте, раскрытом в настоящем документе, предусмотрен способ получения популяции клеток, продуцирующих человеческий инсулин, причем способ включает этапы: получения ткани печени взрослого человека; обработки указанной ткани печени для извлечения первичных клеток печени взрослого человека; распространения и размножения указанных первичных клеток печени взрослого человека до заданного количества клеток; трансдифференцировки указанных размноженных клеток и сбора указанной трансдифференцированной размноженной культуры; таким образом позволяя производить указанную популяцию клеток, продуцирующих человеческий инсулин, с повышенным содержанием инсулина или повышенной секрецией инсулина, регулируемой глюкозой, или любой их комбинацией по сравнению с контрольными нетрансдифференцированными клетками печени.

В родственном аспекте более 70% указанной популяции клеток, продуцирующих человеческий инсулин, экспрессирует эндогенный PDX-1. В дополнительном родственном аспекте клетки, экспрессирующие PDX-1, также экспрессируют эндогенный NeuroD1, или MafA, или любую их комбинацию. В еще одном родственном аспекте менее 5% популяции, экспрессирующей PDX-1, экспрессирует альбумин и альфа-1-антитрипсин.

В родственном аспекте повышенное содержание выработанного инсулина в клетках составляет по меньшей мере 5% увеличение по сравнению с контрольными клетками, которые не трансдифференцированы.

В другом аспекте ткань печени получена от субъекта, страдающего от панкреатического диабета или от инсулинзависимого диабета. В родственном аспекте популяция клеток, продуцирующих человеческий инсулин, является аутологичной для пациента, нуждающегося в такой терапии инсулином. В другом родственном аспекте популяция клеток, продуцирующих человеческий инсулин, является аллогенной для пациента, нуждающегося в такой терапии инсулином.

В родственном аспекте способ включает распространение и размножение указанных клеток печени посредством серии этапов субкультивирования вплоть до системы продуцирования в биореакторе. В другом аспекте биореакторная система включает один биореактор или несколько биореакторов. В другом родственном аспекте биореактор включает одноразовый биореактор, многоразовый биореактор, биореактор с замкнутой системой или биореактор с открытой системой или любую их комбинацию. В другом родственном аспекте трансдифференцирование указанных размноженных клеток включает трансдифференцировку через серию систем биореакторов.

В родственном аспекте трансдифференцирование включает инфицирование указанных размноженных клеток аденовирусным вектором, содержащим нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид PDX-1 человека, причем указанное инфицирование происходит в первый период времени; инфицирование указанных размноженных клеток (а) аденовирусным вектором, содержащим нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид NeuroDI человека или полипептид Pax4, причем указанное инфицирование происходит во второй период времени; и инфицирование указанных размноженных клеток (b) аденовирусным вектором, содержащим нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид человека MafA, причем указанный инфекционный материал в третий период времени.

В другом родственном аспекте трансдифференцирование включает инфицирование указанных размноженных клеток аденовирусным вектором, содержащим нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид PDX-1 человека и кодирующую полипептид второго панкреатического фактора транскрипции, причем указанное инфицирование происходит в первый период времени и инфицирование указанных размноженных клеток (а) аденовирусным вектором, содержащим нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид человека MafA, причем указанное инфицирование происходит во второй период времени. В дополнительном родственном аспекте второй панкреатический фактор транскрипции выбирают из NeuroDI и Pax4.

В другом родственном аспекте способ дополнительно включает обогащение указанных первичных клеток печени взрослого человека для клеток, предрасположенных к трансдифференцировке. В дополнительном родственном аспекте предрасположенные клетки включают перипериферальные клетки печени. В еще одном родственном аспекте предрасположенные клетки включают клетки, содержащие активный Wnt-сигнальный путь; способность активации элемента ответа глютаминсинтазы (GSRE); увеличенную экспрессию HOMER 1, LAMP3, ITGA6, DCBLD2, THBS1, VAMP4 или BMPR2 или любую их комбинацию; уменьшенную экспрессию ABCB1, ITGA4, ABCB4 или PRNP или любой их комбинации; или любую их комбинацию.

В другом соответствующем аспекте способ дополнительно включает обработку первичной популяции клеток печени взрослого человека литием, причем указанная обработанная популяция обогащена клетками, предрасположенными к трансдифференцировке. В другом родственном аспекте обработка литием происходит до трансдифференцировки.

В одном аспекте, раскрытом в настоящем документе, представлена популяция клеток, продуцирующих человеческий инсулин, полученная способом, включающим этапы получения ткани печени взрослого человека; обработки указанной ткани печени для извлечения первичных клеток печени взрослого человека; распространения и размножения указанных первичных клеток печени взрослого человека до заданного количества клеток; трансдифференцировки указанных размноженных клеток; и сбор указанной трансдифференцированной размноженной культуры; при этом указанная популяция клеток, продуцирующих человеческий инсулин, имеет повышенное содержание инсулина или повышенную секрецию инсулина, регулируемую глюкозой, или любую их комбинацию по сравнению с контрольными не-трансдифференцированными клетками печени.

В родственном аспекте более 70% популяции клеток, продуцирующих человеческий инсулин, экспрессирует эндогенный PDX-1. В дополнительном родственном аспекте клетки, экспрессирующие PDX-1, также экспрессируют эндогенный NeuroDI, или MafA, или любую их комбинацию. В еще одном родственном аспекте менее 5% популяции, экспрессирующей PDX-1, экспрессирует альбумин и альфа-1-антитрипсин.

В другом родственном аспекте популяция клеток, продуцирующих человеческий инсулин, имеет повышенное содержание инсулина, составляющее по меньшей мере 5% увеличение по сравнению с указанными контрольными клетками.

В другом родственном аспекте популяция клеток, продуцирующих человеческий инсулин, предназначена для использования в клеточной терапии для пациента, страдающего панкреатитом или инсулин-зависимым диабетом. В дополнительном родственном аспекте клетки являются аутологичными или аллогенными по отношению к пациенту.

В другом аспекте, раскрытом в настоящем документе, представлена композиция, содержащая популяцию клеток, продуцирующих человеческий инсулин, и фармацевтически приемлемый носитель.

Краткое описание графических материалов

Объект изобретения, рассматриваемый как трансдифференцированные не бета-клетки поджелудочной железы с фенотипом и функцией клеток поджелудочной железы и способы их изготовления, обозначен и отчетливо заявлен в заключительной части описания. Однако трансдифференцированные не бета-

клетки поджелудочной железы, имеющие фенотип и функцию клеток поджелудочной железы, как в отношении организации, так и способа работы вместе с объектами, особенностями и преимуществами, могут быть лучше поняты со ссылкой на следующее подробное описание при чтении с прилагаемыми графическими материалами, на которых

на фиг. 1A-1D проиллюстрировано, что экспрессия PDX-1 в клетках печени человека *in vitro* индуцирует постепенную активацию экспрессии гормона поджелудочной железы. (фиг. 1A) Инсулин (INS); (фиг. 1B) глюкагон (GCG); (фиг. 1C) соматостатин (SST); и (фиг. 1D) другие специфичные для поджелудочной железы факторы транскрипции ("пТФ") (NKX6.1, ISL1, PAX4, MAFA, NeuroD1, NeuroG3). Результаты были нормированы по экспрессии гена β -актина в пределах одного и того же образца кДНК и представлены в виде среднего $\pm$ SE относительной экспрессии в сравнении с контрольными обработанными вирусом клетками в тот же день. $n \geq 4$ в двух независимых экспериментах (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$);

на фиг. 2A-2D проиллюстрировано, что эктопическая ко-экспрессия панкреатических транскрипционных факторов (пТФ) PDX-1, PAX4 и MafA в клетках печени человека *in vitro* способствует (про)инсулиновой секреции по сравнению с тем, что индуцируется каждым из пТФ по отдельности. (фиг. 2A) Иммунофлуоресцентное (IF) окрашивание демонстрирует экспрессию пТФ: PDX-1 (левая панель), PAX4 (средняя левая панель), MafA (средняя правая панель) и слияние 3 пТФ (правая панель) со стрелками, указывающими клетки, экспрессирующие все три пТФ (фиг. 2B). Люциферазный анализ активации промотора инсулина указанными пТФ; в качестве контроля использовали β -gal. Результаты выражаются как относительная световая единица (RLU)/ мг белка. Каждая точка данных представляет собой среднее значение $\pm$ SE по меньшей мере двух независимых экспериментов, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ по сравнению с контрольными клетками, обработанными вирусом ($n > 4$) (фиг. 2C). Иммунофлуоресцентное окрашивание иллюстрирует инсулин-положительные клетки после эктопической экспрессии указанных пТФ. Исходное увеличение $\times 20$. Количественное определение окраски IF в таблице (справа). Процент инсулин-положительных клеток рассчитывали путем подсчета по меньшей мере 500 положительных клеток по меньшей мере из двух независимых экспериментов (фиг. 2D). Секреция инсулина после инкубации с указанными концентрациями глюкозы была обнаружена радиоиммуноанализом. * $p < 0,05$, $n > 12$ в пяти независимых экспериментах. Значение представляет собой различия между тройной инфекцией и всеми другими видами обработок.

На фиг. 3A-E проиллюстрированы эффекты совмещенной и последовательной экспрессии пТФ PDX-1, PAX4 и MafA на созревание β -клеток поджелудочной железы (фиг. 3A). Схема, демонстрирующая порядок инфицирования пТФ (обработки B-E) или контрольным вирусом (Ad-CMV- β -gal, обработка A). (Фиг. 3B) Иммунофлуоресцентное окрашивание для инсулина: Обработка B (левая панель), обработка C (средняя панель), обработка D (правая панель). Исходное увеличение составляет $\times 20$. Количественное определение окрашивания (в процентах) указывается под каждым изображением. Процент инсулин-положительных клеток рассчитывали путем подсчета по меньшей мере 1000 положительных клеток по меньшей мере из двух независимых экспериментов. (Фиг. 3C) Инсулиновую и (фиг. 3D) С-пептидную секрецию после инкубации с указанной концентрацией глюкозы измеряли радиоиммуноанализом. Инфекционные обработки указаны на оси X и описаны на фиг. 3A. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, по сравнению с контрольными, обработанными вирусом клетками; $n > 12$ в 5 независимых экспериментах. (Фиг. 3E) Уровни экспрессии указанных эндогенных панкреаспецифических факторов транскрипции после указанных обработок (ось X) измеряли с помощью ОТ-ПЦР. Значения СТ нормированы на экспрессию гена β -актина в том же образце кДНК. Результаты представлены как относительные уровни среднего $\pm$ SE относительной экспрессии против контрольных обработанных вирусом клеток, * $p < 0,05$, $n > 8$ в 4 независимых экспериментах. Стрелка указывает на конкретное снижение уровня экспрессии Isl-1 при обработке C.

На фиг. 4A-4C проиллюстрированы три графика, демонстрирующие эффективность трансдифференцировки, что указывает на то, что иерархический последовательный порядок инфицирования (обработка C) является наиболее эффективным. (Фиг. 4A) Активацию промотора инсулина измеряли с помощью анализа люциферазы после указанных инфекционных обработок. Результаты выражаются как относительная световая единица (RLU)/мг белка. Каждая точка данных представляет собой среднее $\pm$ SE по меньшей мере два независимых эксперимента, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, по сравнению с контрольными обработанными вирусом клетками ($n > 4$). (Фиг. 4B) Анализ уровней экспрессии транспортера глюкозы 2 (GLUT2) с помощью ОТ-ПЦР проводили после указанных инфекционных обработок. Значения СТ нормированы по экспрессии гена β -актина в том же образце кДНК. Результаты представлены как относительные уровни среднего $\pm$ SE по сравнению с контрольными обработанными вирусом клетками. * $P < 0,05$, по сравнению с контрольными обработанными вирусом клетками $n > 8$ в 4 независимых экспериментах. (Фиг. 4C) Уровни экспрессии прогормона конвертазы 2 (PC2, PCSK2) определяли с помощью ОТ-ПЦР после указанных инфекционных обработок. Значения СТ нормированы по экспрессии гена β -актина в том же образце кДНК. Результаты представлены как относительные уровни среднего $\pm$ SE по сравнению с контрольными обработанными вирусом клетками ** $P < 0,01$, $n > 8$ в 4 независимых экспериментах.

На фиг. 5A-5B проиллюстрированы два графика, демонстрирующие секрецию С-пептида после ие-

рархического последовательного инфицирования (обработка С). (Фиг. 5А) С-пептидную секрецию измеряли с помощью радиоиммуноанализа статической инкубации в течение 15 мин при 0, 5, 10, 15, 20 мМ глюкозы в клетках, обработанных в прямом "иерархическом" последовательном порядке (обработка С) * $P < 0,05$, $n > 7$ в 3 независимых экспериментах. (Фиг. 5В) С-пептидную секрецию измеряли радиоиммуноанализом в течение 13 или 28 дней в бессывороточной среде, дополненной инсулином, трансферрином и селеном (ITS), перед анализом на секрецию С-пептида. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, $n > 5$ в 2 независимых экспериментах. Значимость представляет собой различия по сравнению со стандартным протоколом (обработка С на 6-й день).

На фиг. 6А-6D представлены четыре графика, иллюстрирующие индивидуальную роль пТФ в процессе трансдифференцировки, с использованием порядка инфицирования С и исключения каждого пТФ (С-PDX-1, исключение PDX-1; С-Pax4, исключение Pax4 и С-MafA, исключение MafA). (Фиг. 6А) Активацию промотора инсулина измеряли с помощью люциферазного анализа. Результаты представлены средним $\pm$ SE, * $p < 0,1$, ** $p < 0,05$ по сравнению с прямым "иерархическим" последовательным порядком инфицирования (обработка С), $n > 6$ в трех независимых экспериментах. (Фиг. 6В) С-пептидная секреция после инкубации в течение 15 мин с указанными концентрациями глюкозы и измеренная с помощью радиоиммуноанализа. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ сравнивается с прямым "иерархическим" последовательным порядком инфицирования (С), $n > 6$ в трех независимых экспериментах. (Фиг. 6С) Уровни экспрессии ферментов поджелудочной железы измеряли с помощью ОТ-ПЦР: Транспортёр глюкозы 2 (GLUT2); глюкокиназа (GCK); и прогормон-конвертаза (PCSK2). (Фиг. 6D) Уровни экспрессии указанных эндогенных пТФ измеряли с помощью ОТ-ПЦР. Значения СТ нормированы на экспрессию гена β -актина в том же образце кДНК. Результаты представлены как относительные уровни среднего $\pm$ SE по сравнению с обработанными клетками печени "иерархически последовательным инфицированием". * $P < 0,05$, ** $p < 0,01$, $n > 6$ в трех независимых экспериментах.

На фиг. 7А-7С проиллюстрированы три графика, показывающие влияние экспрессии INS (инсулина) на созревание β -клеток трансдифференцированных клеток печени после инфицирования "иерархическим" последовательным порядком (обработка С). (Фиг. 7А) Уровни экспрессии инсулина измеряли с помощью ОТ-ПЦР. Значения СТ нормированы по экспрессии гена β -актина в том же образце кДНК. Результаты представлены как относительные уровни среднего $\pm$ SE по сравнению с контрольными обработанными вирусом клетками. * $P < 0,05$, $n > 6$ в 3 независимых экспериментах. (Фиг. 7В) Секрецию инсулина измеряли радиоиммуноанализом. ** $P < 0,01$, $n > 6$ и сравнивается с прямым "иерархическим" последовательным порядком инфицирования (С), $n > 6$ в трех независимых экспериментах. (Фиг. 7С) Уровень экспрессии транспортера глюкозы 2 (GLUT2) измеряли с помощью ОТ-ПЦР.

На фиг. 8А-8G проиллюстрирована индивидуальная роль пТФ в стимуляции дифференциации клеток с образованием глюкагона (α -клеток) и соматостатина (δ -клеток) с использованием иерархического порядка инфицирования (обработка С) и исключения каждого пТФ. Уровни экспрессии гормонов поджелудочной железы глюкагона (GCG) (фиг. 8А и 8В) и соматостатина (SST) (фиг. 8А и 8D) определяли с помощью ОТ-ПЦР после указанных инфекционных обработок. (Фиг. 8С) Уровни экспрессии клеточно-специфических факторов транскрипции ARX и BRAIN4 также были измерены с помощью ОТ-ПЦР для указанных инфекционных обработок. (Фиг. 8Е) Уровни экспрессии соматостатина (SST) определяли с помощью ОТ-ПЦР после дополнительного инфицирования Isl1 (100 MOI). Значения СТ (для фиг. 8А, 8В, 8С и 8D) нормализуются по экспрессии гена β -актина в пределах одного и того же образца кДНК. Результаты представлены как относительные уровни среднего $\pm$ SE по сравнению с контрольными обработанными вирусом клетками (фиг. 8А) или с обработанными клетками печени с "иерархическим последовательным инфицированием" (фиг. 8В-8Е). * $P < 0,05$, ** $P < 0,1$, $n > 6$ в 3 независимых экспериментах. (Фиг. 8F) Иммунофлуоресцентное окрашивание для соматостатина после обработки С инфицирования (левая панель), а после обработки С инфицирования дополнительным инфицированием INS (правая панель). Исходное увеличение $\times 20$. (Фиг. 8G) Иммунофлуоресцентное окрашивание для соматостатина и инсулина, демонстрирующее, что последовательное введение транскрипционных факторов прямым иерархическим способом приводит к увеличению созревания трансдифференцированных клеток по бета-подобной поджелудочной линии.

На фиг. 9 проиллюстрировано схематическое изображение предлагаемого механизма трансдифференцировки, вызванной транскрипционным фактором поджелудочной железы, из печени в поджелудочную железу. Совмещенная экспрессия трех пТФ приводит к увеличению числа трансдифференцированных клеток печени по сравнению с каждым из индивидуальных эффектов фактора (обработка В). Последовательное введение транскрипционных факторов прямым иерархическим способом приводит к увеличению созревания трансдифференцированных клеток по бета-подобной линии поджелудочной железы (обработка С).

Фиг. 10А-10D иллюстрируют, что у мышей *in vivo* активация клеток, продуцирующих инсулин под воздействием Pdx-1, (ИПК), ограничена клетками, смежными с центральными венами, которые характеризуются экспрессией глутаминсинтетазы (GS). Иммуногистохимический анализ Pdx-1 (фиг. 10А) и ин-

сулина (фиг. 10B) через 14 дней после введения Ad-CMV-PDX-1. Стрелки указывают на положительные клетки, в основном расположенные вблизи центральных вен (цв). (Фиг. 10C и 10D) анализ экспрессии GS печени у человека (фиг. 10C) и мыши (фиг. 10D), указывающий на экспрессию GS на 1-2 клеточных слоях, смежных с центральными венами. Исходное увеличение $\times 400$.

На фиг. 11 проиллюстрирован элемент ответа глутаминсинтетазы (GSRE), содержащий Wnt-сигнальный элемент ответа-TCF-LEF-связывающий сайт. Схематическое представление GSRE, показывающее наличие сайтов связывания TCF-LEF и STAT 5.

На фиг. 12A-12F проиллюстрировано, что GSRE нацелен на субпопуляцию клеток печени человека *in vitro* (фиг. 12A и 12D). Схематические представления Ad-GSRE-TK-PDX-1 или GFP рекомбинантных аденовирусов. Клетки печени инфицировали с Ad-GSRE-TK-Pdx-1 (фиг. 12C) или с Ad-CMV-Pdx-1 (фиг. 12B). Иммунофлуоресцентный анализ экспрессии PDX-1 показал, что $13 \pm 2\%$ клеток печени человека, инфицированных Ad-GSRE-TK-Pdx-1 (фиг. 12C), в то время как $70 \pm 12\%$ обработанных Ad-CCV-Pdx-7 клеток (фиг. 12B) экспрессировали эктопический ядерный фактор (против-Pdx-1 кролика, щедрый подарок от С. Wright, розовый, фиг. 12B и 12C соответственно). Аналогичные результаты были получены с использованием Ad-GSRE-TK-eGFP, $\sim 15\%$ клеток были положительными для eGFP (фиг. 12E и 12F). Инфицирование Ad-CMV-eGFP давало около 75-80% положительных клеток eGFP в течение 3-4 дней (данные не представлены).

На фиг. 13A-13C проиллюстрировано, что GSRE нацелен на клетки, подверженные трансдифференцировке. Клетки печени инфицировали с Ad-GSRE-TK-Pdx-1 (фиг. 13B) или с Ad-CMV-Pdx-1 (фиг. 13A) в течение 5 дней (фиг. 13A и 13B), иммунофлуоресцентный анализ совместного окрашивания инсулина (антиинсулин морской свинки, Dako, зеленый) и (Pdx-1 кролика против Pdx-1, щедрый дар от С. Wright, розовый) (фиг. 13C). Статистический анализ активации инсулина в обработанных клетках; Ad-GSRE-TK-Pdx-1 активирует производство инсулина в 50%, тогда как Ad-CMV-Pdx-1 только в 5% Pdx-1-позитивных клеток. Blue-DAPI, ядерное окрашивание; исходное увеличение $\times 20$.

На фиг. 14A-14E проиллюстрирована визуализация линии *in vitro* для активирующих GSRE человеческих клеток (фиг. 14A). Схематическое представление векторов лентивирусов (фиг. 14B).

Клетки печени взрослого человека при пассажах 3-10 были инфицированы двойной лентивирусной системой. Клетки печени были визуализированы через 10 дней после инфицирования для флуоресценции DsRed2 (красный) или eGFP (зеленый) (фиг. 14C). Клетки сортировали с помощью сортировщика клеток, активированного флуоресценцией (FACS, сортировщик клеток Aria, Becton Dickinson, Сан-Хосе, Калифорния) с фильтром изотиоцианата флуоресцеина (530/30 нм) для eGFP и Pe-Texas Red фильтром (610/20 нм) для DsRed2 (фиг. 14D и 14E). Отделенные клетки культивировали отдельно для нескольких пассажей (первоначальное увеличение $\times 10$).

Фиг. 15A-15E иллюстрируют, что клетки eGFP+ и DsRed2+ эффективно пролиферируют *in vitro* с аналогичной скоростью пролиферации и аналогичной инфекционной способностью. Отдельные популяции клеток культивировали отдельно в течение ~ 1 месяца. Показатель пролиферации каждой группы был проанализирован (фиг. 15A), клетки eGFP+ (фиг. 15B и 15C) и DsRed2+ (фиг. 15D и 15E) были инфицированы Ad-CMV- β -gal (фиг. 15B и 15D) или с Ad-CMV-Pdx-1 (фиг. 15C и 15E) в течение 3 дней. Иммунофлуоресцентный анализ с использованием анти-Pdx-1 (синий) показал, что почти 80% клеток eGFP и DsRed2 были инфицированы аденовирусом.

Фиг. 16A-16C иллюстрируют, что клетки eGFP+ реагируют более эффективно, чем клетки DsRed2+, на трансдифференцировку, вызванную пТФ. Две группы были одинаково обработаны растворимыми факторами и пТФ: Ad-Pdx-1+Ad-Pax-4+ad-MafA или контрольный вирусом (Ad- β -gal) в течение 6 дней. Характеристики и функции β -клеток сравнивались в разделенных группах: (фиг. 16A) на молекулярном уровне, экспрессия гена инсулина и глюкагона изучалась с помощью количественной ПЦР в реальном времени по сравнению с контрольными клетками. В качестве положительного контроля использовали культивируемые клетки островковых клеток поджелудочной железы (пассаж 3) (фиг. 16B и 16C). На функциональном уровне секрецию инсулина, регулируемую глюкозой, анализировали с помощью статических инкубаций при низких концентрациях глюкозы, за которыми следуют высокие концентрации глюкозы (2 и 17,5 мМ глюкозы в буфере Кребса-Рингера (KRB) соответственно). Секрецию инсулина (фиг. 16B) и С-пептида (фиг. 16C) измеряли с использованием набора для радиоиммуноанализа человеческого инсулина (DPC, $n \geq 8$ из трех разных экспериментов) или набора радиоиммуноанализа С-пептида человека (Linco $n \geq 8$ из 3 разных экспериментов). $*P < 0,01$ по сравнению с клетками DsRed2+, используя t-тест Стьюдента.

На фиг. 17 проиллюстрирована более высокая эффективность трансдифференцировки в популяции eGFP+, которая остается стабильной с увеличением пассажей в культуре. Эти две группы пролифелировали отдельно после сортировки и были одинаково обработаны пТФ (Ad-Pdx-1+Ad-Pax-4+Ad-MafA и растворимыми факторами) после нескольких пассажей (сортировка после 5-7 пассажей) или большего количества пассажей (сортировка после 10-12 пассажей). Регулируемую секрецию инсулина анализировали статическими инкубациями при низкой с последующей высокой концентрации глюкозы (2 мМ и 17,5 мМ глюкозы в KRB соответственно). Секрецию инсулина измеряют с использованием набора для

радиоиммуноанализа человеческого инсулина (DPC; $n \geq 6$ из двух разных экспериментов). Статистически значимые различия между малым и большим числом пассажей в обеих популяциях клеток не обнаружены, что указывает на постоянную тенденцию клеток с мечеными eGFP подвергаться пТФ индуцированной трансдифференцировке по β -клеточной линии и функции.

На фиг. 18 проиллюстрированы профили экспрессии генов дифференциации eGFP⁺ и DsRed2⁺ клеток, выполненные с помощью микрочиповых анализов и проанализированные согласно DAVID Bioinformatics Resources 6.7. Четыре процента дифференциальных генов относятся к сигнальному пути Wnt.

На фиг. 19 проиллюстрировано, что активная сигнализация Wnt способствует трансдифференцировке печени на поджелудочную железу. Клетки печени взрослого человека обрабатывали Ad-CMV-Pdx-1 и растворимыми факторами, как сообщалось ранее, с добавлением Wnt3A (50 нг/мл R&D или DKK3 (3 мкг/мл R&D). Через 5 дней секрецию инсулина анализировали статическими инкубациями при низкой с последующей высокой концентрацией глюкозы (соответственно 2 и 17,5 мМ глюкозы в KRB). Секрецию инсулина измеряли с использованием набора для радиоиммуноанализа человеческого инсулина (DPC, $n \geq 8$ из трех разных экспериментов) и сравнивали с необработанными клетками (Cont). * $P < 0,01$ по сравнению с Ad-CMV-Pdx-1 отдельно, используя t-тест Стьюдента.

На фиг. 20 проиллюстрировано, что блокирование пути передачи сигналов Wnt отменяет трансдифференцировку клеток eGFP⁺. Клетки eGFP были Ad-CMV-Pdx-1 или с контрольным вирусом (Ad-CMV- β -gal) в течение 5 дней с добавлением DKK3 (связанный с Dickkopf белок 3) (0,5 мкг/мл R&D). Экспрессия гена поджелудочной железы изучалась с помощью количественной ОТ-ПЦР в реальном времени по сравнению с контрольными клетками.

Фиг. 21A-21C иллюстрируют, что клетки eGFP⁺ экспрессируют более низкие уровни APC и более высокие уровни активного β -катенина, чем клетки DsRed2⁺ (фиг. 21A). Экспрессия APC и DKK1 заметно увеличивается в клетках DsRed2⁺. Это может также предполагать, что эти клетки экспрессируют более высокие уровни репрессоров Wnt сигнального пути по сравнению с клетками eGFP⁺. $N \geq 6$ из 2 разных экспериментов * $p < 0,01$ в DsRed2⁺ по сравнению с eGFP⁺ клетками, используя t-тест Стьюдента. (фиг. 21B). Вестерн-блот-анализ с использованием специфического антитела к активированному β -катенину (анти-ABC-клон 8E7, Millipore, 1:2000) в eGFP и DsRed2 положительных клеточных экстрактах. В качестве нормализующего белка использовали β -актин (SC-1616, Санта-Круз, 1:1000) (фиг. 21C). Количественное определение уровней белка β -катенина проводили с использованием программного обеспечения ImageJ 1.29x. В качестве нормализующего белка использовали активированный β -актин (SC-1616, Санта-Круз, 1:1000).

На фиг. 22 представлены микрофотографии, иллюстрирующие мезенхимальные стволовые клетки (MSC), восприимчивые к аденовирусному инфицированию. MSC были инфицированы увеличением MI Ad-GFP. Через пять дней клетки визуализировали с помощью флуоресцентной микроскопии (увеличение $\times 4$), репрезентативной фазово-контрастной морфологией (левая панель) и зеленой флуоресценцией (левая панель) MSC, инфицированной Ad-CMV-GFP. Инфицирование клеток MSC с 1000 MOI Ad-GFP давало около 20-60% положительных клеток (в зависимости от клеточных линий), в то время как клетки печени обычно содержат 70-80% положительных клеток.

На фиг. 23 проиллюстрирована гистограмма, которая демонстрирует, что MSC секретируют инсулин способом, регулируемым глюкозой. Клетки исследовали на их способность подвергаться трансдифференцировке. Трансдифференцировку индуцировали на MSC путем инфицирования клеток PDX1, NeuroD1 и MafA. На шестой день эксперимента клетки подверглись секреторному эксперименту и RIA для обнаружения инсулина. Секрецию инсулина, регулируемую глюкозой, измеряли инкубацией в течение 15 мин с 2 или 17,5 мМ глюкозы в KRB.

На фиг. 24A-24B представлены комбинированные измерения секреции инсулина наивных и обогащенных GS популяций клеток на 6-й день эксперимента, сравнивая влияние PAX4 на NeuroD1. На фиг. 24A представлена гистограмма секреции инсулина в ответ на низкие (2 мМ) и высокие (17 мМ) концентрации глюкозы в виде нанограмм инсулина на миллион клеток в час (нг/10⁶/ч). На фиг. 24B представлена гистограмма секреции инсулина в ответ на низкие (2 мМ) и высокие (17 мМ) концентрации глюкозы в виде нанограмм инсулина в час (нг/ч).

На фиг. 25A-25D представлены отдельные измерения секреции инсулина наивных и обогащенных популяций клеток на 6-й день эксперимента, сравнивая влияние PAX4 на NeuroD1. Фиг. 25A (обогащенные для экспрессии GS) и фиг. 25C (Наивные) представляют гистограммы секреции инсулина в ответ на низкие (2 мМ) и высокие (17 мМ) концентрации глюкозы в виде нанограммов инсулина на миллион клеток в час (нг/10⁶/ч). Фиг. 25B (обогащенные для экспрессии GS) и фиг. 25D (Наивные) представляет собой гистограмму секреции инсулина в ответ на низкие (2 мМ) и высокие (17 мМ) концентрации глюкозы в виде нанограммов инсулина в час (нг/ч).

На фиг. 26A-26C проиллюстрирована секреция инсулина, измеренная на 6-й день эксперимента после инкубации с 2 мМ глюкозы (низкая концентрация) или 17,5 мМ глюкозы (высокая концентрация). Результаты представлены в виде нанограммов инсулина на миллион клеток в час (ng INS/10⁶/hr) для пер-

вичных клеток печени, полученных от доноров человека (фиг. 26А Muhammad, фиг. 26В Педро и фиг. 26С Леон).

На фиг. 27 представлены схемы процесса амплификации и трансдифференцировки клеток печени человека, указывающие на доклинический процесс исследований R&D (процесс культивирования клеточной культуры) и клинический процесс (процесс биореактора Xpansion).

На фиг. 28 представлен типичный профиль посадки и профиль размножения клеток первичных клеток, полученных из печени человека, из 10 планшетов с множественным лотком Cell Stack (CS) в биореакторе XP-200. Пунктирные линии в зеленом цвете представляют собой мишень с точки зрения количества клеток, требуемых для каждого пациента (нацеливание на аутологичную терапию на основе диабетических клеток), где указанное число мишеней составляет 1 миллиард клеток на пациента. PDL представляет собой Предел удвоения популяции. CS представляет собой мультипланшеты Cell Stack.

На фиг. 29 представлено время удвоения популяции (PDT) в днях в биореакторах XP-50 и XP-200 и в их классических аналогах с поддержкой нескольких лотков (CTL XP50 и CTL XP-200). Данные основаны на плотности собранных клеток. Номера в каждом столбце представляют собой PDT.

На фиг. 30 проиллюстрирована тенденция регулирования в биореакторах (XP-50 и XP-200) для pH (зеленый), DO (синий) и температуры (красный). Пунктирные линии представляют собой заданные точки, а пики были связаны с отключением биореактора для разных операций (например, для замены среды).

На фиг. 31А-31D представлены наблюдения клеток с помощью микроскопа в биореакторе Xpansion (фиг. 31А и 31В) и системы управления с несколькими лотками (фиг. 31С и 31D) до сбора на 9-й день. Фиг. 31А и 31С клетки из биореактора Xpansion 50, в то время как на фиг. 31В и 31D проиллюстрированы клетки из цикла биореактора Xpansion 200.

На фиг. 32 представлена схема аутологичной клеточной терапии на основе клеток печени, адаптированная из Cozar-Castellan and Stewart (2005) Proc Nat Acad Sci USA 102 (22): 7781-7782.

На фиг. 33 проиллюстрирован процесс производства, показывающий первичные клетки печени взрослого человека, которые подвергаются 1000-кратному размножению до трансдифференцировки и окончательной проверки гарантии качества/контроля качества (QA/QC).

На фиг. 34 представлен общий обзор процесса производства клеток аутологичного инсулина (AIP). Этапы включают: этап 1 - обнаружение ткани печени (например, биопсия печени); этап 2 - обработку ткани для извлечения первичных клеток печени; этап 3 - размножение первичных клеток печени до заданного количества клеток; этап 4 - трансдифференцировку первичных клеток печени; этап 5 - сбор первичных трансдифференцированных клеток печени и этап 6 - тестирование трансдифференцированных клеток для обеспечения качества и контроля качества (то есть безопасности, чистоты и эффективности). Необязательные этапы включают криоконсервирование первичных клеток печени раннего пассажа, где в одном варианте реализации ранний пассаж является пассажем 1; оттаивание криоконсервированных клеток для последующего использования и хранение трансдифференцированных клеток для использования позднее.

На фиг. 35 представлена изменчивость плотности клеток при сборке из клеток, изготовленных в течение трех отдельных прогонов, причем начальные плотности сравнимы.

На фиг. 36А и 36В представлены гистограммы, демонстрирующие типичные результаты экспрессии эндогенного гена из популяций трансдифференцированных первичных клеток печени человека, результаты, демонстрирующие увеличение эндогенных маркеров поджелудочной железы (PDX-1, NeuroD1, MafA, глюкагон и соматостатин) по сравнению с контрольными необработанными (нетрансдифференцированными) клетками.

На фиг. 37 представлены результаты тестирования на потенциальную продуктивность клеток AIP (секреция инсулина, регулируемая глюкозой, с помощью ELISA).

На фиг. 38 представлена блок-схема последовательности операций, показывающая три различных протокола трансдифференцировки "2+1", включая протоколы с использованием многосистемных биореакторов, для продукции клеток, продуцирующих человеческий инсулин, не являющихся клетками поджелудочной железы, как проиллюстрировано в настоящем документе, начиная с клеток печени. Блок-схема иллюстрирует плотности клеток-мишеней при посеве и фиксации после инфицирования, а также первое инфицирование, включающее инфицирование аденовирусными векторами, содержащими ДНК, кодирующие полипептиды PDX-1 и NeuroD1, и второе инфицирование, включающее инфицирование аденовирусным вектором, содержащим ДНК, кодирующую MafA. Во всех случаях посев для сбора происходит примерно через 8 дней.

На фиг. 39А-39D представлены микрофотографии плотности клеток на 6-й день во время второго инфицирования, включая изображение необработанных контрольных клеток.

На фиг. 40А-40В представлены микрофотографии плотности клеток на 6-й день во время второго инфицирования из планшетов 3 (фиг. 40А) и 5 (фиг. 40В) многорежимного биореактора Xpansion-10.

На фиг. 41А-41D представлены микрофотографии плотности клеток на 8-й день во время окончательного сбора, включая изображение необработанных контрольных клеток.

На фиг. 42А-42В представлены микрофотографии плотности клеток на 8-й день во время оконча-

тельного сбора из планшетов 3 (фиг. 42А) и 5 (фиг. 42В) многосистемного биореактора Xpansion-10.

На фиг. 43 представлена гистограмма, иллюстрирующая результаты анализов содержания инсулина в клетках, полученных с использованием протокола "2+1" (см. фиг. 38), что демонстрирует, что трансдифференцировка в биореакторной системе не только возможна, но и дает клетки, продуцирующие человеческий инсулин, при этом клетки имеют повышенное содержание инсулина по сравнению с контрольными необработанными клетками.

На фиг. 44А и 44В представлены результаты проточного цитометрического анализа размноженных и трансдифференцированных клеток печени. На фиг. 44А проиллюстрирован типичный график FACS нескольких маркеров мезенхимальных стволовых клеток (MSC), расположенных на живых клетках. Проиллюстрированные маркеры включают CD90, CD73, CD105 и CD44. Негативный коктейль включает гемопоэтические маркеры. На фиг. 44В проиллюстрирована частота маркеров MSC в разных пассажах клеток, P12 (12-й пассаж), P13 (13-й пассаж), P14 (14-й пассаж) и в инфицированных клетках (P16_AdV-инфицирование).

На фиг. 45А-45С показатели эффективности трансдукции клеток печени BP001. На фиг. 45А микрфотографии, на фиг. 45В FACS и фиг. 45С - краткое изложение данных FACS.

Фиг. 46А-46С иллюстрируют эффективность трансдукции клеток печени TS001. На фиг. 46А микрфотографии флуоресценции, на фиг. 46В FACS и фиг. 46С краткое изложение данных FACS.

На фиг. 47 представлена гистограмма относительных уровней экспрессии молекул клеточной поверхности в клетках eGFP+ и DsRed2+, перечисленных в табл. 2В примера 16.

На фиг. 48А-48С проиллюстрирован ранее существовавший сигнал WNT/ β -катенина, которым подвергают клетки для эффективной трансдифференцировки. Сигнал WNT индуцировали Li в течение 48 ч до трансдифференцировки, который затем удалялся (Li-день -2) или поддерживался (Li-день -2 дальше) по всему протоколу трансдифференцировки. Секретию инсулина измеряли с помощью ELISA в ответ на стимуляцию глюкозой 17,5 мМ. На фиг. 48А проиллюстрирована гистограмма кратности увеличения инсулина после трансдифференцировки без предварительной обработки литием (слева) и с предварительной обработкой литием за 48 ч до трансдифференцировки (справа) (фиг. 48В и 48С). Уровни экспрессии генов поджелудочной железы Nkx6.1, Isl-1 и человеческого PDX1 измеряли с помощью ПЦР в реальном времени и нормировали по актину. Результаты представлены двумя донорами.

Понятно, что для простоты и ясности иллюстрации элементы, проиллюстрированные на фигурах, необязательно были нарисованы для масштабирования. Например, размеры некоторых элементов могут быть преувеличены по сравнению с другими элементами для ясности.

Подробное описание

В нижеследующем подробном описании излагаются многочисленные конкретные детали, чтобы обеспечить полное понимание непанкреатических трансдифференцированных клеток, продуцирующих человеческий инсулин, имеющих фенотип и функции панкреатических клеток, и способы их изготовления. В других случаях хорошо известные способы, процедуры и компоненты не были подробно описаны, чтобы не делать неясными непересекающиеся трансдифференцированные человеческие клетки, продуцирующие инсулин, имеющие фенотип и функции панкреатической клетки, и способы их получения. Настоящая заявка испрашивает приоритет предварительной заявки США № 62/098050, поданной 30 декабря 2014 г., которая полностью включена в данный документ посредством ссылки.

Продемонстрировано, что факторы транскрипции (ТФ) индуцируют трансдифференцировку в многочисленных клеточных линиях. Специалисту в данной области техники было бы понятно, что термин "трансдифференцировка" может включать процесс, с помощью которого первый тип клеток теряет идентифицирующие характеристики и изменяет свой фенотип на фенотип второго типа клеток, без перехода через стадию, в которой клетки имеют эмбриональные характеристики. В некоторых вариантах реализации первая и вторая клетки относятся к различным тканям или клеточным линиям. В одном варианте реализации трансдифференцировка включает превращение зрелой или дифференцированной клетки в другую зрелую или дифференцированную клетку. В частности, было сделано предположение, что линиеспецифические транскрипционные факторы (ТФ) демонстрируют инструктивные роли в преобразовании взрослых клеток в эндокринные клетки поджелудочной железы, нейроны, гемопоэтические клетки и линии кардиомиоцитов, что свидетельствует о том, что процессы трансдифференцировки происходят в широком спектре среды. Во всех протоколах трансдифференцировки эктопические ТФ служат кратковременным триггером для потенциального обширного, функционального и необратимого процесса развития. Многочисленные исследования предполагают, что эктопическая экспрессия отдельных ТФ активирует требуемый альтернативный репертуар и функцию в процессе, связанном с активацией дополнительных соответствующих, иными словами, молчащих ТФ. Тем не менее, временной ход, относительные уровни и иерархия или порядок индуцированных ТФ остаются неизвестными.

Через использование относительной недостаточности индукции эндогенных транскрипционных факторов (ТФ) путем введения отдельных эктопических ТФ в настоящем документе раскрыты способы трансдифференцировки в качестве последовательного и контролируемого во времени процесса, на который влияет иерархическая сеть ТФ.

Продукт клеток, продуцирующих человеческий инсулин, и способы изготовления и производства

этого продукта, как раскрыто в настоящем документе, основаны на обнаружении того, что ТФ-индуцируемая трансдифференцировка печени в поджелудочную железу, представляет собой постепенный и последовательный процесс. Важно отметить, что только последовательное введение ТФ поджелудочной железы выборочно управляет программами спецификаций линии в пределах эндокринной поджелудочной железы, а не их совмещенная экспрессия. Было продемонстрировано, что последовательная экспрессия ТФ поджелудочной железы прямым иерархическим путем является обязательной для трансдифференцированного созревания клеток по линии β -клеток. В частности, на конечном этапе процесса трансдифференцировки была идентифицирована роль специфического транскрипционного фактора MafA поджелудочной β -клетки. На этом этапе MafA способствует созреванию трансдифференцированных клеток печени по линии β -клеток в процессе, связанном с репрессией Isl1 и соматостатина. Неожиданно было обнаружено, что иерархический способ 2+1 (PDX-1 и Pax4 или NeuroD1, за которым следует MafA) был успешным для выборочного определения спецификации линии в отношении фенотипа поджелудочной железы и функции в клетках не поджелудочной железы.

Выводы, описанные в настоящем документе, предполагают фундаментальные временные характеристики трансдифференцировки, опосредованной транскрипционным фактором, которые могут способствовать повышению терапевтической ценности использования перепрограммирования взрослых клеток, вызванных ТФ, для лечения дегенеративных заболеваний, включая диабет.

Панкреатические транскрипционные факторы (пТФ), такие как Pdx-1, NeuroD1, Ngn-3 и Pax4, активирует трансдифференцировку печени в поджелудочную железу и индивидуально индуцирует устранение гипергликемии у диабетических мышей. Кроме того, с использованием экспериментальной системы *in vitro* для клеток печени взрослого человека было продемонстрировано, что Pdx-1 активирует экспрессию многочисленных специфических маркеров β -клеток и индуцирует секрецию инсулина, регулируемую глюкозой.

Индукцированный процесс был связан с экспрессией многочисленных ключевых эндогенных пТФ, и устранение гипергликемии было продемонстрировано при трансплантации трансдифференцированных клеток печени взрослого человека у диабетических мышей. Однако многие другие исследования показали, что использование комбинаций из нескольких ключевых ТФ заметно повышает эффективность перепрограммирования по сравнению с тем, что вызвано эктопической экспрессией отдельных ТФ. Это предполагает потенциальную ограниченную способность отдельных эктопических факторов активировать эндогенные дополняющие ТФ до достаточных уровней, необходимых для эффективного процесса трансдифференцировки. Целенаправленное нарушение или временная неправильная экспрессия факторов транскрипции поджелудочной железы при органогенезе поджелудочной железы препятствует развитию поджелудочной железы, а также дифференциации и функции островковых клеток. Через использование относительной недостаточности индукции эндогенных ТФ отдельными эктопическими ТФ, раскрытие, представленное в настоящем документе, связано с трансдифференцировкой как последовательного и контролируемого во времени процесса, на который влияет иерархическая сеть ТФ.

Спецификация поджелудочной железы инициируется фактором транскрипции гомеобокса Pdx1, который также необходим для функции β -клеток у взрослых. Затем эндокринная дифференциация опосредуется основным фактором Ngn3 спираль-петля-спираль. Сопряженные факторы гомеобокса Pax4 и Arx были замечены в качестве ключевых факторов в сегрегации различных типов эндокринных клеток. Окончательное созревание по β -клеточной линии и функции объясняется селективной экспрессией MafA в β -клетках поджелудочной железы у взрослых.

В настоящем документе раскрыты способы и человеческие клетки, продуцирующие инсулин, полученные с использованием этих методов, частично основанные на удивительном обнаружении того, что клетки печени человека могут быть непосредственно трансдифференцированы для получения совершенно другого клеточного типа, клетки, продуцирующие поджелудочные гормоны, включая бета-клетки. Применение выбранных факторов транскрипции во временной регулируемой последовательности индуцировало трансдифференцировку взрослых клеток печени в функциональные зрелые бета-клетки. Описанные в настоящем документе способы решают проблему получения больших популяций клеток, продуцирующих инсулин, или бета-клеток поджелудочной железы, путем предоставления способов размножения и трансдифференцировки взрослых клеток. Композиции, содержащие выбранные транскрипционные факторы или сгенерированную популяцию трансдифференцированных клеток поджелудочной железы, могут быть использованы для лечения расстройства поджелудочной железы с использованием способов, описанных в настоящем документе.

Предыдущие попытки трансдифференцировать клетки поджелудочной железы в клетки поджелудочной железы, такие как бета-клетки, используют либо только один транскрипционный фактор, либо совмещенное или одновременное введение более чем одного фактора транскрипции поджелудочной железы. Способы, раскрытые в настоящем документе, предусматривают упорядоченное последовательное введение определенных факторов транскрипции в определенные моменты времени. Альтернативные способы, раскрытые в настоящем документе, предусмотрены для "два пТФ+один пТФ" (2+1) комбинированного и упорядоченного последовательного введения определенных факторов транскрипции в опре-

деленные моменты времени. Кроме того, описанные в настоящем документе способы существенно повышают эффективность трансдифференцировки по сравнению с тем, который индуцируется каждым из отдельных факторов транскрипции.

В настоящем документе раскрывается популяция клеток, которые обладают повышенной способностью к трансдифференцировке. Эти клетки характеризуются (1) потенциальными маркерами клеточной мембраны, (2) обладают способностью активировать регуляторный элемент глутаминсинтетазы (GSRE) и (3), будучи уникально оснащенными активной Wnt-сигнализацией. По меньшей мере 30% клеток в популяции способны активировать GSRE. Например, клетки представляют собой эндотелиальные клетки, эпителиальные клетки, мезенхимальные клетки, фибробласты или клетки печени. В одном варианте реализации клетки представляют собой клетки человека. В некоторых вариантах реализации клетки могут быть трансдифференцированы по линии поджелудочной железы до зрелых клеток поджелудочной железы с функцией поджелудочной железы. В других вариантах реализации клетки могут быть трансдифференцированы по нейронной линии до нервных клеток.

Таким образом, описанные в настоящем документе способы решают проблему предыдущих протоколов трансдифференцировки или перепрограммирования, которые часто имеют ограниченную эффективность. Например, хотя эктопическая экспрессия ключевых факторов транскрипции поджелудочной железы приводит к экспрессии в каждой клетке-хозяине, только до 15% клеток успешно трансдифференцируются, чтобы проявлять функцию поджелудочной железы.

Дополнительно, в настоящем документе раскрыты способы выделения популяции клеток с обогащенной или повышенной способностью к трансдифференцировке. Например, одним из способов выделения этих клеток является сортировка клеток, которые активируют экспрессию GFP, оперативно связанную с регуляторным элементом глутаминсинтетазы или ее фрагментом, тем самым выделяя эти клетки, которые могут активировать GSRE. Клетки могут быть отсортированы с помощью FACS и могут быть размножены в культуре отдельно от остальной части клеток для быстрого размножения клеток с обогащенной способностью к трансдифференцировке. Популяция клеток с обогащенной способностью к трансдифференцировке представляет собой лишь небольшую часть клеток, которые составляют ткань *in vivo*. Например, в данной ткани или популяции клеток популяция клеток с обогащенной способностью к трансдифференцировке составляет всего около 1, 2, 3, 4, 5%, около 10, около 15% всей популяции клеток в данной ткани. Поэтому в настоящем документе раскрыты способы выделения указанных клеток с повышенной способностью к трансдифференцировке из клеток, которые не обладают повышенной способностью к трансдифференцировке. Соответственно, обогащенные непанкреатические β -клетки, описанные в настоящем документе, имеют преимущество популяции клеток с большей долей клеток, которые увеличивают способность к трансдифференцировке для повышения эффективности трансдифференцировки для обеспечения трансдифференцированных клеток для лечения различных заболеваний или расстройств.

Специалистам в данной области техники будет очевидно, что различные способы и модификации могут быть включены в способы, описанные в настоящем документе, в рамках сущности и объема продукта непанкреатических β -клеток, продуцирующих человеческий инсулин, полученных путем трансдифференцировки, и способов получения и использования указанного продукта.

Способы получения панкреатических бета-клеток

Раскрытые в настоящем документе способы получения клеток, которые проявляют фенотип зрелых панкреатических бета-клеток, путем контактирования непанкреатических клеток млекопитающих с панкреатическими транскрипционными факторами, такими как PDX-1, Pax-4, NeuroD1 и MafA, в определенные моменты времени. В некоторых вариантах реализации способы включают контактирование непанкреатической клетки млекопитающего с PDX-1 в первый период времени; контактирование клеток, полученных на первом этапе, с Pax-4 во второй период времени; и контактирование клеток со второго этапа с MafA в третий период времени. В одном варианте реализации способы включают контактирование непанкреатической клетки млекопитающего с PDX-1 в первый период времени; контактирование клеток с первого этапа с NeuroD1 во второй период времени; и контактирование клеток со второго этапа с MafA в третий период времени. В другом варианте реализации способы включают контактирование непанкреатической клетки млекопитающего с PDX-1 и вторым фактором транскрипции в первый период времени и контактирование клеток с первого этапа с MafA во второй период времени. В еще одном варианте реализации второй фактор транскрипции выбирают из NeuroD1 и Pax4. В другом варианте реализации транскрипционные факторы, представленные вместе с PDX-1, включают Pax-4, NeuroD1, Ngn3 или Sox-9. В другом варианте реализации транскрипционные факторы, представленные вместе с PDX-1, включают Pax-4. В другом варианте реализации транскрипционные факторы, представленные вместе с PDX-1, включают NeuroD1. В другом варианте реализации транскрипционные факторы, представленные вместе с PDX-1, включают Ngn3. В другом варианте реализации транскрипционные факторы, представленные вместе с PDX-1, включают Sox-9.

В других вариантах реализации способы включают контактирование непанкреатической клетки млекопитающего с PDX-1 в первый период времени; контактирование клеток с первого этапа с Ngn3 во

второй период времени; и контактирование клеток со второго этапа с MafA в третий период времени. В других вариантах реализации способы включают контактирование непанкреатической клетки млекопитающего с PDX-1, в первый период времени; контактирование клеток с первого этапа с Sox9 во второй период времени; и контактирование клеток со второго этапа с MafA в третий период времени. В другом варианте реализации способы включают контактирование непанкреатической клетки млекопитающего с PDX-1 и вторым фактором транскрипции в первый период времени и контактирование клеток с первой этапа с MafA во второй период времени, причем вторым фактором транскрипции является выбранный из NeuroD1, Ngn3, Sox9 и Pax4.

В другом варианте реализации способы включают контактирование непанкреатической клетки млекопитающего с PDX-1 и NeuroD1 в первый период времени и контактирование клеток с первого этапа с MafA во второй период времени. В другом варианте реализации способы включают контактирование непанкреатической клетки млекопитающего с PDX-1 и Pax4 в первый период времени и контактирование клеток с первого этапа с MafA во второй период времени. В другом варианте реализации способы включают контактирование непанкреатической клетки млекопитающего с PDX-1 и Ngn3 в первый период времени и контактирование клеток с первого этапа с MafA во второй период времени. В другом варианте реализации способы включают контактирование непанкреатической клетки млекопитающего с PDX-1 и Sox9 в первый период времени и контактирование клеток с первого этапа с MafA во второй период времени.

В другом варианте реализации клетки контактируют со всеми тремя факторами (PDX-1, NeuroD1, или Pax4, или Ngn3; и MafA) одновременно, но уровни их экспрессии контролируются таким образом, чтобы они были экспрессированы в клетке в первый период времени для PDX-1, второй период времени для NeuroD1, или Pax4, или Ngn3; и в третий период времени для MafA. Контроль экспрессии может быть достигнут с использованием подходящих промоторов на каждом гене, так что гены экспрессируются последовательно, путем изменения уровней мРНК или другими способами, известными в данной области.

В одном варианте реализации описанные в настоящем документе способы дополнительно включают контактирование клеток во время, до или после любой из вышеуказанных стадий с транскрипционным фактором Sox-9.

В одном варианте реализации первый и второй периоды времени идентичны, что приводит к контактированию популяции клеток с двумя пТФ в первый период времени, где по меньшей мере один пТФ содержит рDХ-1, за которым следует контакт результирующей популяции клеток с третьим пТФ во второй период времени, где указанный третий пТФ представляет собой MafA.

В одном варианте реализации второй период времени составляет по меньшей мере 24 ч после первого периода времени. В альтернативном варианте реализации второй период времени составляет менее 24 ч после первого периода времени. В другом варианте реализации второй период времени составляет около 1 ч после первого периода времени, около 2, около 3, около 4, около 5, около 6, около 7, около 8, около 9, около 10, около 11 или примерно через 12 ч после первого периода времени. В некоторых вариантах реализации второй период времени может составлять по меньшей мере 24, по меньшей мере 48, по меньшей мере 72 ч и по меньшей мере 1 неделю или более после первого периода времени.

В другом варианте реализации третий период времени составляет по меньшей мере 24 ч после второго периода времени. В альтернативном варианте реализации третий период времени составляет менее 24 ч после второго периода времени. В другом варианте реализации третий период времени является одновременно вторым периодом времени. В другом варианте реализации третий период времени составляет примерно 1 ч после второго периода времени, около 2, около 3, около 4, около 5, около 6, около 7, около 8, около 9, около 10, около 11 или примерно через 12 ч после второго периода времени. В других вариантах реализации третий период времени может составлять по меньшей мере 24, по меньшей мере 48, по меньшей мере 72 ч и по меньшей мере 1 неделю или более после второго периода времени.

В одном варианте реализации первый, второй и третий периоды времени одновременно приводят к контактированию популяции клеток с тремя пТФ за один период времени, причем по меньшей мере один пТФ содержит рDХ-1, по меньшей мере один пТФ содержит NeuroD1 или Pax4, и по меньшей мере один пТФ содержит MafA. В другом варианте реализации первый, второй и третий периоды времени одновременно приводят к контактированию популяции клеток с тремя пТФ за один период времени, причем один пТФ состоит из рDХ-1, один пТФ состоит из NeuroD1 или Pax4 и один пТФ состоит из MafA.

В одном варианте реализации транскрипционные факторы включают полипептиды или рибонуклеиновые кислоты или нуклеиновые кислоты, кодирующие полипептиды фактора транскрипции. В другом варианте реализации транскрипционный фактор включает полипептид. В другом варианте реализации транскрипционный фактор включает последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую фактор транскрипции. В другом варианте реализации транскрипционный фактор включает последовательность дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК), кодирующую фактор транскрипции. В еще одном варианте реализации ДНК включает кДНК. В другом варианте реализации транскрипционный фактор включает последовательность рибонуклеиновой кислоты (РНК), кодирующую фактор транскрипции. В еще одном варианте реализации РНК включает мРНК.

Факторы транскрипции для использования в раскрытии, представленном в настоящем документе, могут представлять собой полипептид, рибонуклеиновую кислоту или нуклеиновую кислоту. Специалисту в данной области было бы понятно, что термин "нуклеиновая кислота" может включать молекулы ДНК (например, кДНК или геномную ДНК), молекулы РНК (например, мРНК, микроРНК или другие производные РНК), аналоги ДНК или РНК, полученные с использованием нуклеотидных аналогов, и производные, фрагменты и гомологи. Молекула нуклеиновой кислоты может быть одноцепочечной или двухцепочечной. В одном варианте реализации нуклеиновая кислота представляет собой ДНК. В других вариантах реализации нуклеиновая кислота представляет собой мРНК. мРНК особенно выгодна в описанных в настоящем документе способах, поскольку кратковременная экспрессия PDX-1 является достаточной для получения бета-клеток поджелудочной железы. Полипептид, рибонуклеиновая кислота или нуклеиновая кислота могут быть доставлены в клетку известными в данной области способами, включая, но не ограничиваясь ими, инфицирование вирусными векторами, электропорацию и липофекцию.

В некоторых вариантах реализации транскрипционные факторы для использования в описанных в настоящем документе способах выбирают из группы, состоящей из PDX-1, Pax-4, NeuroD1 и MafA. В других вариантах реализации транскрипционные факторы для использования в описанных в настоящем документе способах выбирают из группы, состоящей из PDX-1, Pax-4, NeuroD1, MafA, Ngn3 и Sox9.

Гомеодоменный белок PDX-1 (панкреатический и дуоденальный ген-1 гомеобокса), также известный как IDX-1, IPF-1, STF-1 или IUF-1, играет центральную роль в регулировании развития и функции панкреатического островка. PDX-1 либо прямо, либо косвенно участвует в специфической для островковых клеток экспрессии различных генов, таких как, например, инсулин, глюкагон, соматостатин, проинсулин-конвертаза 1/3 (PCI/3), GLUT-2 и глюкокиназа. Кроме того, PDX-1 опосредует транскрипцию гена инсулина в ответ на глюкозу. Подходящими источниками нуклеиновых кислот, кодирующих PDX-1, являются, например, нуклеиновая кислота PDX-1 человека (и кодированные последовательности белка), доступная как GenBank Accession No. U35632 и AAA88820, соответственно. В одном варианте реализации аминокислотная последовательность полипептида PDX-1 представлена в SEQ ID NO: 4:

```
MNGEEQYYAATQLYKDPQAFQGRPAPEFASPPACLYMGRQPPPPPPHFPFGALGALEQGSPPD
ISPYEVPLADDDPAVAHLNHNHLPALQALPHPPAGPFPPEGAEPGVLEENRVQLPFPWMKSTKAN
AWKGQWAGGAYAAEPENKRTAYTRAQLLELEKEFLFNKYISRPRVELAVMLNLTERHIKI
WFQNRMRKWKKEEDKKRGGGTAVGGGGVAEPEQDCAVTSGEELLALPPPPPGGAVPPAAPVAA
REGRLPPLSASPQSSVAPRRPQEP (SEQ ID NO: 4).
```

В одном варианте реализации последовательность нуклеиновой кислоты полинуклеотида PDX-1 представлена в SEQ ID NO: 5:

```
ATGAACGGCGAGGAGCAGTACTACGCGGCCACGCAGCTTTACAAGGACCCATGCGCGTTCCAGC
GAGGCCCCGCGCCGAGTTTCAGCGCCAGCCCCCTGCGTGCCTGTACATGGGCCGCCAGCCCCC
GCCGCCGCGCCGCGACCCGTTCCCTGGCGCCCTGGGCGCGCTGGAGCAGGGCAGCCCCCGGAC
ATCTCCCCGTACGAGGTGCCCCCTCGCCGACGACCCCGCGGTGGCGCACCTTACCACCACC
TCCCGGCTCAGCTCGCGCTCCCCACCCGCGCCGCGGCCCTTCCCGAGGGAGCCGAGCCGGG
CGTCTGGAGGAGCCCAACCGCTCCAGCTGCCTTTCCCATGGATGAAGTCTACCAAAGTCCAC
GCGTGGAAAGGCCAGTGGGCAGGCGCGCTACGCTGCGGAGCCGAGGAGAACAAGCGGACGC
GCACGGCCTACACGCGCGCACAGCTGTAGAGCTGGAGAAGGAGTTCTTATCAACAAGTACAT
CTCACGGCCGCGCGGGTGGAGCTGGCTGTTCATGTTGAAGTACCGAGAGACACATCAAGATC
TGGTTCCAAAACCGCCGATGAAGTGGAAAAAGGAGGAGACAAGAAGCGCGCGCGGGGACAG
CTGTGCGGGGTGGCGGGGTGCGGAGCCTGAGCAGGACTGCGCCGTGACCTCCGCGGAGGAGCT
TCTGGCGCTGCGCGCGCGCGCCCCCGGAGGTGCTGTGCGCCCGCTGCCCCGTTGCGCGC
CGAGAGGGCCGCTGCGCGCTGGCCTTAGCGCGTGCACAGCCCTCCAGCGTCGCGCCTCGGC
GGCCGAGG AACACGATGA (SEQ ID NO: 5).
```

Другие источники последовательностей для PDX-1 включают последовательности нуклеиновой кислоты и белка PDX крысы, как продемонстрировано в GenBank Accession No. U35632 и AAA18355, соответственно, и они включены в настоящий документ посредством ссылки во всей их полноте. Дополнительный источник включает последовательности нуклеиновых кислот и белковые последовательности рыбок данио, представленные в GenBank Accession No. AF036325 и AAC41260, соответственно, и включены в настоящий документ в качестве ссылки во всей их полноте.

Pax-4, также известный как спаренный бокс 4, белок спаренного бокса 4, ген спаренного бокса 4, MODY9 и KPD, представляет собой специфичный для поджелудочной железы фактор транскрипции, который связывается с элементами в промоторах глюкагона, инсулина и соматостатина и считается, что играет важную роль в дифференциации и развитии островковых бета-клеток поджелудочной железы. В некоторых клеточных контекстах Pax-4 проявляет репрессорную активность. Подходящие источники нуклеиновых кислот, кодирующих Pax-4, включают, например, человеческую Pax-4 нуклеиновую кислоту (и кодированные последовательности белка), доступные как GenBank Accession No. NM_006193.2 и AAD02289.1 соответственно.

MafA, также известный как V-maf онкогенный гомолог A онкогена мышечно-апоневротической

фибросаркомы или R1PЕ3В1, является специфичным к бета-клеткам и транскрипционным активатором, регулируемым глюкозой, для экспрессии гена инсулина. MafA может участвовать в функции и развитии бета-клеток, а также в патогенезе диабета. Подходящие источники нуклеиновых кислот, кодирующих MafA, включают, например, человеческую MafA нуклеиновую кислоту (и кодированные последовательности белка), доступные как GenBank Accession No. NM_201589.3 и NP_963883.2 соответственно. В одном варианте реализации аминокислотная последовательность полипептида MafA представлена в SEQ ID NO: 8:

```
MAAELAMGAELPSSPLAIEYVNDLDMKFVKKPEAERFCHRLPPGSLSSSTPLSTPCSSVPS
SPSFCAPSPGTGGGGGAGGGGSSQAGGAPGPPSGGPGAVGGTSGKPALEDLYWMSGYQHHLNP
EALNLTPEDAVEALIGSGHHGAHHGAHHHPAAAAAYEAFRGPFGAGGGGADDMGAGHHHGAHHAA
HHNHAAHHHHHHHHHGGAGHGGGAGHHVRLEERFSDDQLVMSVRELNRQLRGFSKEEVIRLK
QKRRTLKNRGYAQSCRFRVQQRHILESEKQLQSQVEQLKLEVGLAKERDLYKEKYEKLAGR
GGPGSAGGAGFPREPSPPQAGPGGAKGTADFFL (SEQ ID NO: 8).
```

В другом варианте реализации последовательность нуклеиновой кислоты полинуклеотида MafA представлена в SEQ ID NO: 9:

```
ATGGCCGCGGAGCTGGCGATGGGCGCCGAGCTGCCCAGCAGCCCGCTGGCCATCGAGTACGTCA
ACGACTTCGACCTGATGAAGTTCGAGGTGAAGAAGGAGCCTCCCGAGGCCGAGCGCTTCTGCCA
CCGCCTGCCGCCAGGCTCGCTGTCTCGACGCCGCTCAGCACGCCCTGCTCCTCCGTGCCCTCC
TCGCCAGCTTCTGCGCGCCAGCCCGGCACCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCG
GCTCGTCTCAGGCCGGGGCGCCCCCGGCCGCCGAGCGGGGCCCCGGCGCGCTCGGGGGCAC
CTCGGGGAAGCGGCGCTGGAGGATCTGTACTGGATGAGCGGCTACCAGCATCACTCAACCCC
GAGGCGCTCAACCTGACGCCCCGAGGACGCGGTGGAGGCGCTCATCGGACGCGGCCACACGGCG
CGCACACGCGCGCACACACCGGCCGCGGCCGAGCCTACGAGGCTTTCGCGGCCCGGGGCTT
CGCGGGCGGCGGCGGAGCGGACGACATGGGCGCGGCCACCAACACGCGCGCACACACGCCGCC
CACCAACACACGCGGCCACCAACACCAACCAACCAACCAACCAACCAACCAACCAACCAACCAAC
GTGGCGCGGCCACCACTGCGCCTGGAGGAGCGCTTCTCCGACGACGAGCTGGTGTCCATGTC
GGTGC GCGAGCTGAACCGGCAGCTCCGCGGCTTCAGCAAGGAGGAGGTATCCGGCTCAAGCAG
AAGCGGCGCACGCTCAAGAACC GCGGTACGCGCAGTCTTCCGCTTCAAGCGGTGCAGCAGC
GGCACATTCTGGAGAGCGAGAAGTGCCAACTCCAGAGCCAGGTGGAGCAGCTGAAGCTGGAGGT
GGGGCGCTTGCCAAAGAGCGGGACCTGTACAAGGAGAAATACGAGAAGCTGGCGGGCCGGGGC
GGCCCCGGGAGCGCGGCGGGGCGGTTTCCCGCGGAGCCTTCGCCGCCGAGGCCGGTCCCG
CGGGGCCAAGGCGACGCGGACTTCTTCTGTAG (SEQ ID NO: 9)
```

Neurog3, также известный как нейрогенин 3 или Ngn3, представляет собой основной фактор транскрипции спираль-петля-спираль (bHLH), необходимый для развития эндокринной системы в поджелудочной железе и в кишечнике. Подходящими источниками нуклеиновых кислот, кодирующих Neurog3, являются, например, нуклеиновая кислота Neurog3 человека (и кодированные последовательности белка), доступная как GenBank Accession No. NM_020999.3 и NP_066279.2, соответственно.

NeuroD1, также известный как Neuro Differentiation 1 или NeuroD и бета-2 ($\beta 2$), является фактором транскрипции Neuro D-типа. Это основной фактор транскрипции спираль-петля-спираль, который образует гетеродимеры с другими белками bHLH и активирует транскрипцию генов, которые содержат специфическую последовательность ДНК, известную как E-box. Он регулирует экспрессию гена инсулина, а мутации этого гена приводят к сахарному диабету типа II. Подходящие источники нуклеиновых кислот, кодирующих NeuroD1, включают, например, нуклеиновую кислоту NeuroD1 человека (и кодированные последовательности белка), доступную как GenBank Accession No. NM_002500.4 и NP_002491.2 соответственно.

В одном варианте реализации аминокислотная последовательность полипептида NeuroD1 представлена в SEQ ID NO: 6:

```
MTKSYSESGLMGEPQPQGPSPWTDECLSSQDEEHEADKKEDDLETMNAEEDSLRNGGEE
EDEDEDELEEEEEEDDDQKPKRRGPKKKKMTKARLERFKLRMKANARERNRMHGLNAALDN
LRKVVPYCYSKTQKLSKIETLRLAKNYIWALSEILRSGKSPDLVSFVQTLCKGLSQPTTNLVAGC
LQLNPRFTLPEQNQDMPPHLPATASAFVHPYSYQSPGLPSPYPGTMDSSHVFHVKPPPHAYSA
ALEPFFESPLTDCTSPSFDGPLSPPLSINGNFSFKHEPSAEFEKNYAFTMHYPATLAGAQSHG
SIFSGTAAPRCEIPIDNIMSFDSHSHHERVMSAQLNAIFHD (SEQ ID NO: 6).
```

В другом варианте реализации последовательность нуклеиновой кислоты полинуклеотида NeuroD1 представлена в SEQ ID NO: 7.

ATGACCAAATCGTACAGCGAGAGTGGGCTGATGGGCGAGCCTCAGCCCCAAGGTCTCTCC
AAGCTGGACAGACGAGTGTCTCAGTTCTCAGGACGAGGAGCACGAGGCAGACAAGAAGGAGGAC
GACCTCGAAGCCATGAACGCAGAGGAGGACTCACTGAGGAACGGGGAGAGGAGGAGACGAAG
ATGAGGACCTGGAAGAGGAGGAAGAAGAGGAAGAGGAGGATGACGATCAAAAGCCCAAGAGACG
CGGCCCCAAAAAGAAGATGACTAAGGCTCGCCTGGAGCGTTTTAAATTGAGACGCGATGAAG
GCTAACGCCCGGAGCGGAACCGCATGCACGGACTGAACGCGGCGCTAGACAACCTGCGCAAGG
TGGTGCCTTGCTATTCTAAGACGCAGAAGCTGTCCAAAATCGAGACTCTGCGCTTGCCCAAGAA
CTACATCTGGGCTCTGTGCGAGATCTCGCGCTCAGGCAAAAGCCAGACCTGGTCTCC
TTCGTTTCAGACGCTTTGCAAGGGCTTATCCCAACCCACCACCAACCTGGTTGCGGGCTGCCTGC
AACTCAATCCTCGGACTTTTCTGCCTGAGCAGAACCAGGACATGCCCCGCACCTGCCGACGGC
CAGCGCTTCCTTCCCTGTACACCCCTACTCCTACCAGTGCCTGGGCTGCCAGTCCGCCTTAC
GGTACCATGGACAGCTCCCATGTCTTCCACGTTAAGCCTCCGCCGACGCTACAGCGCAGCGC
TGGAGCCCTTCTTTGAAAGCCCTCTGACTGATTGCACCAGCCCTTCCTTTGATGGACCCCTCAG
CCCGCCGCTCAGCATCAATGGCACTTCTCTTTCAACACGAACCGTCCGCCGAGTTTGAGAAA
AATTATGCCTTTACCATGCATATCTCTGCAGCGACACTGGCAGGGGCCCAAAGCCACGGATCAA
TCTTCTCAGGCACCGCTGCCCTCGCTGCGAGATCCCATAGACAATATTATGTCTTTCGATAG
CCATTACATCATGAGCGAGTCATGAGTGCCAGCTCAATGCCATATTCATGATTA G (SEQ
ID NO: 7).

Sox9 является транскрипционным фактором, который участвует в эмбриональном развитии. Sox9 был особенно исследован из-за его важности в развитии костей и скелета. SOX-9 распознает последовательность CCTTGAG вместе с другими членами HMG-box класса ДНК-связывающих белков. В контексте раскрытия, представленного в настоящем документе, использование Sox9 может быть вовлечено для поддержания массы клеток-предшественников поджелудочной железы до или после индукции трансдифференцировки. Подходящие источники нуклеиновых кислот, кодирующих Sox9, включают, например, нуклеиновую кислоту Sox9 человека (и кодированные последовательности белка), доступную как GenBank Accession No. NM_000346.3 и NP_000337.1 соответственно.

Гомология в одном варианте реализации определяется компьютерным алгоритмом для выравнивания последовательностей хорошо описанными способами в данной области. Например, анализ гомологии нуклеотидных последовательностей компьютерным алгоритмом может включать использование любого количества доступных программных пакетов, таких как, например, BLAST, DOMAIN, BEAUTY (BLAST Enhanced Alignment Utility), пакеты GENPEPT и TREMBL.

В другом варианте реализации "гомология" относится к идентичности последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 4-9 более чем 60%. В другом варианте реализации "гомология" относится к идентичности последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1-76 более чем 70%. В другом варианте идентичность составляет более чем 75%, более чем 78%, более чем 80%, более чем 82%, более чем 83%, более чем 85%, более чем 87%, более чем 88%, более чем 90%, более чем 92%, более чем 93%, более чем 95%, более чем 96%, более чем 97%, более чем 98% или более чем 99%. В другом варианте реализации идентичность составляет 100%. Каждая возможность представляет собой отдельный вариант раскрытия, представленного в настоящем документе.

В другом варианте реализации гомология определяется путем определения гибридизации с возможной кандидатурой, способы которой хорошо описаны в данной области (см., например, "Nucleic Acid Hybridization" Hames, BD and Higgins SJ, Eds. (1985); Sambrook et al., 2001, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, NY; and Ausubel et al., 1989, Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.XI. Например, способы гибридизации могут быть проведены в умеренных или жестких условиях, в дополнение к ДНК, кодирующей нативный каспазный пептид. Условия гибридизации представляют собой, например, инкубацию в течение ночи при 42°C в растворе, включающем: 10-20% формамида, 5 X SSC (150 mM NaCl, 15 тринатрийцитрат), 50 mM фосфата натрия (pH 7, 6), 5 X раствор Денхардта, 10% декстрансульфата и 20 мкг/мл денатурированной, измельченной ДНК спермы лосося.

Гомология белка и/или пептида для любой аминокислотной последовательности, приведенной в настоящем документе, определяется в одном варианте реализации с помощью способов, хорошо описанных в данной области, включая иммуноблот-анализ, или посредством компьютерного алгоритма - анализа аминокислотных последовательностей с использованием любого из числа доступных программных пакетов с помощью хорошо известных методов. Некоторые из этих пакетов могут включать пакеты FASTA, BLAST, MPsrch или Scanps и могут использовать, например, алгоритмы Smith и Waterman и/или глобальные/локальные или BLOCKS-выравнивания для анализа. Каждый способ определения гомологии представляет собой отдельный вариант раскрытия, представленного в настоящем документе.

Клеткой может быть любая клетка, которая способна продуцировать гормоны поджелудочной железы, например клетка костного мозга, мышцы, селезенки, почки, крови, кожи, поджелудочной железы или печени. В одном варианте реализации клетка представляет собой клетку, не являющуюся клеткой поджелудочной железы. В другом варианте реализации клетка представляет собой непанкреатическую β-клетку. В одном варианте реализации клетки способны функционировать как островок поджелудочной

железы, т.е. хранить, обрабатывать и секретировать гормоны поджелудочной железы. В другом варианте реализации секрция регулируется глюкозой.

[illegible]

В другом варианте реализации гормон поджелудочной железы включает инсулин, который может быть секретирован по внеклеточному триггеру. В другом варианте реализации клетка представляет собой клетку печени. В дополнительных вариантах реализации клетка является тотипотентной или плюрипотентной. В альтернативных вариантах реализации клетка представляет собой гемопоэтические стволовые клетки, эмбриональную стволовую клетку или предпочтительно печеночную стволовую клетку. В других вариантах реализации клетка представляет собой индуцированные плюрипотентные стволовые клетки.

В одном варианте реализации источником клеточной популяции, описанным в настоящем документе, является человеческий источник. В другом варианте реализации источник клеточной популяции, описанный в настоящем документе, является аутологичным человеческим источником по отношению к субъекту, нуждающемуся в терапии инсулином. В другом варианте реализации источник клеточной популяции, описанный в настоящем документе, является аллогенным человеческим источником по отношению к субъекту, нуждающемуся в терапии инсулином.

В некоторых вариантах реализации клетка представляет собой мезенхимальную стволовую клетку, также известную как мезенхимальная стромальная клетка (МСК, MSC), такая как МСК, полученная из ткани печени, жировой ткани, костного мозга, кожи, плаценты, пуповины, вартоновского студня или пупо-

винной крови. Под "пупочной кровью" или "пуповинной кровью" подразумевается кровь, полученная от новорожденного или плода, наиболее предпочтительно новорожденного и предпочтительно относится к крови, которая получена из пуповины или плаценты новорожденных. Эти клетки могут быть получены в соответствии с любым общепринятым способом, известным в данной области. МСК определяются экспрессией определенных маркеров поверхности клеток, включая, но не ограничиваясь ими, CD105, CD73 и CD90 и способностью дифференцироваться во множество линий, включая остеобласты, адипоциты и хондробласты. МСК может быть получена из тканей обычными методами выделения, такими как пластическая адгезия, разделение с использованием моноклональных антител, таких как STRO-I, или через эпителиальные клетки, подвергающиеся эпителиально-мезенхимной транзиции (EMT).

Специалисту в данной области было бы понятно, что термин "мезенхимальные стволовые клетки, полученные из жировой ткани", может охватывать недифференцированные взрослые стволовые клетки, выделенные из жировой ткани, и также может быть термином "жировые стволовые клетки", имеющим все те же качества и значения. Эти клетки могут быть получены в соответствии с любым общепринятым способом, известным в данной области.

Специалисту в данной области было бы понятно, что термин "мезенхимальные стволовые клетки, полученные из плаценты", может охватывать недифференцированные взрослые стволовые клетки, выделенные из плаценты, и может упоминаться в настоящем документе как "плацентарные стволовые клетки", имеющие все те же значения и качества.

Популяция клеток, которая подвергается воздействию, то есть контактирует с соединениями (т.е. полипептидами PDX-1, Pax-4, MafA, NeuroD1 и/или Sox-9 или нуклеиновой кислотой, кодирующей PDX-1, Pax-4, полипептиды MafA, NeuroD1 и/или Sox-9) может быть любым количеством клеток, то есть одной или несколькими клетками, и может быть обеспечено *in vitro*, *in vivo* или *ex vivo*. Клеточная популяция, которая контактирует с факторами транскрипции, может быть размножена *in vitro* до контакта с факторами транскрипции. Полученная клеточная популяция демонстрирует фенотип зрелых панкреатических бета-клеток. Эти клетки могут быть размножены *in vitro* способами, известными в данной области техники, до трансдифференцировки и созревания по линии β -клеток, а также до введения или доставки пациенту, или пациенту, нуждающемуся в этом.

Субъект в одном варианте реализации представляет собой млекопитающее. Млекопитающее может быть, например, человеком, приматом, не являющимся человеком, мышью, крысой, собакой, кошкой, лошадью или коровой.

В некоторых вариантах реализации фактор транскрипции представляет собой полипептид, такой как PDX-1, Pax-4, MafA, NeuroD1 или Sox-9 или их комбинацию и доставляется в клетку способами, известными в данной области. Например, полипептид фактора транскрипции предоставляется непосредственно к клеткам или доставляется через микрочастицу или наночастицу, например липосомальный носитель.

В некоторых вариантах реализации фактор транскрипции представляет собой нуклеиновую кислоту. Например, нуклеиновая кислота кодирует полипептид PDX-1, Pax-4, MafA, NeuroD1 или Sox-9. Нуклеиновая кислота, кодирующая фактор транскрипции, или комбинация таких нуклеиновых кислот, может быть доставлена в клетку любыми способами, известными в данной области. В некоторых вариантах реализации нуклеиновая кислота встроена в вектор экспрессии или вирусный вектор. В одном варианте реализации вирусный вектор представляет собой вектор аденовируса. В другом варианте реализации аденовирусным вектором является аденовирусный вектор первого поколения (FGAD). В другом варианте реализации FGAD не может интегрироваться в геном клетки. В другом варианте реализации FGAD содержит рекомбинантный аденовирусный вектор без E1. В другом варианте реализации FGAD обеспечивает кратковременную экспрессию кодированных полипептидов.

Экспрессирующий или вирусный вектор можно вводить в клетку любым из следующих способов: трансфекция, электропорация, инфекция или трансдукция. В других вариантах реализации нуклеиновая кислота представляет собой мРНК и доставляется, например, электропорацией. В одном варианте реализации способы электропорации включают технологию проточной электропорации. Например, в другом варианте реализации способы электропорации включают использование системы электропорации MaxCyte (MaxCyte Inc., Джорджия, США).

В некоторых вариантах реализации промышленная популяция клеток, продуцирующих человеческий инсулин, включает снижение фенотипических маркеров печени. В одном варианте реализации существует снижение экспрессии альбумина, альфа-1-антитрипсина или их комбинации. В другом варианте реализации менее 5% популяции клеток, экспрессирующих эндогенный PDX-1, экспрессирует альбумин и альфа-1-антитрипсин. В другом варианте реализации менее 10, 9, 8, 7, 6, 4, 3, 2 или 1% клеточной популяции, экспрессирующие эндогенный PDX-1, экспрессируют альбумин и альфа-1-антитрипсин.

Клеточные популяции, предрасположенные к трансдифференцировке

Представленное в настоящем документе раскрытие представляет собой популяции клеток печени, которые предрасположены к трансдифференцировке. Клеточные популяции могут быть полезны в способах получения бета-клеток поджелудочной железы, описанных в настоящем документе. Клетки, которые предрасположены к трансдифференцировке настоящего раскрытия, представленного в настоящем

документе, могут также упоминаться как имеющие увеличенную или обогащенную способность к трансдифференцировке. Под "увеличенной способностью к трансдифференцировке" подразумевается, что когда клеточная популяция настоящего раскрытия, представленного в настоящем документе, подвергается протоколу дифференцировки (т.е. введению фактора транскрипции поджелудочной железы), более чем 15%, более чем 20%, более чем 30%, более чем 40%, более чем 50%, более чем 60%, более чем 70% или более чем 80% клеток могут дифференцироваться в альтернативный тип клеток. В одном варианте реализации популяция эндотелиальных клеток, эпителиальных клеток, мезенхимальных клеток, фибробластов или клеток печени с повышенной способностью к трансдифференцировке может быть дифференцирована в зрелые клетки поджелудочной железы или зрелые нервные клетки (трансдифференцировка).

В другом варианте реализации популяции клеток, которые предрасположены к трансдифференцировке, обладают способностью активировать элемент ответа глутаминсинтетазы (GSRE). Например, в популяциях клеток настоящего раскрытия, представленного в настоящем документе, по меньшей мере 2%, по меньшей мере 3%, по меньшей мере 4%, по меньшей мере 5%, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 15%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80% или по меньшей мере 90% клеток в популяции способны активировать GSRE. В одном варианте реализации по меньшей мере 30% клеток в популяции способны активировать GSRE. Глутаминсинтаза является ферментом, который преимущественно экспрессируется в мозге, почках и печени, и играет существенную роль в метаболизме азота, катализируя конденсацию глутамата и аммиака с образованием глутамина. Глутаминсинтаза, например, однозначно экспрессируется в периферических клетках печени и астроцитах в головном мозге. Представленные в настоящем документе данные демонстрируют, что клетки, которые проявляют активацию GSRE, обеспечивают уникальный избирательный параметр для выделения клеток, предрасположенных к трансдифференцировке. В другом варианте реализации предрасположенная популяция клеток включает периферические клетки печени.

Активацию GSRE можно измерить способами, известными специалисту в данной области техники. Например, может быть получен рекомбинантный аденовирус, содержащий элемент ответа глутаминсинтетазы, функционально связанный с промотором и репортерным геном, таким как флуоресцентный белок. Этот рекомбинантный аденовирус с GSRE-репортером может быть введен в гетерогенную смесь клеток, содержащую некоторую долю клеток, которые предрасположены к трансдифференцировке. Те клетки, которые являются компетентными для активации GSRE, будут экспрессировать репортерный ген, который может быть обнаружен способами, известными в данной области, тем самым идентифицируя клетки, предрасположенные к трансдифференцировке.

Неоднородную популяцию клеток, в которой клетки, предрасположенные к трансдифференцировке, неизвестны, можно привести в контакт с аденовирусным вектором, который содержит GSRE, оперативно связанный с минимальным промотором ТК и eGFP. Клетки, которые активируют GSRE, будут экспрессировать GFP и могут быть идентифицированы различными способами, известными в данной области техники, для обнаружения экспрессии GFP. Например, разделение GSRE-активированных клеток, которые предрасположены к трансдифференцировке из клеток, которые не предрасположены к трансдифференцировке, может быть достигнуто с помощью аппарата FAC, сортировщика и методов, известных специалистам в данной области (фиг. 14). Отделенные клетки, которые предрасположены к трансдифференцировке, могут затем распространяться или размножаться *in vitro*. Результаты, описанные в настоящем документе, демонстрируют, что пассаж клеток, предрасположенных к трансдифференцировке в течение 5-12 пассажей или более, сохраняет их способность к трансдифференцировке. Например, изолированные клетки печени, предрасположенные к трансдифференцировке, продолжают вырабатывать и секретировать инсулин в зависимости от глюкозы даже после 12 пассажей в культуре (фиг. 17).

В другом варианте реализации популяции клеток, которые предрасположены к трансдифференцировке, также имеют активные сигнальные пути Wnt. Сигнальные пути Wnt играют значительную роль в плюрипотентности стволовых клеток и судьбе клеток во время развития, а также в формировании оси тела, пролиферации клеток и миграции клеток. Wnt-сигнальные пути активируются связыванием лиганда Wnt-белка с рецептором семейства Frizzled (Fz) (G-связанный белковый рецептор), необязательно активируя белок корецептор с последующей активацией цитоплазматического белка под названием Dishevelled (DSH). В каноническом пути Wnt также активируется корецептор LRP-5/6 и бета-катенин накапливается в цитоплазме и в конце концов транслируется в ядро, чтобы действовать как транскрипционный коактиватор факторов транскрипции TCF/LEF. Без Wnt сигнализации комплекс уничтожения, включающий белки, такие как adenomatosis polyposis coli (APC), Axin, белковую фосфатазу 2A (PP2A), гликогенсинтазу киназу 3 (GSK3) и казеинкиназу 1 α (CK1 α), нацеливает β -катенин на убиквитинирование и его последующую деградацию в протеасоме. Однако активация рецептора Frizzled связыванием Wnt вызывает разрушение комплекса разрушения, что позволяет накапливать β -катенин.

Передача сигналов Wnt может также происходить через неканонические пути, в которых используются различные белки корецептора и активируются различные нисходящие эффекторы, например, для регулирования цитоскелета, стимуляции высвобождения кальция из эндоплазматического ретикула, регуляции

активации путей mTOR и регулирования миогенеза.

Специалист в данной области техники может легко использовать способы, известные в данной области, для определения активации сигнальных путей Wnt. Например, клетки, которые экспрессируют Wnt3a, уменьшенные уровни DKK1 или DKK3, уменьшенные уровни APC, увеличенные активированные уровни бета-катенина или STAT3-связывающих элементов имели активные сигнальные пути Wnt. DKK1, DKK3 и APC являются известными ингибиторами сигнальных путей Wnt. Другие сигнальные эффекторы, которые свидетельствуют об активных сигнальных путях Wnt, хорошо известны в данной области техники.

В одном варианте реализации раскрытые способы дополнительно включают обработку первичной популяции клеток печени взрослого человека литием, причем указанная обработанная популяция обогащена клетками, предрасположенными к трансдифференцировке. В другом варианте реализации раскрытые способы дополнительно включают обработку первичной популяции клеток печени взрослого человека литием, причем указанные клетки, предрасположенные к трансдифференцировке в пределах популяции, имеют повышенную предрасположенность после обработки литием. Таким образом, обогащенная популяция клеток, предрасположенных к трансдифференцировке, может быть создана путем обработки первичной взрослой популяции клеток литием.

В одном варианте реализации первичная популяция клеток взрослого обрабатывается 10 мМ лития. В другом варианте реализации первичная популяция клеток взрослого обрабатывается 1 мМ лития. В одном варианте реализации первичная популяция клеток взрослого обрабатывается между 1-10 мМ лития. В одном варианте реализации первичная популяция клеток взрослого обрабатывается 2 мМ лития. В одном варианте реализации первичная популяция клеток взрослого обрабатывается 3 мМ лития. В одном варианте реализации первичная популяция клеток взрослого обрабатывается 4 мМ лития. В одном варианте реализации первичная популяция клеток взрослого обрабатывается 5 мМ лития. В одном варианте реализации первичная популяция клеток взрослого обрабатывается 6 мМ лития. В одном варианте реализации первичная популяция взрослых клеток обрабатывается 7 мМ лития. В одном варианте реализации первичная популяция взрослых клеток обрабатывается 8 мМ лития. В одном варианте реализации первичная популяция клеток взрослого обрабатывается 9 мМ лития. В одном варианте реализации первичная популяция клеток взрослого обрабатывается около 10-20 мМ лития. В одном варианте реализации первичная популяция клеток взрослого обрабатывается 15 мМ лития. В одном варианте реализации первичная популяция клеток взрослого обрабатывается 20 мМ лития. В одном варианте реализации первичная популяция клеток взрослого обрабатывается 10-50 мМ лития. В одном варианте реализации первичная популяция клеток взрослого обрабатывается 10-100 мМ лития.

В другом варианте реализации клетки обрабатывали до времени трансдифференцировки (первый период времени). В другом варианте реализации клетки обрабатывали за 12 ч до трансдифференцировки (первый период времени). В другом варианте реализации клетки обрабатывали за 24 ч до трансдифференцировки (первый период времени). В другом варианте реализации клетки обрабатывали за 36 ч до трансдифференцировки (первый период времени). В другом варианте реализации клетки обрабатывали за 48 ч до трансдифференцировки (первый период времени). В другом варианте реализации клетки обрабатывали за 60 ч до трансдифференцировки (первый период времени). В другом варианте реализации клетки обрабатывали за 72 ч до трансдифференцировки (первый период времени). В еще одном варианте реализации клетки обрабатывали во время трансдифференцировки (первый период времени).

В одном варианте реализации популяции клеток, используемые в описанных в настоящем документе способах, предрасположены к трансдифференцировке по линии поджелудочной железы, где трансдифференцированные клетки проявляют фенотип и функцию клеток поджелудочной железы. Например, трансдифференцированные клетки проявляют фенотип и функцию зрелых панкреатических бета-клеток, которые включают, но не ограничиваются ими, экспрессию, продуцирование и/или секрецию гормонов поджелудочной железы. Гормоны поджелудочной железы могут включать, но не ограничиваются ими, инсулин, соматостатин, глюкагон или островковый амилоидный полипептид (IAPP). Инсулин может быть печеночным инсулином или сывороточным инсулином. В одном варианте реализации инсулин представляет собой полностью технологическую форму инсулина, способную стимулировать расходование глюкозы, и углеводный, жировой и белковый обмен. Например, клетки, предрасположенные к трансдифференцировке, могут охватывать около 15% всех клеток в гетерогенной первичной культуре клеток печени человека *in vitro*. Когда клетки эктопически экспрессируют пТФ, более чем 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50% клеток в культуре продуцируют инсулин или секретируют С-пептид.

В одном варианте реализации популяции клеток, которые предрасположены к трансдифференцировке, расположены в непосредственной близости от центральных вен печени или являются периферическими клетками печени. Как продемонстрировано в настоящем документе, хотя более 40-50% клеток печени, которые эктопически экспрессируют панкреатические транскрипционные факторы, такие как PDX-1, только подмножество клеток продуцирует инсулин после экспрессии пТФ. Эти инсулин-продуцирующие клетки (ИПК, IPC) были в основном расположены вблизи вентральных вен, как проиллюстрировано на фиг. 10В. Эти клетки также характеризуются экспрессией глютаминсинтетазы и активной Wnt сигнализацией.

В другом варианте популяции клеток, используемые в описанных в настоящем документе способах, предрасположены к трансдифференцировке к нейронной линии, причем трансдифференцированные клетки экспрессируют нейральные маркеры, проявляют нейронный фенотип или проявляют нейронную функцию. Трансдифференцированными клетками могут быть нейроны или глиальные клетки.

В другом варианте реализации клетки с повышенной предрасположенностью к трансдифференцировке могут быть идентифицированы с помощью определенных маркеров клеточной поверхности. Например, клетки с повышенными уровнями HOMER 1, LAMP3 или BMRP2 свидетельствуют о клетках с повышенной способностью к трансдифференцировке по сравнению с клетками без предрасположенности к трансдифференцировке. Клетки с пониженными уровнями ABCB1, ITGA4, ABCB4 или PRNP свидетельствуют о клетках с повышенной способностью к трансдифференцировке по сравнению с клетками без предрасположенности к трансдифференцировке. Любая комбинация описанных маркеров клеточной поверхности может использоваться для выделения популяции клеток, предрасположенной к трансдифференцировке из популяции клеток, которая не предрасположена к трансдифференцировке. Антитела к этим маркерам клеточной поверхности являются коммерчески доступными. Методы иммуноанализа или иммуноаффинности, известные в данной области, могут быть использованы для отделения клеток с повышенной способностью к трансдифференцировке от клеток без способности к трансдифференцировке.

Использование популяций клеток, представленной в описании данного документа для получения клеток, которые проявляют фенотипы клеток поджелудочной железы, дает определенные преимущества перед дифференцировкой гетерогенных популяций клеток, не являющихся клетками поджелудочной железы, для продуцирования клеток, которые проявляют фенотипы клеток поджелудочной железы. Предыдущие исследования, описывающие экспрессию фактора транскрипции поджелудочной железы (пТФ), такого как PDX-1, в гетерогенной популяции клеток, не являющихся поджелудочной железой (т.е. клеток печени), показывают, что в лучшем случае только 15% клеток, экспрессирующих PDX-1, являются компетентными для продукции инсулина. Таким образом, только 15% клеток были успешно дифференцированы до зрелой бета-клетки поджелудочной железы, способной продуцировать и секретировать гормоны поджелудочной железы. Напротив, введение пТФ в популяции клеток настоящего раскрытия, представленного в настоящем документе, дает по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70% или по меньшей мере 80% клеток дифференцированных до зрелых фенотипов бета-клеток поджелудочной железы, которые, например, продуцируют инсулин, глюкагон и/или секретируют С-пептид. В одном варианте реализации, когда клетки клеточной популяции настоящего раскрытия, представленного в настоящем документе, экспрессируют панкреатический фактор транскрипции, по меньшей мере 30% клеток продуцируют инсулин или секретируют С-пептид.

Способы трансдифференцировки

Представленное в настоящем документе раскрытие также предлагает способы использования популяций клеток с повышенной способностью к трансдифференцировке для продуцирования клеток, которые обладают зрелым дифференцированным типом клеток, причем дифференцированная клетка имеет другой фенотип из популяции исходных клеток. Например, популяция клеток с повышенной способностью к трансдифференцировке (например, эпителиальные клетки, фибробласты или клетки печени) может быть дифференцирована до клеток поджелудочной железы или нейронной линии, чтобы иметь зрелые дифференцированные фенотипы клеток поджелудочной железы или нейронных клеток. Могут быть использованы любые средства, известные в данной области для дифференцировки клеток поджелудочной или нейронной линии.

В одном варианте реализации популяция клеток, предрасположенная к трансдифференцировке, может дифференцироваться по нейронной линии через экспрессию нейронных транскрипционных факторов. Подходящие нейронные транскрипционные факторы известны в данной области. В других вариантах клеточная популяция настоящего раскрытия, представленного в настоящем документе, может быть дифференцирована по отношению к зрелым нервным клеткам посредством контактирования клеток с различными цитокинами, факторами роста или другими агентами, известными в данной области, для дифференцировки клеток до нейронной линии. Дифференцированные нервные клетки могут экспрессировать нейронные маркеры, проявлять нейронный фенотип (т.е. профиль экспрессии нейральных генов) или проявлять нейронную функцию. Дифференцированные клетки могут быть нейронами или глиальными клетками.

В другом варианте реализации популяция клеток, предрасположенная к трансдифференцировке, может быть дифференцирована по линии поджелудочной железы через экспрессию факторов транскрипции поджелудочной железы. Панкреатическими факторами транскрипции являются, например, PDX-1, Pax-4, MafA, NeuroD1 или их комбинация. Способы получения бета-клеток поджелудочной железы описаны в патенте США № 6774120 и публикации США № 2005/0090465, содержание которых включено в качестве ссылки во всей их полноте.

В другом варианте реализации популяция клеток, предрасположенная к трансдифференцировке, может быть дифференцирована по линии поджелудочной железы посредством способов, описанных в настоящем документе.

Фенотипы бета-клеток поджелудочной железы

Приведенные в настоящем документе способы позволяют получить клетки со зрелым фенотипом или функцией бета-клеток поджелудочной железы. Специалисту в данной области было бы понятно, что термин "фенотип или функция панкреатических бета-клеток" может охватывать клетки, которые отображают одну или несколько характеристик, характерных для бета-клеток поджелудочной железы, т.е. продуцирование гормонов поджелудочной железы, обработку, хранение в секреторных гранулах, секрецию гормонов, активацию промоторов гена поджелудочной железы или характеристику профиля экспрессии генов бета-клеток. Секреция гормонов включает секрецию, регулируемую питанием и/или гормонально регулируемую секрецию. В одном варианте реализации продуцируемые клетки проявляют по меньшей мере один фенотип или функцию панкреатических бета-клеток, как описано в настоящем документе.

Гормон поджелудочной железы может представлять собой, например, инсулин, глюкагон, соматостатин или островковый амилоидный полипептид (IAPP). Инсулин может быть печеночным инсулином или сывороточным инсулином. В другом варианте реализации панкреатический гормон представляет собой сывороточный инсулин. В альтернативном варианте реализации гормон поджелудочной железы представляет собой сывороточный инсулин (то есть полностью обработанную форму инсулина, способную стимулировать, например, расходование глюкозы, углеводный, жировой и белковый обмен).

В некоторых вариантах реализации гормон поджелудочной железы находится в форме "прогормона". В других вариантах реализации гормон поджелудочной железы находится в полностью обработанной биологически активной форме гормона. В других вариантах реализации гормон поджелудочной железы находится под регулятивным контролем, т.е. секреция гормона находится под контролем питания и гормональным контролем, подобным эндогенно продуцируемым панкреатическим гормонам. Например, в одном варианте реализации, раскрытом в настоящем документе, гормон находится под регулятивным контролем глюкозы.

Фенотип бета-клеток поджелудочной железы может быть определен, например, путем измерения производства панкреатического гормона, то есть мРНК белка инсулина, соматостатина или глюкагона или экспрессии белка. Производство гормонов может быть определено способами, известными в данной области, т.е. иммуноанализом, вестерн-блоттингом, анализом связывания с рецептором или функциональной способностью устранять гипергликемию при имплантации диабетическому хозяину. Секрецию инсулина можно также измерять, например, обработкой и секрецией С-пептида. В другом варианте реализации высокочувствительные анализы могут быть использованы для измерения секреции инсулина. В другом варианте реализации высокочувствительные анализы включают иммуноферментный анализ, связанный с ферментом (ELISA), анализ мезомасштабного обнаружения (MSD) или анализ с Enzyme-Linked ImmunoSpot assay (ELISpot), или анализ, известный в данной области.

В некоторых вариантах реализации клетки могут быть направлены на продуцирование и секрецию инсулина с использованием способов, указанных в настоящем документе. Способность клетки вырабатывать инсулин может быть проанализирована различными способами, известными специалистам в данной области. Например, мРНК инсулина может быть обнаружена с помощью ОТ-ПЦР, или инсулин может быть обнаружен с помощью антител против инсулина. Кроме того, другие показатели дифференцировки поджелудочной железы включают экспрессию генов Isl-1, Pdx-1, Pax-4, Pax-6 и Glut-2. Другие фенотипические маркеры для идентификации островковых клеток раскрыты в US 2003/0138948, которые включены в настоящем документе полностью.

Фенотип бета-клеток поджелудочной железы можно определить, например, путем активации промотора поджелудочной железы. Особый интерес для специфичных для поджелудочной железы промоторов представляют промоторы для факторов транскрипции инсулина и поджелудочной железы, т.е. эндогенных PDX-1. Активацию промотора можно определить способами, известными в данной области, например, с помощью люциферазного анализа, EMSA или обнаружения последующей экспрессии гена.

В некоторых вариантах реализации фенотип бета-клеток поджелудочной железы также может быть определен путем индукции экспрессии гена поджелудочной железы. Специалисту в данной области было бы понятно, что термин "профиль экспрессии гена поджелудочной железы" может охватывать профиль, включающий экспрессию одного или нескольких генов, которые обычно транскрипционно молчат в не-эндокринных тканях, то есть фактор транскрипции поджелудочной железы, панкреатические ферменты или гормоны поджелудочной железы. Ферментами поджелудочной железы являются, например, PCSK2 (PC2 или прогормонная конвертаза), PCI/3 (прогормонная конвертаза 1/3), глюкокиназа, транспортер глюкозы 2 (GLUT-2). К факторам транскрипции, специфичным для поджелудочной железы, относятся, например, Nkx2.2, Nkx6.1, Pax-4, Pax-6, MafA, NeuroD1, NeuroG3, Ngn3, beta-2, ARX, BRAIN4 и Isl-1.

Индукцию экспрессии гена поджелудочной железы можно определить с помощью методов, хорошо известных специалисту в данной области. Например, последовательности РНК поджелудочной железы могут быть обнаружены, например, в анализах на основе гибридизации в нозерн-блоте, методах детектирования на основе амплификации, таких как полимеразная цепная реакция на основе обратной транскрипции или системное обнаружение с помощью микроочипового анализа. Альтернативно, экспрессию можно также измерять на уровне белка, то есть путем измерения уровней полипептидов, кодируемых

геном. В конкретном варианте реализации ген PCI/3 или экспрессия белка может быть определена его активностью при обработке прогормонов до их активной зрелой формы. Такие способы хорошо известны в данной области и включают, например, иммунологические анализы на основе антител к белкам, кодируемым генами, или ВЭЖХ обработанных прогормонов.

В некоторых вариантах реализации клетки, проявляющие зрелый фенотип бета-клеток, сгенерированный описанными в настоящем документе способами, могут подавлять по меньшей мере один ген или профиль экспрессии генов исходной клетки. Например, клетка печени, которая индуцирована для проявления зрелого фенотипа бета-клеток, может подавлять, по меньшей мере, один ген, специфичный для печени. Специалист в данной области может легко определить экспрессию, специфичную для печени, для исходной клетки и продуцируемых клеток с использованием методов, известных в данной области, то есть измерения уровней мРНК или полипептидов, кодируемых генами. При сравнении снижение экспрессии гена, специфичного для печени, указывает на то, что произошла трансдифференцировка.

В некоторых вариантах реализации в трансдифференцированных клетках, описанных в настоящем документе, проявляется снижение фенотипических маркеров печени. В одном варианте реализации существует снижение экспрессии альбумина, альфа-1-антитрипсина или их комбинации. В другом варианте реализации менее 5% популяции клеток, экспрессирующих эндогенный PDX-1, экспрессирует альбумин и альфа-1-антитрипсин. В другом варианте реализации менее 10, 9, 8, 7, 6, 4, 3, 2 или 1% трансдифференцированных клеток, экспрессирующих эндогенный PDX-1, экспрессируют альбумин и альфа-1-антитрипсин.

Способы лечения патологии поджелудочной железы

В настоящем раскрытии, представленном в настоящем документе, раскрыты способы использования для лечения, то есть предотвращения или задержки начала или облегчения симптома заболевания поджелудочной железы у субъекта. Например, патология поджелудочной железы является дегенеративной патологией поджелудочной железы. Способы, раскрытые в настоящем документе, особенно полезны для тех патологий поджелудочной железы, которые вызваны или приводят к потере клеток поджелудочной железы, например, бета-клеток островков, или к потере функции поджелудочной железы.

Общие дегенеративные нарушения поджелудочной железы включают, но не ограничиваются ими: диабет (например, тип I, тип II или гестационный) и рак поджелудочной железы. Другие патологии поджелудочной железы или патологии, связанные с поджелудочной железой, которые можно лечить с использованием способов, описанных в настоящем документе, представляют собой, например, гипергликемию, панкреатит, панкреатические псевдокисты или повреждение поджелудочной железы, вызванное травмой. Кроме того, индивидуумы, у которых была панкреатэктомия, также пригодны для лечения описанными способами.

Диабет - это метаболическая патология, обнаруженная в трех формах: тип 1, тип 2 и гестационная. Тип 1 или IDDM-аутоиммунное заболевание; иммунная система разрушает бета-клетки поджелудочной железы, продуцирующие инсулин, уменьшая или устраняя способность поджелудочной железы продуцировать инсулин. Пациенты с диабетом 1 типа должны ежедневно принимать дополнительные количества инсулина для поддержания жизни. Симптомы обычно быстро развиваются и включают повышенную жажду и мочеиспускание, хронический голод, потерю веса, помутнение зрения и усталость. Сахарный диабет 2 типа является наиболее распространенным заболеванием, о чем свидетельствуют цифра 90-95% среди страдающих диабетом. Это связано со старшим возрастом, ожирением, семейной историей, предыдущим гестационным диабетом, физической бездеятельностью и этнической принадлежностью. Гестационный диабет встречается только во время беременности. У женщин, у которых развивается гестационный диабет, вероятность развития диабета типа 2 составляет от 20 до 50% в течение пятидесяти лет.

Субъект, страдающий или подверженный риску развития диабета, идентифицируется способами, известными в данной области, такими как определение уровней глюкозы в крови. Например, уровень глюкозы в крови выше 140 мг/дл по меньшей мере в два раза после ночного голодания означает, что у человека диабет. Лицо, не страдающее или подверженное риску развития диабета, характеризуется тем, что уровень сахара натощак составляет 70-110 мг/дл.

Симптомы диабета включают усталость, тошноту, частое мочеиспускание, чрезмерную жажду, потерю веса, помутнение зрения, частые инфекции и медленное заживление ран или язв, артериальное давление постоянно равно или выше 140/90, холестерин ЛПВП менее 35 мг/DL или триглицериды более 250 мг/дл, гипергликемия, гипогликемия, дефицит инсулина или резистентность. Диабетические или преддиабетические пациенты, которым вводят соединения, идентифицируют с использованием диагностических методов, известных в данной области.

Гипергликемия представляет собой патологию, связанную с поджелудочной железой, при которой чрезмерное количество глюкозы циркулирует в плазме крови. Это, как правило, уровень глюкозы выше (200 мг/дл). Субъект с гипергликемией может иметь или не иметь диабет.

Рак поджелудочной железы является четвертым наиболее распространенным раком в США, главным образом, у людей старше 60 лет и имеет самую низкую пятилетнюю выживаемость любого рака. Аденокарцинома, наиболее распространенный тип рака поджелудочной железы, возникает в выstelке

протоколов поджелудочной железы; цистаденокарцинома и карцинома ацинарных клеток реже. Однако доброкачественные опухоли также растут в поджелудочной железе; к ним относятся инсулинома - опухоль, которая выделяет инсулин, гастринома, которая выделяет более высокие, чем обычно, уровни гастрина, и глюкагонома - опухоль, которая выделяет глюкагон.

Причины рака поджелудочной железы не известны, но есть несколько рисков, включая диабет, курение сигарет и хронический панкреатит. Симптомы могут включать боль в верхней части живота, плохой аппетит, желтуху, потерю веса, патологию желудка, тошноту или рвоту, диарею, усталость, зуд или увеличенные органы брюшной полости. Диагностика проводится с помощью ультразвука, компьютерной томографии, магнитно-резонансной томографии, ЭРХП, трансгепатической холангиографии через кожу, биопсии поджелудочной железы или анализов крови. Лечение может включать хирургическое вмешательство, лучевую терапию или химиотерапию, лечение боли или зуда, препараты пероральных ферментов или лечение инсулином.

Панкреатит - это воспаление и аутолиз поджелудочной железы. При аутолизе поджелудочная железа разрушается своими ферментами, которые вызывают воспаление. Острый панкреатит обычно включает только один патологический инцидент, после чего поджелудочная железа возвращается к норме. Однако хронический панкреатит связан с постоянным повреждением поджелудочной железы и функции поджелудочной железы и может привести к фиброзу. Попеременно он может возникнуть после нескольких атак. Панкреатит чаще всего вызывают желчные камни, блокирующие проток поджелудочной железы, или злоупотребление алкоголем, что может привести к блокированию небольших каналов поджелудочной железы. Другие причины включают брюшную травму или хирургию, инфекции, почечную недостаточность, волчанку, кистозный фиброз, опухоль или яд жала скорпиона.

Симптомы, часто связанные с панкреатитом, включают боль в животе, возможно, иррадиацию в спину или грудь, тошноту или рвоту, быстрый пульс, лихорадку, верхнюю абдоминальную опухоль, асцит, пониженное кровяное давление или легкую желтуху. Эти симптомы могут быть связаны с другими заболеваниями, прежде чем их идентифицировать как связанные с панкреатитом.

Способ лечения неврологических патологий

В раскрытии, представленном в настоящем документе, также представлены способы лечения субъекта с неврологическим заболеванием или патологией, такой как нейродегенеративное заболевание. Популяция клеток, описанных в настоящем документе, полезна для лечения субъекта с неврологическим заболеванием или патологией, которое характеризуется потерей нейронных клеток или нервной функцией, путем пополнения дегенерированных или нефункциональных клеток. Нейродегенеративные заболевания, которые можно лечить с использованием описанных в настоящем документе способов, включают, но не ограничиваются ими, болезнь Паркинсона, паркинсонические патологии, болезнь Альцгеймера, болезнь Хантингтона, боковой амиотрофический склероз, болезнь Леви, возрастную нейродегенерацию, неврологические раковые заболевания и травму головного мозга в результате операции, несчастного случая, ишемии или инсульта. Популяция клеток, описанных в настоящем документе, может быть дифференцирована по отношению к нейронной популяции клеток с нейронной функцией, и дифференцированную популяцию нейронных клеток можно вводить субъекту с неврологическим заболеванием или патологией.

Рекомбинантные векторы экспрессии и клетки-хозяева

Другой вариант реализации, раскрытый в настоящем документе, относится к векторам. В одном варианте реализации вектор, используемый в раскрытых в настоящем документе способах, содержит вектор экспрессии. В другом варианте реализации экспрессирующий вектор содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую белок PDX-1, Pax-4, NeuroD1 или MafA, или другой фактор транскрипции поджелудочной железы, такой как Ngn3, или производные, фрагменты, аналоги, гомологи или их комбинации. В некоторых вариантах реализации экспрессирующий вектор содержит единственную нуклеиновую кислоту, кодирующую любой из следующих факторов транскрипции: PDX-1, Pax-4, NeuroD1, Ngn3, MafA или Sox-9 или их производные или их фрагменты. В некоторых вариантах реализации вектор экспрессии содержит две нуклеиновые кислоты, кодирующие любую комбинацию следующих факторов транскрипции: PDX-1, Pax-4, NeuroD1, Ngn3, MafA или Sox-9 или их производные или их фрагменты. В еще одном варианте реализации вектор экспрессии содержит нуклеиновые кислоты, кодирующие PDX-1 и NeuroD1. В еще одном варианте реализации экспрессирующий вектор содержит нуклеиновые кислоты, кодирующие PDX-1 и Pax4. В другом варианте реализации экспрессирующий вектор содержит нуклеиновые кислоты, кодирующие MafA.

Специалисту в данной области техники было бы понятно, что термин "вектор" охватывает молекулу нуклеиновой кислоты, способную транспортировать другую нуклеиновую кислоту, с которой она была связана. Один тип вектора представляет собой "плазмиду", которая охватывает линейную или круговую двухцепочечную петлю ДНК, в которую можно лигировать дополнительные сегменты ДНК. Другим типом вектора является вирусный вектор, в котором дополнительные сегменты ДНК могут быть лигированы в вирусный геном. Некоторые векторы способны к автономной репликации в клетке-хозяине, в которую они вводятся (например, бактериальные векторы, имеющие бактериальное происхождение репликации и эпизомальные векторы млекопитающих). Другие векторы (например, неэпизомальные векторы

млекопитающих) интегрируются в геном клетки-хозяина при введении в клетку-хозяин и, таким образом, реплицируются вместе с геномом хозяина. Более того, некоторые векторы способны направлять экспрессию генов, с которыми они оперативно связаны. Такие векторы упоминаются в настоящем документе как "векторы экспрессии". В целом, векторы экспрессии с полезными свойствами в методах рекомбинантной ДНК часто являются в форме плазмид. Специалисту в данной области было бы понятно, что термины "плазида" и "вектор" могут использоваться взаимозаменяемо, имея все те же качества и значения. В одном варианте реализации термин "плазида" является наиболее часто используемой формой вектора. Однако раскрытие, представленное в настоящем документе, предназначено для включения других форм векторов экспрессии, таких как вирусные векторы (например, репликационные дефектные ретровирусы, лентивирус, аденовирусы и аденоассоциированные вирусы), которые выполняют эквивалентные функции. Кроме того, некоторые вирусные векторы способны иметь в качестве мишени определенные типы клеток либо специфически, либо неспецифически.

Представленные в настоящем документе рекомбинантные экспрессирующие векторы содержат описанную в настоящем документе нуклеиновую кислоту в форме, подходящей для экспрессии нуклеиновой кислоты в клетке-хозяине, что означает, что рекомбинантные экспрессирующие векторы включают одну или несколько регуляторных последовательностей, выбранных на основе клетки-хозяина, чтобы использоваться для экспрессии, которые оперативно связаны с последовательностью нуклеиновой кислоты, которая должна быть экспрессирована. Под рекомбинантным экспрессирующим вектором специалист в данной области понимает, что термин "функционально связанный" может включать нуклеотидные последовательности, представляющие интерес, связанные с регуляторной последовательностью (последовательностями) способом, который позволяет экспрессировать нуклеотидную последовательность (например, *in vitro* системы транскрипции/трансляции или в клетке-хозяине, когда вектор вводится в клетку-хозяина). Специалисту в данной области было бы понятно, что термин "регуляторная последовательность" может включать промоторы, энхансеры и другие элементы управления экспрессией (например, сигналы полиаденилирования). Такие регуляторные последовательности описаны, например, в Goeddel; GENE EXPRESSION TECHNOLOGY: METHODS IN ENZYMOLOGY 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990). Регуляторные последовательности включают те, которые прямо определяют конститутивную экспрессию нуклеотидной последовательности во многих типах клеток-хозяев, и те, которые направляют экспрессию нуклеотидной последовательности только в определенных клетках-хозяевах (например, тканеспецифические регуляторные последовательности). Специалистам в данной области техники будет понятно, что конструкция вектора экспрессии может зависеть от таких факторов, как выбор трансформирующей клетки-хозяина, уровня экспрессии желаемого белка и т.д. Векторы экспрессии, описанные в настоящем документе, могут быть введены в клетки-хозяева, чтобы таким образом продуцировать белки или пептиды, включая слитые белки или пептиды, кодируемые нуклеиновыми кислотами, как описано в настоящем документе (например, PDX-1, Pax-4, MafA, NeuroD1 или Sox-9 белки или мутантные формы или их слитые белки и т.д.).

Например, вектор экспрессии содержит одну нуклеиновую кислоту, кодирующую фактор транскрипции, функционально связанный с промотором. В векторах экспрессии, содержащих две нуклеиновые кислоты, кодирующие факторы транскрипции, каждая нуклеиновая кислота может быть функционально связана с промотором. Промотор, функционально связанный с каждой нуклеиновой кислотой, может быть различным или одинаковым. Альтернативно, две нуклеиновые кислоты могут быть функционально связаны с одним промотором. Промоторами, используемыми для экспрессирующих векторов, раскрытых в настоящем документе, может быть любой промотор, известный в данной области. Обычно квалифицированный специалист может легко определить подходящие промоторы для клетки-хозяина, в которой должна быть экспрессирована нуклеиновая кислота, уровень экспрессии желаемого белка или время экспрессии и т.д. Промотор может быть конститутивным промотором, индуцибельным промотором или промотором, специфическим для определенного клеточного типа.

Рекомбинантные экспрессирующие векторы, раскрытые в настоящем документе, могут быть предназначены для экспрессии PDX-1 в прокариотических или эукариотических клетках. Например, PDX-1, Pax-4, MafA, NeuroD1 и/или Sox-9 могут быть экспрессированы в бактериальных клетках, таких как *E.coli*, клетках насекомых (с использованием векторов экспрессии бакуловируса) дрожжевых клетках или клетках млекопитающих. Подходящие клетки-хозяева обсуждаются дополнительно в Goeddel, GENE EXPRESSION TECHNOLOGY: METHODS IN ENZYMOLOGY 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990). Альтернативно, рекомбинантный вектор экспрессии можно транскрибировать и транслировать *in vitro*, например, с использованием регуляторных последовательностей промотора T7 и полимеразы T7.

Экспрессия белков в прокариотах чаще всего проводится в *E.coli* с векторами, содержащими конститутивные или индуцируемые промоторы, направляющие экспрессию либо слитых, либо не слитых белков. Гибридные векторы добавляют ряд аминокислот к кодируемому в нем белку, обычно к аминоконцу рекомбинантного белка. Такие гибридные векторы обычно выполняют три цели: (1) увеличить экспрессию рекомбинантного белка; (2) увеличить растворимость рекомбинантного белка и (3), помочь в очистке рекомбинантного белка, действуя как лиганд в аффинной очистке. Часто в гибридных векторах экспрессии сайт протеолитического расщепления встраивают на стыке гибридного фрагмента и реком-

бинантного белка для того, чтобы обеспечить отделение рекомбинантного белка от гибридного фрагмента после очистки гибридного белка. Такие ферменты и их последовательности когнантного распознавания включают фактор Ха, тромбин и энтерокиназу. Типичные гибридные векторы экспрессии включают pGEX (Pharmacia Biotech Inc, Smith and Johnson (1988) Gene 67: 31-40), pMAL (New England Biolabs, Беве́рли, Массачусетс) и pRIT5 (Pharmacia, Писка́тауэй, Нью-Джерси), которые соединяют S-трансферазу глутатиона (GST), белок связывания мальтозы E или белок A, соответственно, с целевым рекомбинантным белком.

Примеры подходящих индуцируемых не гибридных экспрессирующих векторов для *E.coli* включают pTtc (Amrann et al., (1988) Gene 69: 301-315) и pET 11d (Studier et al., GENE EXPRESSION TECHNOLOGY: METHODS IN ENZYMOLOGY 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990) 60-89).

Одна стратегия максимизации экспрессии рекомбинантного белка в *E.coli* заключается в экспрессии белка в принимающих бактериях с нарушенной способностью протеолитически расщеплять рекомбинантный белок. См., Gottesman, GENE EXPRESSION TECHNOLOGY: METHODS IN ENZYMOLOGY 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990) 119-128. Другая стратегия состоит в том, чтобы изменить последовательность нуклеиновой кислоты, которая должна быть встроена в экспрессирующий вектор, так что индивидуальные кодоны для каждой аминокислоты являются такими, которые предпочтительно используются в *E.coli* (Wada et al., (1992) Nucleic Acids Res. 20:2111-2118). Такое изменение последовательностей нуклеиновых кислот, описанных в настоящем документе, может быть осуществлено стандартными методами синтеза ДНК.

В другом варианте реализации экспрессирующий вектор PDX-1, Pax-4, MafA, NeuroD1 или Sox-9 представляет собой вектор экспрессии дрожжей. Примеры векторов экспрессии в дрожжах *S. cerevisiae* включают pYerSecI (Baldari, et al., 1987) EMBO J 6: 229-234), pMFa (Kujan and Herskowitz, (1982) Cell 30: 933-943), pJRY88 (Schultz et al., (1987) Gene 54: 113-123), pYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, Calif.) и picZ (Invitrogen Corp, San Diego, Calif.).

Альтернативно, PDX-1, Pax-4, MafA, NeuroD1 или Sox-9 могут быть экспрессированы в клетках насекомых с использованием векторов экспрессии бакуловируса. Бакуловирусные векторы, доступные для экспрессии белков в культивируемых клетках насекомых (например, клетки SF9), включают серии pAc (Smith et al. (1983) Mol Cell Biol 3:2156-2165) и серии pVL (Lucklow and Summers (1989) Virology 170:31-39).

В еще одном варианте реализации раскрытая в настоящем документе нуклеиновая кислота экспрессируется в клетках млекопитающих с использованием вектора экспрессии млекопитающих. Примеры векторов экспрессии млекопитающих включают pCDM8 (Seed (1987) Nature 329: 840) и pMT2PC (Kaufman et al. (1987) EMBO J 6: 187- 195). При использовании в клетках млекопитающих функции управления вектором экспрессии часто предоставляются вирусными регуляторными элементами. Например, широко используемые промоторы получают из полиомы, аденовируса 2, цитомегаловируса и вируса Симиана 40. Для других подходящие системы экспрессии как для прокариотических, так и для эукариотических клеток. См., напр., Chapters 16 and 17 of Sambrook et al., MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL. 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989.

В другом варианте реализации экспрессирующий вектор рекомбинантного млекопитающего способен направлять экспрессию нуклеиновой кислоты предпочтительно в конкретном типе клеток (например, для экспрессии нуклеиновой кислоты используются тканеспецифические регуляторные элементы). Специфические для ткани регуляторные элементы известны в данной области техники. Неограничивающие примеры подходящих тканеспецифических промоторов включают промотор альбумина (специфичный для печени, Pinkert et al. (1987) Genes Dev 1: 268-277), лимфоидспецифические промоторы (Calame and Eaton (1988) Adv Immunol 43: 235-275), в частности промоторы рецепторов Т-клеток (Winoto and Baltimore, 1989) EMBO J 8: 729-733) и иммуноглобулинов (Banerji et al. (1983). Cell 33: 729-740; Queen and Baltimore (1983) Cell 33: 741-748), нейроспецифические промоторы (например, промотор нейрофиламентов, Byrne and Ruddle, 1989) PNAS 86: 5473-5477), специфичные для поджелудочной железы промоторы (Edlund et al. (1985) Science 230: 912-916) и промоторы молочной железы (например, промотор молочной сыворотки, патент США № 4873316 и Европейская заявка на публикацию № 264166). Онтогенетически регулируемые промоторы также охватывают, например, мышинные hox промоторы (Kessel and Gruss (1990) Science 249: 374-379) и промотор альфа-фетопротеина (Campes and Tilghman, 1989) Genes Dev 3: 537-546).

В настоящем описании в настоящем документе дополнительно представлен рекомбинантный экспрессирующий вектор, содержащий молекулу ДНК, раскрытую в настоящем документе, клонированную в вектор экспрессии в антисмысловом направлении. То есть молекула ДНК функционально связана с регуляторной последовательностью таким образом, что позволяет экспрессировать (посредством транскрипции молекулы ДНК) молекулу РНК, антисмысловую к мРНК PDX. Регулирующие последовательности, функционально связанные с нуклеиновой кислотой, клонированные в антисмысловом направлении, могут быть выбраны так, чтобы можно было перенести непрерывную экспрессию молекулы антисмысловой РНК в различные типы клеток, например вирусные промоторы и/или энхансеры, или регулятор-

ные последовательности могут быть выбраны так, чтобы направлять конститутивную, специфичную для тканей или специфичную для типа клеток антисмысловую РНК. Вектор антисмысловой экспрессии может быть представлен в виде рекомбинантной плазмиды, фагмиды или аттенуированного вируса, в котором антисмысловые нуклеиновые кислоты находятся под контролем высокоэффективной регуляторной области, активность которой может определяться типом клеток, в которые вектор встраивают. Для обсуждения регуляции экспрессии генов с использованием антисмысловых генов см. Weintraub et al., "Antisense RNA as a molecular tool for genetic analysis," Reviews - Trends in Genetics, vol. 1(1) 1986.

Другой вариант реализации, раскрытый в настоящем документе, относится к клеткам-хозяевам, в которые был введен рекомбинантный экспрессирующий вектор, раскрытый в настоящем документе. Термины "клетка-хозяин" и "рекомбинантная клетка-хозяин" используются в настоящем документе взаимозаменяемо. Понятно, что такие термины относятся не только к конкретной клетке субъекта, но также к потомству или потенциальному потомству такой клетки. Поскольку определенные изменения могут происходить в последующих поколениях из-за мутаций или воздействий окружающей среды, такое потомство не может, по сути, быть идентичным родительской клетке, но все еще включено в сферу действия термина, используемого в настоящем документе. Кроме того, клетки-хозяева могут быть модулированы после экспрессии PDX-1, Pax-4, MafA, NeuroD1 или Sox-9 или их комбинации и могут либо поддерживать, либо ослаблять исходные характеристики.

Клеткой-хозяином может быть любая прокариотическая или эукариотическая клетка. Например, белки PDX-1, Pax-4, MafA, NeuroD1 или Sox-9 могут быть экспрессированы в бактериальных клетках, таких как E.coli, клетках насекомых, клетках дрожжей или млекопитающих (такие как клетки яичника китайского хомячка (CHO) или клетки COS). Альтернативно, клетка-хозяин может быть незрелой клеткой млекопитающего, то есть плюрипотентной стволовой клеткой. Клетка-хозяин также может быть получена из другой ткани человека. Другие подходящие клетки-хозяева известны специалистам в данной области.

Векторную ДНК можно вводить в прокариотические или эукариотические клетки с помощью обычных методов трансформации, трансдукции, инфицирования или трансфекции. Специалисту в данной области было бы понятно, что термины "трансформация", "трансдукция", "инфекция" и "трансфекция" могут включать множество известных в данной области техники для введения чужеродной нуклеиновой кислоты (например, ДНК) в клетку-хозяина, включая фосфат кальция или копреципитацию хлорида кальция, DEAE-декстран- трансфицированную трансфекцию, липофекцию или электропорацию. Кроме того, трансфекция может быть опосредована трансфекционным агентом. Специалисту в данной области было бы понятно, что термин "трансфекционный агент" может включать любое соединение, которое опосредует включение ДНК в клетку-хозяина, например липосому. Подходящие способы трансформирования или трансфекции клеток-хозяев можно найти в Sambrook et al. (MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL. 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989), и других лабораторных руководствах.

Трансфекция может быть "стабильной" (т.е. интеграция чужеродной ДНК в геном хозяина) или "кратковременной" (т.е. ДНК экспрессируется эпизодически в клетках-хозяевах), или мРНК электропорировается в клетки).

Для стабильной трансфекции клеток млекопитающих известно, что в зависимости от используемого вектора экспрессии и метода трансфекции только небольшая часть клеток может интегрировать чужую ДНК в свой геном, остальная часть ДНК остается эпизодической. Чтобы идентифицировать и выбрать эти интегранты, ген, который кодирует селективируемый маркер (например, устойчивость к антибиотикам), обычно вводят в клетки-хозяева вместе с представляющим интерес геном. Различные селективные маркеры включают те, которые придают устойчивость к лекарствам, таким как G418, гиромидин и метотрексат. Нуклеиновая кислота, кодирующая селективный маркер, может быть введена в клетку-хозяина в том же векторе, что и кодирующий PDX-1, или может быть введена отдельным вектором. Клетки, стабильно трансфицированные со встроенной нуклеиновой кислотой, могут быть идентифицированы путем выбора лекарственного средства (например, клетки, в которых встроен селективируемый маркерный ген, выживут, в то время как другие клетки погибнут). В другом варианте реализации клетки, модулированные PDX-1, или трансфицированные клетки, идентифицируются путем индукции экспрессии эндогенного репортерного гена. В конкретном варианте реализации промотор представляет собой промотор инсулина, стимулирующий экспрессию зеленого флуоресцентного белка (GFP).

В одном варианте реализации нуклеиновая кислота PDX-1, Pax-4, MafA, NeuroD1 или Sox-9 присутствует в вирусном векторе. В одном варианте реализации нуклеиновые кислоты PDX-1 и NeuroD1 присутствуют в одном и том же вирусном векторе. В другом варианте реализации нуклеиновые кислоты PDX-1 и Pax4 присутствуют в одном и том же вирусном векторе. В другом варианте реализации нуклеиновая кислота PDX-1, Pax-4, MafA, NeuroD1 или Sox-9 инкапсулируется в вирус. В другом варианте реализации PDX-1 и NeuroD1 инкапсулированы в вирус (т.е. нуклеиновые кислоты, кодирующие PDX-1 и NeuroD1, инкапсулированы в одну и ту же вирусную частицу). В другом варианте реализации PDX-1 и Pax4 инкапсулированы в вирус (т.е. нуклеиновые кислоты, кодирующие PDX-1 и Pax4, инкапсулированы в одну и ту же вирусную частицу). В некоторых вариантах реализации вирус предпочтительно инфици-

рует плюрипотентные клетки различных типов тканей, например гемопоэтические стволовые клетки, нейронные стволовые клетки, стволовые клетки печени или эмбриональные стволовые клетки, предпочтительно вирус гепатотропный. Специалисту в данной области техники было бы понятно, что термин "гепатотропный" означает, что вирус обладает способностью предпочтительно в качестве мишени выбирать клетки печени либо специфически, либо неспецифически. В других вариантах реализации вирус представляет собой модулированный вирус гепатита, SV-40 или вирус Эпштейна-Бар. В еще одном варианте реализации вирус представляет собой аденовирус.

Генная терапия

В одном варианте реализации нуклеиновая кислота или нуклеиновые кислоты, кодирующие полипептид PDX-1, Pax-4, MafA, NeuroD1 или Sox-9 или их комбинацию, как раскрыто в настоящем документе, или их функциональные производные, вводят способом генной терапии. Генная терапия относится к терапии, которая проводится путем введения конкретной нуклеиновой кислоты субъекту. В одном варианте реализации нуклеиновая кислота продуцирует свой кодируемый пептид(ы), который затем служит для оказания терапевтического эффекта посредством модулирующей функции вышеупомянутого заболевания или патологии например, диабета. Любая из методик, относящихся к генной терапии, доступных в данной области, может быть использована в практике раскрытия, представленного в настоящем документе. См., например, Goldspiel, et al., 1993. Clin Pharm 12: 488-505.

В другом варианте реализации терапевтический препарат включает нуклеиновую кислоту, которая является частью вектора экспрессии, экспрессирующего любой один или более из вышеупомянутых полипептидов PDX-1, Pax-4, MafA, NeuroD1 и/или Sox-9 или фрагментов, их производных или их аналогов, в подходящем хозяине. В одном варианте реализации такая нуклеиновая кислота обладает промотором, который функционально связан с кодирующей областью (областями) полипептида PDX-1, Pax-4, MafA, NeuroD1 и Sox-9. Промотор может быть индуцибельным или конститутивным и, необязательно, тканеспецифическим. Промотором может быть, например, вирус или млекопитающее по происхождению. В другом конкретном варианте реализации используется молекула нуклеиновой кислоты, в которой кодирующие последовательности (и любые другие желательные последовательности) фланкированы областями, которые способствуют гомологичной рекомбинации в желаемом месте в геноме, тем самым обеспечивая внутривнутрихромосомную экспрессию нуклеиновых кислот. См., например, Koller and Smithies, 1989. Proc Natl Acad Sci USA 86: 8932-8935. В еще одном варианте реализации поставляемая нуклеиновая кислота остается эпизомальной и индуцирует эндогенный и, иными словами, молчащий ген.

Доставка терапевтической нуклеиновой кислоты к пациенту может быть либо прямой (то есть, пациент непосредственно подвергается воздействию нуклеиновой кислоты, либо вектора, содержащего нуклеиновую кислоту) или непрямой (т.е. клетки сначала контактируют с нуклеиновой кислотой *in vitro*, затем их пересаживают пациенту). Эти два подхода известны, соответственно, как *in vivo* или *ex vivo* генная терапия. В другом варианте реализации нуклеиновая кислота непосредственно вводится *in vivo*, где она экспрессируется для получения кодированного продукта. Это может быть достигнуто любым из многочисленных способов, известных в данной области, включая, но не ограничиваясь этим, конструирование указанной нуклеиновой кислоты как часть подходящего вектора экспрессии нуклеиновой кислоты и введение ее таким образом, чтобы она становилась внутриклеточной (например, путем инфицирования с использованием дефектного или аттенуированного ретровирусного или другого вирусного вектора; см. патент США № 4980286); прямое введение открытой ДНК; используя бомбардировку микрочастицами (например, "Джин-пушка". RTM; Biolistic, DuPont); покрытие указанных нуклеиновых кислот липидами; с использованием соответствующих рецепторов клеточной поверхности/трансфекционных агентов; инкапсулирование в липосомах, микрочастицах или микрокапсулах; введение его в соединение с пептидом, который, как известно, входит в ядро; или путем введения его связанным с лигандом, предрасположенным к рецептор-опосредованному эндоцитозу (см., например, Wu and Wu, 1987. J Biol Chem 262: 4429-4432), которые могут быть использованы для "целевых" типов клеток, которые специфически экспрессируют представляющие интерес рецепторы и т.д.

Дополнительный подход к генной терапии включает перенос гена или мРНК в клетки в культуре тканей *in vitro* такими способами, как электропорация, липофекция, трансфекция, связанная с фосфатом кальция, вирусная инфекция и тому подобное. Как правило, методология передачи включает сопутствующую передачу селективного маркера в клетки. Затем клетки помещают под давление отбора (например, резистентность к антибиотикам), чтобы облегчить выделение тех клеток, которые захватили и экспрессируют перенесенный ген. Затем эти клетки доставляются пациенту. В другом варианте реализации изобретения до *in vivo* введения в результирующую рекомбинантную клетку, нуклеиновую кислоту вводят в клетку любым способом, известным в данной области, включая, но не ограничиваясь: трансфекцию, электропорацию, микроинъекцию, инфицирование вирусом или вектором на основе бактериофага, содержащий интересующие последовательности нуклеиновой кислоты, слияние клеток, перенос генов, опосредуемый хромосомой, перенос гена, связанный с микроэлементами, слияние сферопластов и аналогичные методики, которые гарантируют, что передача и необходимые функциональные и физиологические функции клеток-реципиентов не нарушаются. См., например, Loeffler and Behr, 1993. Meth Enzymol 217: 599-618. Выбранная методика должна обеспечивать стабильную передачу нуклеиновой кислоты в

клетку, так что нуклеиновая кислота экспрессируется клеткой. В еще одном варианте реализации указанная переносимая нуклеиновая кислота наследуется и экспрессируется клеточным потомством. В альтернативном варианте реализации переносимая нуклеиновая кислота остается эпизомальной и индуцирует экспрессию, иными словами, молчащей эндогенной нуклеиновой кислоты.

В одном варианте реализации результирующие рекомбинантные клетки могут быть доставлены пациенту различными способами, известными в данной области, включая, но не ограничиваясь ими, инъекцию эпителиальных клеток (например, подкожно), применение рекомбинантных клеток кожи в качестве кожного трансплантата пациенту и внутривенную инъекцию рекомбинантных клеток крови (например, гемопоэтических стволовых клеток или клеток-предшественников) или клеток печени. Общее количество клеток, которые предназначены для использования, зависит от желаемого эффекта, состояния пациента и тому подобного, и может быть определено специалистом в данной области. В одном варианте реализации по меньшей мере 10^6 трансдифференцированных клеток необходимы для использования в способе лечения, как описано в настоящем документе. В другом варианте реализации по меньшей мере 10^7 трансдифференцированных клеток, по меньшей мере 10^8 трансдифференцированных клеток, по меньшей мере 10^9 трансдифференцированных клеток или по меньшей мере 10^{10} трансдифференцированных клеток необходимы для использования в способе лечения, как описано в настоящем документе. В еще одном варианте реализации, для использования в способе лечения, описанном в настоящем документе, необходимы около $1,8 \times 10^9$ трансдифференцированных клеток.

Клетки, в которые нуклеиновая кислота может вводиться для целей генной терапии, включают любой желаемый, доступный тип клеток и могут быть ксеногенными, гетерогенными, сингенными или аутогенными. Клеточные типы включают, но не ограничиваются ими, дифференцированные клетки, такие как эпителиальные клетки, эндотелиальные клетки, кератиноциты, фибробласты, мышечные клетки, гепатоциты и клетки крови, или различные стволовые клетки или клетки предшественники, в частности эмбриональные клетки сердечной мышцы, стволовые клетки печени (Международная патентная публикация WO 94/08598), нейронные стволовые клетки (Stemple and Anderson, 1992, Cell 71: 973-985), гемопоэтические стволовые клетки или клетки-предшественники, например, полученные из костного мозга, пуповинной крови, периферической крови, печени плода и тому подобного. В предпочтительном варианте реализации клетки, используемые для генной терапии, являются аутологичными для пациента.

ДНК для генной терапии можно вводить пациентам парентерально, например внутривенно, подкожно, внутримышечно и внутрибрюшинно. ДНК или индуцирующий агент вводят в фармацевтически приемлемом носителе, то есть биологически совместимом носителе, который подходит для введения животному, например физиологическом растворе. Терапевтически эффективное количество представляет собой количество, которое способно давать желаемый с медицинской точки зрения результат, например, увеличение экспрессии гена поджелудочной железы у пролеченного животного. Такое количество может быть определено специалистом в данной области техники. Как известно в медицине, дозировка для любого данного пациента зависит от многих факторов, включая размер пациента, площадь поверхности тела, возраст, конкретное соединение, которое должно быть введено, пол, время и путь введения, общее состояние здоровья и другие лекарства, которые вводятся одновременно. Дозировки могут варьировать, но предпочтительная доза для внутривенного введения ДНК составляет около от 10^6 до 10^2 копий молекулы ДНК. Например, ДНК вводят около 2×10^{12} вирионами на кг.

Способы получения клеток, продуцирующих человеческий инсулин (IP)

Получение клеток, продуцирующих человеческий инсулин, может преодолеть нехватку ткани, доступной для терапии на основе клеток, например, для лечения субъекта, страдающего сахарным диабетом I типа. Способы получения клеток, продуцирующих человеческий инсулин в достаточном количестве, в одном варианте реализации обеспечивают продукт на основе клеток для использования в этих и других методах лечения, как описано в настоящем документе (фиг. 32).

Теперь делается ссылка на фиг. 34, где представлена блок-схема последовательности операций процесса получения продукта клеток, продуцирующих человеческий инсулин, которые могут быть в одном варианте реализации аутологичным или аллогенным клетками, продуцирующими инсулин (AIP). Фиг. 34 описывает один вариант реализации процесса получения человеческих клеток, продуцирующих человеческий инсулин, где исходный материал содержит ткань печени. Специалист в данной области должен признать, что в этом процессе производства можно использовать любой источник непанкреатической β -клеточной ткани.

Варианты реализации многих этапов, представленных на фиг. 34, подробно описаны во всей этой заявке и не будут повторяться в настоящем документе, хотя они должны рассматриваться в настоящем документе. Также упоминаются примеры 20 и 21, которые являются примерами многих из этих этапов. Вкратце, процесс получения может быть понят на основе приведенных ниже этапов.

Как указано на этапе 1: Получение ткани печени.

В одном варианте реализации ткань печени представляет собой ткань печени человека. В другом варианте реализации ткань печени получена как часть биопсии. В другом варианте реализации ткань печени получают посредством любой хирургической процедуры, известной в данной области. В другом

варианте реализации получение ткани печени проводят квалифицированным врачом. В другом варианте реализации полученная ткань печени представляет собой ткань печени здорового человека. В соответствующем варианте реализации здоровый индивидиум является аллогенным донором для пациента, нуждающегося в клеточной терапии, которая обеспечивает обработанный инсулин регулируемым глюкозой способом, например, пациента с сахарным диабетом I типа или пациента, страдающим панкреатитом. В другом варианте реализации проводили скрининг доноров и тестирование доноров, чтобы гарантировать, что ткань, полученная от доноров, не демонстрирует никаких клинических или физических доказательств или факторов риска инфекционных или злокачественных заболеваний от получения клеток АИР. В еще одном варианте реализации ткань печени получают от пациента, нуждающегося в клеточной терапии, которая обеспечивает обработанный инсулин регулируемым глюкозой способом, например, пациента с сахарным диабетом I типа или пациента, страдающего панкреатитом. В еще одном варианте реализации ткань печени является аутологичной для пациента, нуждающегося в клеточной терапии, которая обеспечивает обработанный инсулин регулируемым глюкозой способом, например, пациента с сахарным диабетом I типа или пациента, страдающего панкреатитом.

Как обозначено на этапе 2: Извлечение и обработка первичных клеток печени.

Ткани печени обрабатывают с использованием хорошо известных методов в данной области для извлечения адгезивных клеток, которые будут использоваться для дальнейшей обработки. В одном варианте реализации ткань печени разрезают на мелкие кусочки около 1-2 мм и осторожно пипетируют вверх и вниз в стерильном буферном растворе. Затем образец можно инкубировать с коллагеназой для переваривания ткани. После серии этапов отмывки, в другом варианте реализации первичные клетки печени могут быть посажены на предварительно обработанные фибронектинным тканевые чашки. Специалист должен хорошо знать, как затем перерабатывать (пассаж) клетки по известным методам размножения клеток печени. Вкратце, клетки можно выращивать в среде для размножения и через серию посева и сбора количество клеток увеличивается. Клетки могут быть разделены при достижении конfluence на 80% и повторно посажены. Фиг. 33 (0-2 недели) иллюстрирует схему одного варианта реализации этого этапа получения и процесса, представляющего 2 пассажа первичных клеток печени.

Специалист в данной области оценил бы потребность в достаточном количестве клеток, например, в течение 2-недельного периода времени, до начала фазы размножения протокола (этап 3). Специалист в данной области должен признать, что 2-недельный период времени является одним из примеров начальной точки для размножения клеток, причем клетки могут быть готовы к размножению до или после этого периода времени. В одном варианте реализации извлечение и обработка первичных клеток дает по меньшей мере 1×10^5 клеток после двух пассажей клеток. В другом варианте реализации извлечение и обработка первичных клеток дает по меньшей мере 1×10^6 клеток после двух пассажей клеток. В другом варианте реализации извлечение и обработка первичных клеток дает по меньшей мере 2×10^6 клеток после двух пассажей клеток. В другом варианте реализации извлечение и обработка первичных клеток дает по меньшей мере 5×10^6 клеток после двух пассажей клеток. В другом варианте реализации извлечение и обработка первичных клеток дает по меньшей мере 1×10^7 клеток после двух пассажей клеток. В другом варианте реализации извлечение и обработка первичных клеток дает между 1×10^5 - 1×10^6 клеток после двух пассажей клеток. В другом варианте реализации извлечение и обработка первичных клеток дает между 1×10^6 - 1×10^7 клеток после двух пассажей клеток. В другом варианте реализации достаточно начальной ткани используется для обеспечения извлечения и обработки первичных клеток, дает достаточное количество клеток после двух пассажей для адекватной плотности посева на этапе 3, крупномасштабном размножении клеток.

В одном варианте реализации первичные клетки 1^{го} пассажа являются криоконсервированными для последующего использования. В другом варианте реализации первичные клетки раннего пассажа являются криоконсервированными для последующего использования. В еще одном варианте реализации первичные клетки 2^{го} пассажа являются криоконсервированными для последующего использования.

Как указано на этапе 3: Размножение/пролиферация первичных клеток печени

Этап 3 представляет собой крупномасштабную фазу размножения процесса получения. Квалифицированный специалист оценил бы потребность в достаточном количестве клеток в течение 5 недельного периода, до начала фазы трансдифференцировки протокола (этап 4), где можно предусмотреть определенное количество клеток для лечения пациента. В одном варианте реализации определенное количество клеток, необходимое до трансдифференцировки, составляет около 1×10^8 первичных клеток. В другом варианте реализации определенное количество клеток, необходимое до трансдифференцировки, составляет около 2×10^8 первичных клеток. В одном варианте реализации определенное количество клеток, необходимое до трансдифференцировки, составляет около 3×10^8 первичных клеток, 4×10^8 первичных клеток, 5×10^8 первичных клеток, 6×10^8 первичных клеток, 7×10^8 первичных клеток, 8×10^8 первичных клеток, 9×10^8 первичных клеток, 1×10^9 первичных клеток, 2×10^9 первичных клеток, 3×10^9 первичных клеток, 4×10^9 первичных клеток, 5×10^9 первичных клеток, 6×10^9 первичных клеток, 7×10^9 первичных клеток, 8×10^9 первичных клеток, 9×10^9 первичных клеток или 1×10^9 первичных клеток.

В одном варианте реализации плотность посева клеток во время размножения составляет 1×10^3 -

10×10^3 клеток/см². В другом варианте реализации плотность посева клеток во время размножения составляет 1×10^3 - 8×10^3 клеток/см². В другом варианте реализации плотность посева клеток во время размножения составляет 1×10^3 - 5×10^3 клеток/см². В другом варианте реализации плотность посева клеток во время размножения составляет 1×10^3 клеток/см². В другом варианте реализации плотность посева клеток во время размножения составляет 2×10^3 клеток/см². В другом варианте реализации плотность посева клеток во время размножения составляет 3×10^3 клеток/см². В другом варианте реализации плотность посева клеток во время размножения составляет 4×10^3 клеток/см². В другом варианте реализации плотность посева клеток во время размножения составляет 5×10^3 клеток/см². В другом варианте реализации плотность посева клеток во время размножения составляет 6×10^3 клеток/см². В другом варианте реализации плотность посева клеток во время размножения составляет 7×10^3 клеток/см². В другом варианте реализации плотность посева клеток во время размножения составляет 8×10^3 клеток/см². В другом варианте реализации плотность посева клеток во время размножения составляет 9×10^3 клеток/см². В другом варианте реализации плотность посева клеток во время размножения составляет 10×10^3 клеток/см².

В другом варианте реализации диапазон жизнеспособности клеток для посева во время размножения составляет 60-100%. В другом варианте реализации диапазон жизнеспособности клеток для посева во время размножения включает жизнеспособность около 70-99%. В другом варианте реализации жизнеспособность клеток для посева во время размножения включает жизнеспособность около 60%. В другом варианте реализации жизнеспособность клеток для посева во время размножения включает жизнеспособность около 65%. В другом варианте реализации жизнеспособность клеток для посева во время размножения включает жизнеспособность около 70%. В другом варианте реализации жизнеспособность клеток для посева во время размножения включает жизнеспособность около 75%. В другом варианте реализации жизнеспособность клеток для посева во время размножения включает жизнеспособность около 80%. В другом варианте реализации жизнеспособность клеток для посева во время размножения включает жизнеспособность около 85%. В другом варианте реализации жизнеспособность клеток для посева во время размножения включает жизнеспособность около 90%. В другом варианте реализации жизнеспособность клеток для посева во время размножения включает жизнеспособность около 95%. В другом варианте реализации жизнеспособность клеток для посева во время размножения включает жизнеспособность около 99%. В другом варианте реализации жизнеспособность клеток для посева во время размножения включает жизнеспособность около 99,9%.

На фиг. 33 схематично проиллюстрирован один вариант реализации этого периода размножения. В одном варианте реализации размножение происходит между неделями 2 и 5. Специалист в данной области распознает изменчивость в исходном тканевом материале (фиг. 29). Следовательно, в другом варианте реализации размножение происходит между неделями 2 и 6. В еще одном варианте реализации размножение происходит между неделями 2 и 7. В другом варианте реализации размножение происходит между неделями 2 и 4. В еще одном варианте реализации размножение происходит до тех пор, пока не будет размножено необходимое количество первичных клеток. Например, на фиг. 28 проиллюстрировано, что цель 1 млрд клеток была достигнута к 30-му дню культуры.

Специалисту в данной области было бы понятно, что одновременно с размножением клеток популяция может быть обогащена для трансдифференцировки. Описание первичных клеток печени взрослых, обогащенных для трансдифференцировки, и способы для обогащения этих популяций описаны в настоящем документе и приведены в примерах 10-17 и 23. В одном варианте реализации выбор для активности GSRE используется для обогащения популяции взрослых клеток для трансдифференцировки. В другом варианте реализации уровни экспрессии генов измеряются для генов, которые, как известно, имеют увеличенную или уменьшенную экспрессию, причем такие увеличения или уменьшения указывают на предрасположенность к трансдифференцировке. В другом варианте реализации первичные взрослые клетки печени могут быть инкубированы с литием перед трансдифференцировкой, где инкубация усиливает предрасположенность к популяции клеток в указанной популяции первичных клеток печени взрослого человека.

В одном варианте реализации биореакторы используются для размножения и распространения первичных клеток до этапа трансдифференцировки. Для культивирования клетки могут использоваться биореакторы, в которых условия пригодны для высоких концентраций клеток (см. пример 20). В другом варианте реализации биореактор обеспечивает закрытую систему для размножения клеток. В другом варианте реализации множественные биореакторы используются в серии для размножения клетки. В другом варианте реализации биореактор, используемый в описанных в настоящем документе способах, является биореактором однократного использования. В другом варианте реализации используемый биореактор представляет собой многократный биореактор. В еще одном варианте реализации биореактор содержит блок управления для контроля и управления параметрами процесса. В другом варианте реализации параметры для мониторинга и контроля включают растворение кислорода (DO), pH, газы и температура.

Как указано на этапе 4: Трансдифференцировка (TD) первичных клеток печени.

В одном варианте реализации трансдифференцировка включает любой способ трансдифференцировки, раскрытый в настоящем документе. Например, трансдифференцировка может содержать протокол

плотность трансдифференцированных клеток, выделенных при сборе, составляет около 1×10^4 – 4×10^4 клеток/см². В другом варианте реализации плотность трансдифференцированных клеток, выделенных при сборе, составляет около 1×10^3 клеток/см². В другом варианте реализации плотность трансдифференцированных клеток, выделенных при сборе, составляет около 2×10^3 клеток/см². В другом варианте реализации плотность трансдифференцированных клеток, выделенных при сборе, составляет около 3×10^3 клеток/см². В другом варианте реализации плотность трансдифференцированных клеток, выделенных при сборе, составляет около 4×10^3 клеток/см². В другом варианте реализации плотность трансдифференцированных клеток, выделенных при сборе, составляет около 5×10^3 клеток/см². В другом варианте реализации плотность трансдифференцированных клеток, выделенных при сборе, составляет около 6×10^3 клеток/см². В другом варианте реализации плотность трансдифференцированных клеток, выделенных при сборе, составляет около 7×10^3 клеток/см². В другом варианте реализации плотность трансдифференцированных клеток, выделенных при сборе, составляет около 8×10^3 клеток/см². В другом варианте реализации плотность трансдифференцированных клеток, выделенных при сборе, составляет около 9×10^3 клеток/см². В другом варианте реализации плотность трансдифференцированных клеток, выделенных при сборе, составляет около 1×10^4 клеток/см². В другом варианте реализации плотность трансдифференцированных клеток, выделенных при сборе, составляет около 2×10^4 клеток/см². В другом варианте реализации плотность трансдифференцированных клеток, выделенных при сборе, составляет около 3×10^4 клеток/см². В другом варианте реализации плотность трансдифференцированных клеток, выделенных при сборе, составляет около 4×10^4 клеток/см². В другом варианте реализации плотность трансдифференцированных клеток, выделенных при сборе, составляет около 5×10^4 клеток/см². В другом варианте реализации плотность трансдифференцированных клеток, выделенных при сборе, составляет около 6×10^4 клеток/см². В другом варианте реализации плотность трансдифференцированных клеток, выделенных при сборе, составляет около 7×10^4 клеток/см². В другом варианте реализации плотность трансдифференцированных клеток, выделенных при сборе, составляет около 8×10^4 клеток/см². В другом варианте реализации плотность трансдифференцированных клеток, выделенных при сборе, составляет около 9×10^4 клеток/см².

В другом варианте реализации диапазон жизнеспособности клеток во время сбора составляет 50-100%. В другом варианте реализации диапазон жизнеспособности клеток во время сбора составляет 60-100%. В другом варианте реализации диапазон жизнеспособности клеток во время сбора составляет 50-90%. В другом варианте реализации диапазон жизнеспособности клеток во время сбора составляет жизнеспособность около 60-99%. В другом варианте реализации диапазон жизнеспособности клеток во время сбора составляет жизнеспособность около 60-90%. В другом варианте реализации жизнеспособность клеток во время сбора составляет жизнеспособность около 60%. В другом варианте реализации жизнеспособность клеток во время сбора составляет жизнеспособность около 65%. В другом варианте реализации жизнеспособность клеток во время сбора составляет жизнеспособность около 70%. В другом варианте реализации жизнеспособность клеток во время сбора составляет жизнеспособность около 75%. В другом варианте реализации жизнеспособность клеток во время сбора составляет жизнеспособность около 80%. В другом варианте реализации жизнеспособность клеток во время сбора составляет жизнеспособность около 85%. В другом варианте реализации жизнеспособность клеток во время сбора составляет жизнеспособность около 90%. В другом варианте реализации жизнеспособность клеток во время сбора составляет жизнеспособность около 95%. В другом варианте реализации жизнеспособность клеток во время сбора составляет жизнеспособность около 99%. В другом варианте реализации жизнеспособность клеток во время сбора составляет жизнеспособность около 99,9%.

В другом варианте реализации трансдифференцированные первичные клетки печени, содержащие человеческие клетки, продуцирующие инсулин, собирают и хранят для использования в клеточной терапии позднее. В другом варианте реализации хранение включает криоконсервирование клеток.

Как указано на этапе 6: Анализ качества/контроль качества

Перед любым использованием трансдифференцированных клеток в клеточной терапии трансдифференцированные клетки должны пройти анализ качества/контроль качества. Анализ FACS и/или ОТ-ПЦР можно использовать для точного определения мембранных маркеров и экспрессии генов. Кроме того, аналитические методики секретиции инсулина хорошо известны в данной области, включая ELISA, MSD, ELISpot, HPLC, RP-HPLC. В одном варианте реализации тестирование секретиции инсулина находится при низких концентрациях глюкозы (около 2 mM) по сравнению с высокими концентрациями глюкозы (около 17,5 mM).

Терапевтические композиции

Описанные в настоящем документе соединения, индуцирующие трансдифференцировку, или эктопические факторы транскрипции поджелудочной железы (т.е. полипептиды PDX-1, Pax-4, MafA, NeuroD1 или Sox-9, рибонуклеиновые кислоты или нуклеиновые кислоты, кодирующие PDX-1, Pax-4, Полипептиды MafA, NeuroD1 или Sox-9), и клетки, имеющие фенотип бета-клеток поджелудочной железы, продуцируемые описанными в настоящем документе способами, когда они используются терапевтически,

называются в настоящем документе "терапевтическим средством". Способы введения терапевтических средств включают, но не ограничиваются ими, внутрикожные, внутримышечные, внутрибрюшинные, внутривенные, подкожные, интраназальные, эпидуральные и оральные. Терапевтические средства представленного в настоящем документе раскрытия можно вводить любым удобным способом, например, путем инфузии или болюсной инъекции путем абсорбции через эпителиальные или слизистые оболочки (например, слизистой оболочки полости рта, слизистой оболочки прямой кишки и кишечника и т.д.) и можно вводить вместе с другими биологически активными веществами. Введение может быть системным или местным, например, путем доставки через воротную вену в печень. Кроме того, может быть выгодным введение терапевтического средства в центральную нервную систему любым подходящим путем, включая внутривентрикулярные и интратекальные инъекции. Внутривентрикулярную инъекцию можно облегчить внутривентрикулярным катетером, прикрепленным к резервуару (например, резервуар Омтау). Легочное введение также может быть осуществлено с использованием ингалятора или распылителя и композиции с аэрозольным агентом. Также может быть желательно вводить терапевтический препарат локально в область, нуждающуюся в лечении; это может быть достигнуто, например, и без ограничения, локальной инфузией во время операции, местным применением путем инъекции с помощью катетера, с помощью суппозитория или с помощью имплантата. Известны различные системы доставки и могут быть использованы для введения терапевтического вещества, представленного в настоящем документе, включая, например: (I) инкапсулирование в липосомах, микрочастицах, микрокапсулах; (II) рекомбинантные клетки, способные экспрессировать терапевтическое вещество; (III) рецептор-опосредованный эндоцитоз (см., например, Wu and Wu, 1987. *J Biol Chem* 262: 4429-4432); (IV) конструкцию терапевтической нуклеиновой кислоты как части ретровирусного, аденовирусного или другого вектора и тому подобное. В одном варианте реализации изобретения, представленного в настоящем документе, терапевтический препарат может быть доставлен в везикуле, в частности липосоме. В липосоме белок настоящего раскрытия, представленного в настоящем документе, комбинирован, в дополнение к другим фармацевтически приемлемым носителям с амфипатическими агентами, такими как липиды, которые существуют в агрегированной форме в виде мицелл, нерастворимых монослоев, жидких кристаллов или слоистых слоев в водном растворе. Подходящие липиды для липосомальной композиции включают, без ограничения, моноглицериды, диглицериды, сульфатиды, лизолецитин, фосфолипиды, сапонин, желчные кислоты и тому подобное. Приготовление таких липосомальных составов в пределах компетенции специалиста в данной области, как описано, например, в патенте США № 4837028; и патенте США № 4737323, все из которых включены в настоящий документ посредством ссылки. В еще одном варианте реализации терапевтический препарат может поставляться в системе с контролируемым высвобождением, включая, например, насос подачи (см., например, Saudek, et al., 1989). *New Engl J Med* 321: 574 и полупроницаемый полимерный материал (см., например, Howard, et al., 1989. *J Neurosurg* 71:105). Кроме того, система с контролируемым высвобождением может быть размещена вблизи терапевтической мишени (например, головного мозга), что требует лишь доли системной дозы. См., напр., Goodson, In: *Medical Applications of Controlled Release* 1984. (CRC Press, Boca Raton, Fla.).

В одном варианте реализации раскрытия, представленного в настоящем документе, где терапевтическое средство представляет собой нуклеиновую кислоту, кодирующую белок, терапевтическую нуклеиновую кислоту можно вводить *in vivo*, чтобы стимулировать экспрессию ее кодируемого белка, путем конструирования ее как часть соответствующей нуклеиновой кислоты экспрессирующего вектора и введения его таким образом, чтобы он становился внутриклеточным (например, с использованием ретровирусного вектора, путем прямой инъекции, с помощью бомбардировки микрочастицами, путем покрытия липидами или рецепторами клеточной поверхности или трансфекционных агентов или путем введения его связанным с гомеобокс-подобным пептидом, который, как известно, входит в ядро (см., например, Joliot et al., 1991. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:1864-1868), и тому подобное. Альтернативно, терапевтическое средство нуклеиновая кислота может быть введенной внутриклеточно и встраиваться в ДНК клетки-хозяина для экспрессии, путем гомологичной рекомбинации или оставаться эписомальной.

В одном варианте реализации терапевтическое средство представляет собой клетку, имеющую фенотип бета-клеток поджелудочной железы, полученное описанными в настоящем документе способами, и терапевтическое средство вводят внутривенно. В частности, терапевтическое средство можно доставлять через инфузию в воротную вену.

Специалисту в данной области техники было бы понятно, что термин "терапевтически эффективное количество" может охватывать общее количество каждого активного компонента фармацевтической композиции или способа, которое является достаточным для того, чтобы проявить значимую пользу для пациента, то есть лечение, излечение, профилактику или улучшение соответствующего медицинского состояния или увеличение скорости лечения, излечения, профилактики или улучшения таких состояний. При применении к отдельному активному ингредиенту, вводимому отдельно, этот термин относится только к одному ингредиенту. При применении к комбинации термин относится к объединенным количествам активных ингредиентов, которые приводят к терапевтическому эффекту, независимо от того, вводились ли они в комбинации, последовательно или одновременно.

Подходящие диапазоны доз для внутривенного введения терапевтического средства представленного

в настоящем документе раскрытия обычно составляют по меньшей мере 1 млн трансдифференцированных клеток, по меньшей мере 2 млн трансдифференцированных клеток, по меньшей мере 5 млн трансдифференцированных клеток, по меньшей мере 10 млн трансдифференцированных клеток, по меньшей мере 25 млн трансдифференцированных клеток, по меньшей мере 50 млн трансдифференцированных клеток, по меньшей мере 100 млн трансдифференцированных клеток, по меньшей мере 200 млн трансдифференцированных клеток, по меньшей мере 300 млн трансдифференцированных клеток, по меньшей мере 400 млн трансдифференцированных клеток, по меньшей мере 500 млн трансдифференцированных клеток, по меньшей мере 600 млн трансдифференцированных клеток, по меньшей мере 700 млн трансдифференцированных клеток, по меньшей мере 800 млн трансдифференцированных клеток, по меньшей мере 900 млн трансдифференцированных клеток, по меньшей мере 1 млрд трансдифференцированных клеток, по меньшей мере 2 млрд трансдифференцированных клеток, по меньшей мере 3 млрд трансдифференцированных клеток, по меньшей мере 4 млрд трансдифференцированных клеток или по меньшей мере 5 млрд трансдифференцированных клеток. В одном варианте реализации доза составляет 1-2 млрд трансдифференцированных клеток на 60-75 кг субъекта. Специалисту в данной области было бы понятно, что эффективные дозы могут быть экстраполированы из кривых зависимости доз, полученных из тест-систем *in vitro* или животных. В другом варианте реализации эффективная доза может вводиться внутривенно в воротную вену печени.

Клетки также могут быть культивированы *ex vivo* в присутствии терапевтических агентов, нуклеиновых кислот или активности в таких клетках. Обработанные клетки затем могут быть введены *in vivo* через пути введения, описанные в настоящем документе для терапевтических целей.

Фармацевтические композиции

Соединения, например, полипептиды PDX-1, Pax-4, MafA, NeuroD1 или Sox-9, нуклеиновые кислоты, кодирующие PDX-1, Pax-4, MafA, NeuroD1 или Sox-9 полипептиды, или нуклеиновые кислоты или соединения, которое увеличивает экспрессию нуклеиновой кислоты, которая кодирует полипептиды PDX-1, Pax-4, MafA, NeuroD1 или Sox-9 (также называемые в настоящем документе "активными соединениями") и производные, фрагменты, аналоги и их гомологи и бета-клетки поджелудочной железы, полученные описанными в настоящем документе способами, могут быть включены в фармацевтические композиции, подходящие для введения. Такие композиции обычно включают молекулу нуклеиновой кислоты или белок и фармацевтически приемлемый носитель. Используемый в настоящем документе термин "фармацевтически приемлемый носитель" предназначен для включения любых и всех растворителей, дисперсионных сред, покрытий, антибактериальных и противогрибковых агентов, изотонических агентов и агентов, замедляющих абсорбцию, и т.п., совместимых с фармацевтическим введением. Подходящие носители описаны в последнем издании Remington's Pharmaceutical Sciences, стандартного справочного текста в этой области, который включен в настоящий документ посредством ссылки. Предпочтительные примеры таких носителей или разбавителей включают, но не ограничиваются ими, воду, физиологический раствор, растворы пальцев, раствор декстрозы и 5% человеческий сывороточный альбумин. Также могут использоваться липосомы и неводные носители, такие как фиксированные масла. Использование таких сред и агентов для фармацевтически активных веществ хорошо известно в данной области. За исключением того, что любые обычные среды или агент несовместимы с активным соединением, предполагается их использование в композициях. В композиции также могут быть включены дополнительные активные соединения.

Фармацевтическая композиция, раскрытая в настоящем документе, формулируется так, чтобы быть совместимой с ее предполагаемым способом введения. Примеры путей введения включают парентеральное, например, внутривенное, внутрикожное, подкожное, пероральное (например, ингаляционное), трансдермальное (местное), трансмукозальное и ректальное введение. Растворы или суспензии, используемые для парентерального, внутрикожного или подкожного применения, могут включать следующие компоненты: стерильный разбавитель, такой как вода для инъекций, физиологический раствор, фиксированные масла, полиэтиленгликоли, глицерин, пропиленгликоль или другие синтетические растворители; антибактериальные агенты, такие как бензиловый спирт или метилпарабен; антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота или бисульфит натрия; хелатирующие агенты, такие как этилендиаминтетрауксусная кислота; буферы, такие как ацетаты, цитраты или фосфаты, и агенты для регулировки тонуса, такие как хлорид натрия или декстроза. pH можно регулировать с помощью кислот или оснований, таких как гидрохлоридная кислота или гидроксид натрия. Парентеральный препарат может быть заключен в ампулы, одноразовые шприцы или многоразовые флаконы из стекла или пластика.

Фармацевтические композиции, пригодные для инъекционного применения, включают стерильные водные растворы (в которых растворимы в воде) или дисперсии и стерильные порошки для немедленно приготовления стерильных растворов для инъекций или дисперсии. Для внутривенного введения подходящие носители включают физиологический раствор, бактериостатическую воду, Cremophor EL (BASF, Parsippany, NJ) или забуференный фосфатом физиологический раствор (PBS). Во всех случаях композиция должна быть стерильной и должна быть жидкой до такой степени, чтобы легко проходить через иглу. Она должна быть стабильной в условиях производства и хранения и должна быть сохранена от загрязняющего действия микроорганизмов, таких как бактерии и грибы. Носитель может быть раство-

рителем или дисперсионной средой, содержащей, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль и тому подобное) и подходящие их смеси. Соответствующую текучесть можно поддерживать, например, путем использования покрытия, такого как лецитин, путем поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсии и с использованием поверхностно-активных веществ. Предотвращение действия микроорганизмов может быть достигнуто различными антибактериальными и противогрибковыми агентами, например парабенами, хлорбутанолом, фенолом, аскорбиновой кислотой, тиомерсалом и тому подобным. Во многих случаях предпочтительно включать изотонические агенты, например сахара, полиспирты, такие как манитол, сорбит или хлорид натрия в композиции. Длительное поглощение инъекционных композиций может быть обеспечено путем включения в состав агента, который задерживает абсорбцию, например моностеарат алюминия и желатин.

Стерильные растворы для инъекций могут быть получены путем включения активного соединения в требуемом количестве в подходящем растворителе с использованием одной или комбинации ингредиентов, перечисленных выше, с последующей стерилизацией отфильтровыванием. В целом, дисперсии получают путем включения активного соединения в стерильный носитель, который содержит основную дисперсионную среду и требуемые другие ингредиенты из перечисленных выше. В случае стерильных порошков для приготовления стерильных растворов для инъекций способы получения представляют собой вакуумную сушку и сублимационную сушку, которая дает порошок активного ингредиента плюс любой дополнительный желаемый ингредиент из ранее стерильно-фильтрованного раствора.

Оральные композиции обычно включают инертный разбавитель или съедобный носитель. Они могут быть заключены в желатиновые капсулы или спрессованы в таблетки. Для целей перорального терапевтического введения активное соединение можно вводить с эксципиентами и использовать в форме таблеток, пастилок или капсул. Пероральные композиции также могут быть получены с использованием флюидного носителя для использования в качестве полоскания для полоскания рта, при этом соединение в носителе жидкости применяют перорально и смачивают, откашливают или проглатывают. Фармацевтически совместимые связывающие агенты и/или адъювантные материалы могут быть включены в состав композиции. Таблетки, пилюли, капсулы, пастилки и тому подобное могут содержать любой из следующих ингредиентов или соединений аналогичного характера: связующее, такое как микрокристаллическая целлюлоза, трагакантовая камедь или желатин; эксципиент, такой как крахмал или лактоза, дезинтегрирующий агент, такой как альгиновая кислота, Primogel или кукурузный крахмал; смазывающее вещество, такое как стеарат магния или стероиды; глидант, такой как коллоидный диоксид кремния; подслащающий агент, такой как сахароза или сахарин; или ароматизатор, такой как перечная мята, метилсалицилат или апельсиновый ароматизатор.

Системное введение также может осуществляться с помощью трансмукозального или трансдермального средства. Для трансмукозального или чрескожного введения в состав используют пенетранты, соответствующие барьеру, который должен быть пройден. Такие пенетранты обычно известны в данной области и включают, например, для введения через слизистую оболочку, детергенты, желчные соли и производные фузидовой кислоты. Трансмукозальное введение может быть осуществлено с использованием назальных спреев или суппозитория. Для чрескожного введения активные соединения добавляют в масла, мази, гели или кремы, как общеизвестно в данной области.

В одном варианте реализации активные соединения получают с носителями, которые защищают соединение от быстрого удаления из организма, такого как препарат с контролируемым высвобождением, включая имплантаты и микрокапсулированные системы доставки. Могут использоваться биodeградируемые, биосовместимые полимеры, такие как этиленвинилацетат, полиангидриды, полигликолевая кислота, коллаген, полиортоэфиры и полимолочная кислота. Специалистам в данной области техники будут очевидны способы получения таких составов. Материалы также могут быть получены коммерчески от Alza Corporation и Nova Pharmaceuticals, Inc. Липосомные суспензии (включая липосомы, нацеленные на инфицированные клетки с моноклональными антителами к вирусным антигенам) также могут быть использованы в качестве фармацевтически приемлемых носителей. Они могут быть получены в соответствии со способами, известными специалистам в данной области, например, как описано в патенте США № 4522811, полностью включенной в настоящий документ в качестве ссылки.

Особенно выгодно формулировать пероральные или парентеральные композиции в единичной дозированной форме для удобства введения и единообразия дозировки. Форма единицы дозирования, как используется в настоящем документе, относится к физически дискретным единицам, подходящим в качестве единичных доз для субъекта, подлежащего лечению; причем каждая единица содержит предопределенное количество активного соединения, рассчитанное для получения желаемого терапевтического эффекта в сочетании с необходимым фармацевтическим носителем. Спецификация раскрытых в настоящем документе форм единиц дозировки определена и напрямую зависит от уникальных характеристик активного соединения и конкретного терапевтического эффекта, который должен быть достигнут.

Молекулы нуклеиновой кислоты, описанные в настоящем документе, могут быть встроены в векторы и использованы в качестве векторов генной терапии. Генетические векторы могут доставляться субъекту любым из нескольких путей, например, как описано в патенте США № 5703055. Таким образом, доставка может также включать, например, внутривенную инъекцию, местное введение (см. патент США

№ 5328470) или стереотаксическую инъекцию (см., например, Chen et al. (1994) PNAS 91: 3054-3057). Фармацевтический препарат вектора генной терапии может включать вектор генной терапии в приемлемом разбавителе или может содержать матрицу медленного высвобождения, в которой внедрен носитель доставки гена. Альтернативно, когда полный вектор доставки гена может быть получен интактным из рекомбинантных клеток, например ретровирусных векторов, фармацевтический препарат может включать одну или несколько клеток, которые продуцируют систему доставки генов.

Фармацевтические композиции могут быть включены в контейнер, упаковку или дозатор вместе с инструкциями для введения.

Следует понимать, что раскрытое в настоящем документе описание не ограничивается конкретными методами, протоколами и реагентами и примерами, описанными в настоящем документе. Терминология и примеры, используемые в настоящем документе, предназначены только для описания конкретных вариантов реализации, в целях предоставления руководства квалифицированному специалисту и не предназначены для ограничения объема раскрытия, представленного в настоящем документе.

Примеры

Пример 1. Общие способы

Клетки печени человека

Ткани печени взрослого человека были получены от лиц 3-23 лет и старше. Ткани печени были использованы с одобрения Комитета по клиническим исследованиям (институциональный обзорный совет). Выделение клеток печени человека проводили, как описано (Sapir et al., (2005) Proc Natl Acad Sci USA 102: 7964-7969; Meivar-Levy et al., (2007) Hepatology 46: 898-905). Клетки культивировали в минимально необходимой питательной среде Дульбекко (1 г/л глюкозы), дополненной 10% фетальной телячьей сывороткой, 100 единиц/мл пенициллина; 100 нг/мл стрептомицина; 250 нг/мл амфотерицина В (Biological Industries, Beit Haemek, Israel) и выдерживали при 37 °C в увлажненной атмосфере с 5% CO₂ и 95% воздуха.

Вирусная инфекция

Аденовирусы, которые использовались в этом исследовании, были следующими: Ad-CMV-Pdx-1 (Sapir et al., 2005 *ibid*, Meivar-Levy et al., 2007 *ibid*, Ad-RIP-luciferase (Seijffers et al., (1999) Endocrinology 140: 3311-3317), Ad-CMV-B-Gal, Ad-CMV-MafA (щедрый подарок от Newgard, C.B., Duke University), Ad-CMV-Pax4-IRES-GFP (щедрый подарок от St Onge, L. DeveloGen AG, Геттинген, Германия) и Ad-CMV-Isl1 (щедрый подарок от Kieffer, T. University of British Columbia, Ванкувер, Канада). Вирусные частицы были созданы с помощью стандартного протокола (He et al., (1998) Proc Natl Acad Sci USA 95: 2509-2514).

Клетки печени были инфицированы рекомбинантными аденовирусами на 5-6 дней (табл. 1), дополнены EGF (20 нг/мл, Cytolab, Ltd., Israel) и никотинамидом (10 mM, Sigma). Оптимальную множественность инфицирования (MOI) определяли согласно с выживаемостью клеток (<75%) и индукцией С-пептидной секреции. MOI используемых вирусов; Ad-CMV-Pdx-1 (1000 MOI), Ad-CCV-Pox4-fMS-GDP (100 MOI), Ad-CMV-MafA (10 MOI) и Ad-CCV-Isl1 (100 MOI).

Выделение РНК, реакции обратной транскрипции и ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР)

Выделяли тотальную РНК, получали и амплифицировали кДНК, как описано ранее (Ber et al., (2003) J Biol Chem 278: 31950-31957; Sapir et al., (2005) *ibid*. Количественная ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) в режиме реального времени была выполнена с использованием ABI Step one plus sequence Detection system (Applied Biosystems, CA, USA), как описано ранее (Sapir et al., (2005) *ibid*, Meivar-Levy et al., (2007) *ibid*, Aviv et al., (2009) J Biol Chem 284: 33509-33520).

Определение секреции С-пептида и инсулина

Секрецию С-пептида и инсулина измеряли путем статических инкубаций первичных культур взрослых клеток печени через 6 дней после изначального воздействия вирусной обработкой, как описано (Sapir et al., (2005) *ibid*, Meivar-Levy et al., (2007) *ibid*, Aviv et al., (2009) *ibid*. Секреция С-пептида, регулируемая глюкозой, была измерена при 2 и 17,5 mM глюкозы, которая была определена с помощью дозозависимых анализов, чтобы максимально индуцировать секрецию инсулина из трансдифференцированных клеток печени, (Sapir et al., (2005) *ibid*, Meivar-Levy и др. (2007) *ibid*, Aviv et al. (2009), *ibid*. Секреция С-пептида была определена радиоиммуноанализом с использованием набора для радиоиммуноанализа человеческого С-пептида (Linco Research, St. Charles, MO; <4% перекрестная реактивность на человеческий проинсулин). Секрецию инсулина определяли с помощью радиоиммунологического анализа с использованием набора для радиоиммуноанализа человеческого инсулина (DPC, Angeles, CA, 32% перекрестной реактивности на человеческий проинсулин). Секреция была нормализована на общий клеточный белок, измеренный с помощью набора для анализа белка Bio-Rad.

Люциферазный анализ

Клетки печени человека были ко-инфицированы Ad-RIP-люциферазой (200moi) и различными аденовирусами (как описано ниже). Шесть дней спустя активность люциферазы была измерена с использованием системы люциферазного анализа (Promega) и люцинометра LKB 1250 (LKB, Финляндия). Ре-

зультаты были нормализованы на общий клеточный белок, измеренный набором для анализа белка Bio-Rad (Bio-Rad).

Иммунофлуоресценция

Клетки печени человека, обработанные различными аденовирусами, высевали на стеклянные покровные слайды в 12-луночные планшеты для культур (2×10^5 клетки/луночку). Через 3-4 дня клетки фиксировали и окрашивали, как описано (Sapir et al., 2005) *ibid*, Meivar-Levy и др. (2007) *ibid*, Aviv et al (2009) *ibid*. Антитела, используемые в этом исследовании: антитела к кроличьему PDX-1, антитела к козьему PDX-1 (оба 1:1000 - щедрый подарок от C.V.E. Wright), антитела к человеческому инсулину, антитела к человеческому соматостатину (оба 1:100, Dako, Глоструп, Дания), антитела к Pax4 (1:100, R&D Systems, Миннеаполис, Миннесота), антитела к MafA (1:160, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Санта-Крус, Калифорния). Вторичными антителами, которые использовались, были антитела к кроличьему IgG цианина (cy2), конъюгированные 1:250, антитела к кроличьему IgG индокарбоцианина (cy3), конъюгированные 1:250, антитела против козьего IgG цианина (cy2), конъюгированные 1:200, антитела к козьему IgG индокарбоцианина (cy3), конъюгированные 1:250, и антитела к мышинному IgG индокарбоцианина (cy3), конъюгированные 1:250 (все от Jackson ImmunoResearch, Филадельфия). В конце клетки окрашивали 4',6-диамидино-2-фенилиндолом (DAPI, Sigma). Слайды были отображены и проанализированы с использованием флуоресцентного микроскопа (Provis, Olympus).

Анализ чистоты

Анализ на основе проточной цитометрии был разработан как основной анализ чистоты для гарантии того, что более 90% клеток во время размножения и трансдифференцировки имеют фенотип мезенхимальной стволовой клетки (MSC).

Культивируемые MSCs должны окрашиваться положительно по CD73, CD90, CD105 и CD44 и должны быть отрицательными по CD45, CD34, CD14 или CD11b, CD19 или CD79 α и поверхностным молекулам HLA-DR.

Как проиллюстрировано на фиг. 44A и 44B, размноженные клетки печени и инфицированные клетки экспрессировали маркеры CD90, CD44, CD105 и CD73 на высоких уровнях (>90%), тогда как они не экспрессировали отрицательные маркеры клеточной линии (смесь CD34, CD11b, CD45, CD19 и HLA-DR). Следует отметить, что экспрессия CD105 была слегка снижена в инфицированных клетках на P16, по сравнению с неинфицированными клетками на P14. Дополнительные эксперименты необходимы, чтобы понять, является ли это снижение значительным и снижается в связи с количеством пассажей или с трансдифференцировкой. Эти результаты демонстрируют, что маркеры MSC были стабильными с течением времени и во время трансдифференцировки клеток печени. Проточная цитометрия для маркеров MSC может быть фактически использована в качестве теста контроля качества.

Следующим этапом будет разработка проточной цитометрии или иммунофлуоресцентных анализов для количественной оценки субпопуляций, экспрессирующих или ко-экспрессирующих различные экзогенные факторы транскрипции и, в идеале, инсулин или С-пептид.

Статистический анализ

Статистический анализ проводили с использованием 2-выборочного теста t-критерия Стьюдента, предполагающего равные отклонения.

Пример 2. PDX-1-индуцированная трансдифференциация

Предыдущие исследования (Sapir et al., 2005) *ibid*, Meivar-Levy et al., (2007) *ibid*, Aviv et al., (2009) *ibid*, Gefen-Halevi et al. (2010) Cell Reprogram 12: 655-664; Meivar-Levy et al., (2011) J Transplant 2011: 252387) предположили, что только PDX-1 способен индуцировать β -клеточный фенотип и функциональность в клетках печени человека, возможно, из-за его способности активировать многочисленные иначе неактивные эндогенные пТФ в печени. Активация клеточной линии поджелудочной железы была быстрой и произошла в пределах 5 дней (Sapir et al., 2005) *ibid*, Ber et al., (2003) *ibid*.

В этом примере исследовали последовательность событий, которые опосредуют PDX-1 индуцированную трансдифференцировку клеток печени в клетки поджелудочной железы. Аденовирусные векторы, кодирующие Pdx-1, вводили во взрослые клетки печени человека, и эффекты эктопической экспрессии PDX-1 контролировались в течение четырех последующих после инфицирования дней (дни 2-5; фиг. 1A-1D). Экспрессию гормонов поджелудочной железы и специфичных для поджелудочной железы транскрипционных факторов определяли с помощью количественного ОТ-ПЦР каждый день в течение 5 дней. Результаты были нормированы на экспрессию гена B-actin в пределах одного и того же образца кДНК и представлены в виде среднего $\pm$ SE относительной экспрессии в сравнении с контрольными клетками обработанными вирусом (Ad-CMV- β -gal, 1000 MOI) в тот же день. Были проведены два независимых эксперимента с $n \geq 4$, * $p < 0,05$ и ** $p < 0,01$.

Гены глюкагона и соматостатина были немедленно активированы в течение одного дня после инфицирования Ad-Pdx-1 (фиг. 1B и 1C). Однако экспрессия инсулина была обнаружена только на четвертый-пятый день после инфицирования (фиг. 1A). Чтобы дать механическое объяснение различной временной активации трех основных гормонов поджелудочной железы, уровни экспрессии эндогенно активированных транскрипционных факторов были проанализированы в процессе трансдифференцировки.

Ранние эндокринные транскрипционные факторы поджелудочной железы, NGN3 и NEUROD1 были немедленно активированы (фиг. 1D). Тем не менее, Т-клеточные специфические ТФ, такие как NKX6.1 и MafA, только постепенно и умеренно активировались в ответ на эктопическую экспрессию PDX-1, достигая своего пикового уровня экспрессии на четвертый и пятый день соответственно. Активация экспрессии гена инсулина на пятый день ассоциировалась не только с увеличением экспрессии MafA, но и с уменьшением экспрессии Isl1 (фиг. 1D). Эти данные свидетельствуют о том, что трансдифференцировка клеток печени человека на линию поджелудочной железы, будучи быстрой, является постепенным и последовательным процессом. Определенную временную активацию экспрессии генов гормонов поджелудочной железы (например, соматостатина и глюкагона) можно частично отнести к временным изменениям и относительным уровням экспрессии эндогенно активированных пТФ.

Пример 3. Комбинированная экспрессия PDX-1, PAX4 и MAF A увеличивает эффективность трансдифференциации клеток печени в клетки поджелудочной железы

Предыдущие исследования предположили, что согласованная экспрессия нескольких пТФ увеличивает эффективность трансдифференцировки вдоль линии В-клеток по сравнению с индуцированной отдельными пТФ (Kaneto et al., (2005) *Diabetes* 54: 1009-1022; Tang et al., (2006) *Lab Invest.* 86: 829-841; Song et al., (2007) *Biochem Biophys Res Commun.* 354: 334-339; Wang et al., (2007) *Mol Ther* 15: 255-263; Gefen-Halevi et al., (2010) *ibid*, также как вдоль других линий. Чтобы проанализировать эту идею в экспериментальной системе первичных взрослых человеческих клеток печени, описанных в настоящем документе, был исследован индивидуальный и совместный вклад трех основных пТФ в трансдифференцировку клеток печени в клетки поджелудочной железы. PDX-1, Pax4 и MafA, которые опосредуют различные этапы органогенеза поджелудочной железы, были эктопически ко-экспрессированы в первичных культурах взрослых человеческих клеток печени с использованием рекомбинантных аденовирусов. Культуры взрослых человеческих клеток печени были инфицированы Ad-CMV-Pdx-1 (1000 MOI), Ad-CCV-Pax-4 (100 MOI) и Ad-CCV-MofA (10 MOI) самостоятельно или совместно, или с контрольным вирусом (Ad-CMV-β-gal, 1000 MOI) и маркеры дифференцировки поджелудочной железы были исследованы через шесть дней. Множественность инфицирования (MOI) каждого фактора титровали, так чтобы получить максимальную эффективность перепрограммирования, связанную с минимальным неблагоприятным воздействием на жизнеспособность инфицированных клеток. PDX-1 экспрессировался в 70% клеток в культуре, и совместная ко-экспрессия всех 3 пТФ была видна у 46,8% из PDX-1 положительных клеток (фиг. 2A). Очень мало клеток окрашивалось положительно только для Pax-4 или для MafA. Клетки, окрашенные положительно для всех трех пТФ, обозначены стрелками (фиг. 2A, правая панель). На фиг. 2B, клетки печени были совместно инфицированы комбинированными пТФ и с Ad-RIP-LUC (200 moi) и была измеряна активность люциферазы инсулинового промотора.

Объединенная экспрессия трех пТФ приводила к существенному увеличению активации промотора инсулина (фиг. 2B), трехкратному увеличению числа клеток, продуцирующих (про)инсулин (фиг. 2C) и увеличению на 30-60% регулируемой глюкозой секреции (про)инсулина (фиг. 2D), по сравнению с той, которая индуцируется только каждым из пТФ. В совокупности эти результаты свидетельствуют, что комбинация 3 пТФ повышает эффективность трансдифференцировки, а также указывает, что индивидуально каждый из факторов ограничен по своей способности или недостаточен для активации максимальной трансдифференцировки (Kaneto et al., (2005) *ibid*, Tang et al., (2006) *ibid*, Zhou et al., (2008) *Nature* 455: 627-632).

Пример 4. Созревание и разделение в разные гормон-производящие клетки трансдифференцированных клеток временно контролируется в порядке иерархии

В этом примере было исследовано влияние временного контроля эктопической экспрессии пТФ, чтобы определить, контролируется ли повышенная эффективность трансдифференцировки путем комбинированной эктопической экспрессии трех пТФ, также временно, как было предложено выше (фиг. 2A-2D). В поддержку временного контроля, играющего роль в трансдифференцировке поджелудочной железы, три пТФ Pdx-1, Pax4 и MafA проявляют определенную временную экспрессию и функцию во время органогенеза поджелудочной железы.

Три пТФ PDX-1, Pax4 и MafA вводились последовательно или совместно в первичные культуры клеток печени взрослого человека с использованием рекомбинантных аденовирусов. Аденовирус-опосредованная экспрессия эктопических генов достигает пикового значения 17 ч после инфицирования (Varda-Bloom et al., (2001) *Gene Ther* 8: 819-827). Следовательно, пТФ последовательно вводили в течение трех последующих дней (см. Вирусную инфекцию в примере 1), что позволяло проявлять их индивидуальные эффекты. Клетки заражали в соответствии с графиком, как показано в табл. 1.

Таблица 1

Лечение	День 1	День 2	День 3	День 4	День 5	День 6
обработки						
A	Ad- β -gal (контроль)					сбор
B	Ad-Pdx-1 + Ad-Pax4+Ad-MafA					сбор
C	Ad-Pdx-1	Ad-Pax4	Ad-MafA			сбор
D	Ad-MafA	Ad-Pax4	Ad-Pdx-1			сбор
E	Ad-Pdx1	Ad-MafA	Ad-Pax4			сбор

Клетки последовательно заражали одной аденовирусной конструкцией пТФ в день в течение трех дней в трех разных последовательностях: прямой иерархический порядок (обработка C=Pdx-1 -> Pax4 -> MafA), в противоположном порядке (обработка D=MafA Pax4 - - -> Pdx-1) и в случайном порядке (обработка E=Pdx-1 MafA - - -> Pax4). Эффект последовательных введений пТФ на эффективность трансдифференцировки и на созревание β -клеток сравнивали с эффектом совместного или одновременного введения всех трех пТФ в первый день (обработка B=Pdx-1+Pax4+MafA) и к аналогичному МОИ контрольного вируса (обработка A= β -gal) (табл. 1 и фиг. 3А). В частности, культивируемые взрослые человеческие клетки печени инфицировали Ad-CCV-Pdx-1 (1000 MOI), Ad-CMV-Pax-4 (100 MOI) и Ad-CMV-MafA (10 MOI) вместе или последовательно, как обобщено на фиг. 3А и в табл. 1 (обработка B-E) или контрольным вирусом (Ad-CMV- β -gal, 1000 moi, обработка A) и проанализировали их дифференцировку на клетки поджелудочной железы через шесть дней.

Активность инсулинового промотора (фиг. 4А), процент клеток, продуцирующих инсулин (фиг. 3В), и секреция (про)инсулина, регулируемая глюкозой (фиг. 3С), не зависели от порядка последовательно вводимых пТФ. Интересно, что последовательное введение пТФ в случайном порядке (обработка E=Pdx-1 - - -> MafA - - -> Pax4) приводило к увеличению активности промотора инсулина, но было связано с потерей глюкозной регуляции секреции инсулина и уменьшенной экспрессией транспортера глюкозы 2 (GLUT-2) (фиг. 3В, 3С и 4В). Потеря чувствительности к глюкозе при изменении порядка введения Pax4 и MafA указывает на потенциальный эффект последовательности экспрессии пТФ на β -клеточное созревание, но не на эффективность процесса трансдифференцировки.

Пример 5. Иерархическое введение PDX-1, PAX4 и MAFA содействует созреванию трансдифференцированных клеток к β -подобным клеткам

Предыдущие результаты способствовали дальнейшему исследованию, чтобы определить, в какой степени и при каких условиях повышение эффективности трансдифференцировки связано с усиленным созреванием вдоль линии β -клеток. Характерными свойствами зрелых β -клеток являются способность к процессингу проинсулина и секреции под регуляцией глюкозы (Eberhard et al., (2009) Curr Opin Genet Dev 19: 469-475; Borowiak, (2010) Rev Diabet Stud 7: 93-104). Чтобы проанализировать, влияют ли временные изменения экспрессии пТФ на созревание трансдифференцированных клеток вдоль линии β -клеток, был проанализирован эффект различных обработок А-Е (табл. 1 и фиг. 3А) на процессинг проинсулина и секрецию с-пептида, регулируемую глюкозой.

Действительно, только прямое иерархическое введение (обработка С) пТФ приводило к выраженной продукции обработанного инсулина и его секреции регулируемой глюкозой, которая проявляла физиологические характеристики в ответ на дозу глюкозы (фиг. 3С и 5А). Новый приобретенный фенотип и функция были стабильными, что продемонстрировано способностью секретировать с-пептид под регуляцией глюкозы в течение четырех недель *in vitro* (фиг. 5А и 5В).

Повышенная обработка прогормона только при прямом иерархическом введении пТФ (обработка С) была связана с выраженным увеличением экспрессии гена PCSK2 и GLUT2, которые играют роль в процессинге прогормона и чувствительности к глюкозе соответственно (фиг. 3А-3Е и 4А-4С). Эти данные указывают на обязательную роль последовательной и прямой иерархической экспрессии пТФ в содействии созреванию и функции трансдифференцированных клеток печени вдоль линии β -клеток. Как совместный (обработка В), так и последовательное введение TF в непрямом иерархическом порядке (обработка D и E) не смогли создать трансдифференцированные клетки, которые демонстрируют зрелые β -клеточные характеристики.

Для обеспечения механистического объяснения изменений в β -клеточно-подобном состоянии созревания был проанализирован репертуар эндогенно активированных пТФ под различными временными обработками (B-E). Все обработки (B-E) приводили к увеличению экспрессии многочисленных эндогенных пТФ (фиг. 3Е), таких как NEUROG3, NEURODI, NKX6.1 и NKX2.2. Тем не менее, наиболее надежная разница между "зрелыми" (обработка С) и "незрелыми" фенотипами (обработка В, Е и D) проявлялась на уровнях эндогенной экспрессии гена Isl1. Таким образом, наиболее усиленное созревание вдоль линии β -клеток, индуцированное прямым иерархическим введением пТФ (обработка С), коррелирует с

резким уменьшением эндогенной экспрессии Isl1 (фиг. 3Е, стрелка). В совокупности эти данные свидетельствуют о том, что на созревание трансдифференцированных клеток на β -клетки могут влиять уровни относительной и временной экспрессии конкретных пТФ.

Пример 6: Иерархическое введение PDX-1, PAX4 и MAFA способствует разделению трансдифференцированных клеток на β -подобные и δ -подобные клетки

Исключение MafA из обработки С (табл. 1) индуцирует экспрессию Isl-1 (фиг. 6D) и экспрессию гена соматостатина (фиг. 8D). Чтобы проанализировать, вызывает ли увеличение экспрессии Isl-1 при исключении MafA, повышенную экспрессию гена Соматостатина, Ad-CMV-Isl-1 добавляли вместе с MafA на 3-й день (обработка С, табл. 1). Фактически, Isl-1 увеличивает экспрессию гена соматостатина (фиг. 6Е). Эктопическая экспрессия Isl-1 (C+Isl-1) вызывала также увеличение продукции белка соматостатина (фиг. 6F) и его совместное производство в клетках, продуцирующих инсулин (фиг. 9, нижняя панель), что свидетельствует о том, что высокая экспрессия MafA, связанная с низким уровнем экспрессии Isl-1 имеет решающее значение для разделения между клетками, продуцирующими инсулин и соматостатин.

Пример 7. Анализ индивидуального вклада PDX-1, PAX4 и MAFA в трансдифференциацию клеток печени в клетки поджелудочной железы

Последовательные характеристики процесса трансдифференцировки были идентифицированы путем исследований временного усиления функций. Дополнительный анализ отдельного вклада каждого из транскрипционных факторов Pdx-1, Pax4 и MafA в иерархический процесс развития выполнялся с помощью подходом относительного и временного "уменьшения функции". Взрослые человеческие клетки печени обрабатывались согласно прямому временному и последовательному протоколу перепрограммирования (обработка С), из которого один из эктопических пТФ был исключен. Исключенный пТФ заменяли контрольным аденовирусом, обеспечивающий экспрессию β -gal при аналогичной множественности инфицированности. В частности, взрослые клетки печени человека обрабатывались прямым "иерархическим" последовательным порядком инфицирования (обработка С, фиг. 3А и табл. 1). Каждый транскрипционный фактор (пТФ) был исключен за один раз и заменен идентичным moi Ad-CMV- β -gal. Исключение Pdx-1 указывается как (C-Pdx-1), исключение Pax4 указывается как (C-Pax4), а MafA - как (C-MafA).

Функциональные последствия отдельного исключения экспрессии каждого из пТФ были проанализированы на молекулярном и функциональном уровнях (фиг. 6А-6D). Отдельное исключение Pdx-1 и MafA (C-Pdx-1 и C-MafA соответственно) приводил к уменьшению активации промотора инсулина (фиг. 6А), снижению реакции на глюкозу секрецией инсулина (фиг. 6В) и снижению экспрессии GLUT2 и GK (фиг. 6С). Исключение MafA связано также с уменьшенной экспрессией прогормон-конвертазы PCSK2 (фиг. 6С). С другой стороны, исключение Pax4 (C-Pax4) не оказывало существенного влияния на активацию промотора инсулина и не влияло на секрецию С-пептида, регулируемую глюкозой. Исключение Pax-4 было связано с уменьшением экспрессии GLUT2 и PCSK2 (фиг. 6С), что, возможно, указывало на то, что экспрессия GK достаточна для получения способности к контролю гормональной секреции глюкозой.

Анализ последствий временного и раздельного исключения пТФ в репертуаре эндогенно активированной экспрессии пТФ проводили для объяснения этих изменений в развитии. Исключение Pdx-1 и Pax4 вызвали заметное снижение экспрессии большинства других пТФ (включая NeuroG3, NKX2.2, NKX6.2 и Pax6), что свидетельствует о том, что их потенциальный вклад в повышение эффективности трансдифференцировки связан с их способностью активировать эндогенные TF поджелудочной железы (фиг. 6D). С другой стороны, исключение MafA не способствовало дальнейшей активации эндогенной экспрессии пТФ, возможно, отражая ее позднюю и ограниченную экспрессию только в β -клетках поджелудочной железы. Напротив, вклад MafA в усиление активности промотора инсулина, процессинг прогормона и контролируемую глюкозой секрецию связывали только с уменьшением экспрессии Isl-1 (фиг. 6D). Эти данные могут указывать на то, что MafA не участвует в дальнейшем повышении эффективности экспрессии эндогенных пТФ и трансдифференцировки клеток печени в клетки поджелудочной железы, а скорее в содействии созреванию трансдифференцированных клеток.

Пример 8. ISL-1 предотвращает созревание трансдифференцированных клеток на линию β -клеток

Эффект MafA на β -клеточное созревание может частично ассоциироваться с его способностью подавлять экспрессию Isl1. Чтобы проверить эту гипотезу, эктопические Isl1 были введены с помощью аденовирусной инфекции (Ad-Isl1) в трансдифференцированные клетки. Вкратце, взрослые клетки печени человека обрабатывались прямым "иерархическим" последовательным порядком инфицирования (обработка С) и дополнялись Ad-Isl1 (1 или 100 MOI) на 3-й день (C+Isl1).

Как указано выше, последовательное введение трех пТФ в прямом иерархическом режиме (обработка С) приводило к повышению эффективности трансдифференцирования и созреванию вновь образованных клеток вдоль линии β -клеток. Isl1 совместно вводили с MafA на третий день (C+Isl1). Фактически, избыточная экспрессия Isl1 на третий день под контролем гетерологичного промотора привела к значительному снижению экспрессии гена инсулина и абляции регуляции глюкозой секреции (про) инсулина (фиг. 7А-7С). Потеря чувствительности к глюкозе была связана с уменьшенной экспрессией

GLUT2 (фиг. 7C). Эти результаты свидетельствуют о том, что нерегулируемая экспрессия Isl1 на заключительных стадиях трансдифференциационного протокола потенциально препятствует созреванию вдоль линии β -клеток и может частично быть ответственной за сниженное созревание при низкой экспрессии MafA.

Взяты вместе, эти данные указывают на важную обязательную роль прямой иерархической экспрессии пТФ в содействии созреванию трансдифференцированных клеток печени вдоль линии β -клеток. Более того, последовательный процесс развития связан как с активацией, так и с подавлением пТФ, которые могут способствовать или препятствовать созреванию трансдифференцированных клеток вдоль линии β -клеток поджелудочной железы.

Пример 9. PDX-1, PAX4 и MAF иерархическое введение индуцирует экспрессию глюкагона и соматостатина

Трансдифференцировка вдоль линии эндокринных клеток поджелудочной железы приводит к активации экспрессии многочисленных гормонов поджелудочной железы. Степень, с которой временная манипуляция пТФ влияет на эти уровни экспрессии гормонов, также была исследована. Экспрессия гена гормона поджелудочной железы - глюкагона (GCG) (фиг. 8A и 8B), соматостатина (SST) (фиг. 8A, 8D и 8E) или специфичных для клеток факторов транскрипции (фиг. 8C) определяли путем количественного анализа ПЦР в реальном времени после указанной обработки.

Транскрипцию генов глюкагона (GCG) и соматостатина (SST) индуцировали каждым из отдельно экспрессированных пТФ, главным образом Pdx-1 и MafA, и в меньшей степени Pax4 (фиг. 8A). Дальнейшее увеличение транскрипции гена глюкагона происходило только при прямом иерархическом введении пТФ (фиг. 4A, см. обработку C). Pdx-1 и MafA оказывали влияние на экспрессию глюкагона в процессе, связанном с активацией специфических β -клеточных факторов транскрипции ARX и BRAIN4 или только ARX соответственно (фиг. 8C). Экспрессия гена соматостатина, которая не изменилась под воздействием большинства обработок (фиг. 8A и 8D), была увеличена, когда временный протокол был осуществлен с помощью эктопической экспрессии Pax4 (E=Pdx-1 -> MafA -> Pax4). Этот последовательный протокол также проявлял ухудшающее действие на секрецию (про)инсулина, контролируемую глюкозой, и был связан с увеличением эндогенной экспрессии Isl1 (фиг. 3C и 3E). Нарушенное созревание вдоль линии β -клеток было связано с увеличением экспрессии гена соматостатина и увеличением числа соматостатин-положительных клеток (фиг. 8D). Многие из клеток проявляли совместную локализацию соматостатина и инсулина (данные не показаны).

Исключение каждого пТФ из иерархического введения (обработка C), как описано в примере 6, также использовалось для дальнейшего изучения роли отдельных пТФ в экспрессии глюкагона и соматостатина (фиг. 8B и 8D). Исключение Pax4 существенно уменьшало экспрессию гена соматостатина, указывая на его потенциальную роль в индуцировании транскрипции этого гена (фиг. 8D). Интересно отметить, что исключение MafA в конце процесса развития также существенно увеличивало экспрессию гена соматостатина, что указывает на потенциальный ингибирующий эффект MafA на экспрессию гена соматостатина. Этот эффект можно было бы также отнести к способности MafA подавлять экспрессию Isl1. Для проверки этой гипотезы был проанализирован эффект эктопических Isl1 на экспрессию гена соматостатина. Действительно, администрация Ad-Isl1 на третий день вместе с MafA (C+Isl1) увеличивала экспрессию гена соматостатина (фиг. 8E), уменьшая экспрессию гена инсулина, производство гормона и секрецию (фиг. 8A, 8B и фиг. 7A-7C). В этих экспериментальных условиях 40% клеток, продуцирующих инсулин, окрашивали положительно для соматостатина с очень небольшим количеством клеток, экспрессирующих только соматостатин.

Эти результаты показывают, что часть созревания трансдифференцированных клеток к β -клеткам относится к экспрессии MafA на поздних стадиях процесса трансдифференцировки. На этом этапе MafA ограничивает экспрессию соматостатина в процессе, связанном с его способностью ингибировать экспрессию Isl1.

Фиг. 9 иллюстрирует предложенный механизм индукции трансдифференцировки клеток печени в клетки поджелудочной железы транскрипционными факторами поджелудочной железы. Каждый из пТФ способен активировать умеренный β -клеточно-подобный фенотип в ограниченном числе клеток печени человека. Совместная экспрессия пТФ значительно увеличивает трансдифференцировку клеток печени в эндокринные клетки поджелудочной железы. Однако новообразованные клетки являются незрелыми и ко-экспрессируют как инсулин, так и соматостатин. Только последовательное введение одних и тех же факторов в прямом иерархическом режиме повышает эффективность трансдифференцировки, а также трансдифференционное созревание клеток вдоль линии β -клеток.

Пример 10: Идентификация популяций клеток с трансдифференцией

Capacity In Vivo

Популяции клеток с трансдифференциационной способностью были идентифицированы in vivo у мышей. Эктопическая экспрессия гена Pdx-1 была достигнута в мышечной печени. Несмотря на равномерную экспрессию эктопического гена Pdx-1 примерно в 40-50% клеток печени (фиг. 10A) (Ferber et al., (2000) Nat Med 6: 568-572 и Ber et al., (2003) *ibid*) инсулинпродуцирующие клетки (ИПК) у мышей, обра-

ботанных Pdx-1 *in vivo* были в основном расположены вблизи центральных вен (фиг. 10B) и характеризовались активной сигнализацией Wnt и экспрессией глутаминсинтетазы (GS) (фиг. 1C). Совместная локализация экспрессии GS и активации инсулина Pdx-1 также указывала на то, что те клетки, которые могут активировать GSRE, имеют предрасположенность к увеличенной способности к трансдифференцировке. Таким образом, популяции клеток, предрасположенные к трансдифференцировке, также могут быть идентифицированы активацией GSRE или активным Wnt-сигнальным путем.

Пример 11. Использование аденовирусов для идентификации клеток печени человека, предрасположенных к трансдифференциации

Этот пример демонстрирует использование рекомбинантных аденовирусов для идентификации клеток печени человека, которые предрасположены к трансдифференцировке. Человеческие клетки печени в культуре гетерогенны в отношении активации внутриклеточного сигнального пути Wnt и экспрессии GS. Поскольку GS однозначно экспрессируется в периферических клетках печени, поэтому способность активировать GSRE (GS Regulatory Element) может быть использована в качестве селективного параметра для выделения соответствующих клеток.

Кроме того, поскольку GSRE содержит также связующий элемент STAT3, предрасположение клеток к трансдифференцировке может быть опосредовано этим элементом. Путь STAT3 также может быть задействован в перепрограммировании клеток или их предрасположенностью к трансдифференцировке (фиг. 10A-10D, 11, 14A-14E и 19).

Пример 12. GSRE повторно отмечается у 13-15% клеток печени человека в культуре

GSRE включает в себя связующие элементы TCF/LEF и STAT5 (фиг. 11). Были получены два рекомбинантных аденовируса, которые обеспечивают экспрессию гена eGFP или генов Pdx-1 под контролем GSRE (фиг. 11), оперативно связанного с минимальным промотором ТК. Эти аденовирусы показывали экспрессию или Pdx-1 (фиг. 12A), или eGFP (фиг. 12B). Оба белка были повторно экспрессированы примерно в 13-15% клеток печени человека в культуре, что указывало на нацеливание на специфическую популяцию клеток печени.

Пример 13. GSRE управляемый PDX-1 более эффективен, чем CMV управляемый PDX-1 в активации продукции инсулина в клетках печени

Несмотря на повторяющуюся экспрессию GSRE управляемого PDX-1, только около 13±2% клеток в культуре показали способность к трансдифференцировке, аналогичную или превышающую индуцированную Ad-CMV-Pdx-1, который приводит к экспрессии Pdx-1 в 60-80% клеток в культуре (фиг. 13A-13C). GSRE-активирующие клетки могли составлять большую часть трансдифференциационной способности среди всех клеток печени взрослого человека в культуре. Производство инсулина происходило в 25% Pdx-1 положительных клетках при обработке Ad-GSRE-Pdx-1 по сравнению с 1% клеток, обработанных Ad-CMV-Pdx-1.

Пример 14. Использование лентивирусов для постоянной метки GSRE+клеток с помощью EGFP

Для постоянного прослеживания линий использовалась лентивирусная конструкция. Прослеживание линий *in vitro* за активностью GSRE выполнялось модифицированной двойной лентивирусной системой, недавно использовавшейся для отслеживания KRT5 в кератиноцитах или экспрессии альбумина в клетках печени. Эта лентивирусная система (сотрудничество с профессором P. Ravassard из Université Pierre et Marie Curie, Париж, Франция, фиг. 12A) включает репортер CMV-loxP-DsRed2-loxP-eGFP (R\G) и дополнительный лентивирусный вектор, обеспечивающий экспрессию Cre Рекомбиназы под контролем GSRE и минимального ТК промотора (щедро предоставлено профессором Caunitz, Германия, фиг. 3A). Таким образом, активирующие GSRE клетки необратимо помечены eGFP (eGFP+), тогда как остальные дважды инфицированные клетки помечены DsRed2 (DsRed2+). Десять-четырнадцать процентов клеток стали eGFP+ менее чем за 10 дней (фиг. 14B). Клетки разделяли сортировщиком клеток (фиг. 14A-14E) и отдельно размножали (фиг. 15A). Культуры eGFP+ (активаторы GSRE) и клетки DsRed2+ были получены из 10 разных человеческих доноров (в возрасте 3-60 лет).

Пример 15. EGFP+ клетки стойко проявляли повышенную способность к трансдифференциации

Клетки печени человека выделенные путем трассировки линии в соответствии с активностью GSRE, эффективно размножались (фиг. 15A) и аналогичным образом эффективно инфицировались рекомбинантными аденовирусами. EGFP+ клетки стойко демонстрировали превосходную способность к трансдифференцировке (фиг. 16A-16C), выраженную экспрессией гена инсулина и глюкагона, которая была сопоставима с экспрессией генов поджелудочной железы человека в культуре (фиг. 16A), регулируемой глюкозой секрецией инсулина (фиг. 16B) и регулируемым глюкозой секрецией С-пептида (фиг. 16C). Эти способности были стойкими и не уменьшались при обширной клеточной пролиферации (фиг. 17).

Пример 16. Характеристика клеток с предрасположением к трансдифференцировке

Чтобы идентифицировать факторы, которые могли бы потенциально повлиять на определенную эффективность трансдифференцировки клеток печени человека, сравнивали глобальную экспрессию генов двух разделенных популяций с использованием микрочиповых анализов. Культуры клеток печени человека, полученные из 3 разных доноров и разделенных на клетки eGFP+ и DsRed2+, размножали в течение 4 пассажей. Выделенную РНК превращали в кДНК и подвергали микрочиповому анализу с ис-

пользованием General Human Array (GeneChip Human Genome U133A 2.0 Array, Affymetrix). Хотя большинство генов были экспрессированы на сопоставимых уровнях в отделенных группах, экспрессия около 800 проб была значительно различной (фиг. 18). Согласно анализу микрочипов, около 100 генов, кодирующих мембранные белки, дифференциально экспрессируются в клетках склонных к трансдифференцировке (eGFP+) и клетках что не показывали такого ответа (DsRed2+).

Некоторые из этих маркеров представлены в табл. 2А и 2В.

Таблица 2А. Мембранные антигены, которые дифференциально экспрессируются в клетках eGFP+ и DsRed2+

Антиген	Высокая экспрессия.	Кратность (Log 2)	Величина p	Коммерческое антитело
ABCB 1	DsRed2	-6,363	1,52E-02	BD Biosciences
ITGA4	DsRed2	-1,979	2,69E-02	R&D system (FAB)
ABCB4	DsRed2	-4,42	4,62E-02	Abcam (ab24108)
PRNP	DsRed2	-1,35	4,20E-02	BD Biosciences
HOMER1	eGFP	1,41	3,25E-04	Biorbyt
LAMP3	eGFP	1,285	1,81E-02	BD Biosciences
BMPR2	eGFP	1,236	3,5 0E-02	R&D system

Таблица 2В. Дифференциальная экспрессия кодирующих транскриптов клеточной поверхности в eGFP+ по сравнению с клетками DsRed2+

Гена Символ	Название гена	Изменение кратности EGFP+/DsRed2+	Δ Ct (ген актина) eGFP+ клетки
ITGA6	INTEGRIN ALPHA-6	2,82759	8,6
DCBLD2	DISCOIDIN, CUB И LCCL DOMAIN-CONTAINING PROTEIN 2	2,4747	12,3
THBS 1	THROMBOSPONDIN-1	2,29441	1,5
VAMP4	VESICLE-ASSOCIATED MEMBRANE PROTEIN 4	1,97484	18,3

Фиг. 47 иллюстрирует относительную экспрессию поверхностных молекул клеток, представленных в табл. 2В. Уровни экспрессии указанных молекул тестировали с помощью ПЦР в реальном времени и нормировали на экспрессию бета-актина. Данные Microarray предполагают многочисленные мембранные белки, которые дифференциально экспрессируются между eGFP+ и DsRed2+ клетками (Кратность=eGFP+/отличительная от DsRed2+(log 2). Все представленные антигены имеют коммерчески доступные антитела.

Пример 17. Активная WNT сигнализация в клетках, склонных к трансдифференцировке

Было предположено, что зональность полости печени контролируется градиентом уровней активированного β -catenin. В то время как большинство клеток в печени содержат очень низкую активность β -catenin, периферические клетки печени выражают высокую активность β -catenin, связанную с активной сигнализацией Wnt. Поскольку сигнализация Wnt является обязательной для компетентной активности β -клеток, пТФ-индуцированная активация линии поджелудочной железы в печени ограничена клетками, которые априори показывают активность Wnt-сигналинга.

GSRE использовал регуляторный элемент TCF, выделенный из 5'-энхансера GS. Если Pdx-1-индуцированная трансдифференцировка клеток печени в клетки поджелудочной железы частично опосредована внутриклеточным сигнальным путем Wnt, факторы, которые модулируют сигнальный путь Wnt, также могут влиять на эффективность трансдифференцировки (фиг. 19).

Эти данные во взрослых клетках печени человека показывают, что увеличение концентрации Wnt3a увеличивает индуцированную Pdx-I секрецию инсулина, регулируемую глюкозой, тогда как DKK3 (ингибитор сигнального пути Wnt) полностью отменяет действие Pdx-1 на этот процесс (фиг. 19). DKK3 также полностью отменил трансдифференцирующую способность клеток eGFP, выделенных в соответствии с их способностью активировать GSRE (фиг. 20).

Была проведена характеристика активности сигнального пути Wnt в популяциях клеток eGFP+ и DsRed+. Экспрессия APC, который участвует в дестабилизации β -катенина, так что уменьшает Wnt-сигналинг, была на 700% выше в клетках DsRed2+, чем в клетках eGFP+ (фиг. 21А, в относительном согласии с зоной, отображаемой in vivo). Популяция eGFP+ клеток имела увеличенные уровни активированного β -катенина (40%) по сравнению с уровнями, проанализированными в клетках DsRed2+ (фиг. 21В и 21С). Эти данные демонстрируют, что Wnt-сигналинг активен в клетках, которые являются компетент-

ными для активации GSRE и имеют предрасположенность к трансдифференцировке.

Пример 18. Сравнение эффективности трансдифференциации, индуцированной PAX4 и NEURODI

Цель

Целью данного исследования было сравнить аденовирусы PAX4 и NeuroDI (Ad-PAX4 и Ad-NeuroDI) в стимуляции процесса трансдифференцировки, индуцированного Ad-PDX-1.

Материалы и методы

Сравнение эффективности трансдифференцировки, индуцированной Ad-PAX4 или Ad-NeuroDI, проводилось на трех наивных культурах (несортированных первичных гепатоцитах), полученных от людей (Мухаммеда, Педро и Диего), и четырех основных культур гепатоцитов после сортировки по активации glutamine synthetase response element (GSRE) (обогащенный GS): Shalosh, Eden, Muhammad и Yarn.

Дизайн эксперимента

В первый день эксперимента 300000 клеток высевали после вирусной инфекции на 100-миллиметровой тарелке Falcon в соответствии с табл. 3. На третий день эксперимента клетки подсчитывали и обрабатывали Ad-MafA и высевали на 3 лунки 6-луночного планшета до конечной концентрации 100000 клеток/лунку. На шестой день эксперимента клетки анализировали на секрецию инсулина с использованием радиоиммуноанализа. Секрецию инсулина измеряли после инкубации клеток в течение 15 минут с использованием 2 мМ глюкозы (низкая) или 17,5 мМ глюкозы (высокая) в KRB.

Таблица 3. Краткое изложение различной комбинации аденовирусов, используемых для сравнения роли PAX4 и NeuroDI в процессе трансдифференцировки, вызванной PDX1

	День 1	День 3
1	Ad-Null 1300moi	
2	Ad-PDX1 500moi+ Ad-NeuroDI	Ad-MafA 50moi
3	Ad-PDX1 500moi+ Ad-PAX4 250moi	Ad-MafA 50moi

Результаты

Результаты суммированы в табл. 4 и 5 и на фиг. 24A-24B и 25A-25D.

Таблица 4. Краткое изложение окончательных расчетов полной секреции инсулина (INS) в час (нг INS/ч), сравнивающее роль PAX4 и NeuroDI в процессе трансдифференцировки, вызванной PDX1

	Образцы	Суммарная нг/ч		Средняя нг/ч		SE 2mM	SE 17.5mM
		Низкая	Высокая	Низкая	Высокая		
Контроль	Shalosh GS обогащенные	0	0,380923	0,166896	0,524835	0,101164	0,112632
	Eden Green	0,197364	0,758004				
	Muhammad GS обогащенный	0	0,721483				
	Yarn GS обогащенный	0	0,39728	0,034227	0,430182	0,032654	0,114352
	Max GS обогащенный	0	0				
	Eden GS обогащенный	0,008	0,3234				
	Muhammad наивный	0,245521	1,069337	0,432233	0,714142	0,254312	0,244889
	Pedro Наивный	0,935318	0,244501				
	Diego Наивный	0,115859	0,828589				

PDX1+ NeuroD1	Shalosh обогащенный	0, 102627	1,138869	0,14397	1,60143	0,057159	0,35122 5
	Eden Green	0	1,500592				
	Muhammad GS обогащенный	0,02763 5	1,048397				
	Yarn GS обогащенный	0,027635	4,162756	0,119999	1,900602	0,060742	0,480813
	Max GS обогащенный	0	2,177				
	Eden GS обогащенный	0,372	1,376				
	Muhammad Наивный	0	1,411349	0,191913	1,001924	0,137961	0,23494
	Pedro Наивный	0,45955 7	0,996881				
	Diego Наивный	0,11618 3	0,59754				
PDX1+ PAX4	Shalosh GS обогащенный	0,381611	0,491117	0,351915	1,301016	0,0875202	0,275093
	Yarn GS обогащенный	0,056133	0,7 85065				
	Muhammad GS обогащенный	0,30232 3	2,249145				
	Max GS обогащенный	0,057	2,744	0,223414	1,455865	0,137343	0,39361 4
	Eden GS обогащенный	0, 32	1,0 1				
	Muhammad Наивный	0,89452	1,376825	0,566084	1,042933	0,037142	0,37084 3
	Pedro Наивный	0,44735 6	0,4218				
	Diego Наивный	0,35637 6	1,330176				

Таблица 5. Резюме завершающих расчетов общей секреции инсулина (INS) на миллион клеток за час (нг INS/10⁶ клеток/ч) при сравнении роли PAX4 и NeuroD1 в процессе трансдифференцировки, вызванной PDX1

	Образцы	нг/ч/10 ⁶ клеток		Средняя нг/ч/10 ⁶ клеток			
		2 mM	17.5mM			SE 2mM	SE 17.5mM
Контроль	Shalosh GS обогащенный	0	5,355152	0,671145	4,501346	0,271034	0,877392
	Eden Green	1,265156	4,859				
	Muhammad GS обогащенный	0	5,900258				
	Yarn GS обогащенный	0	1,91	0,234193	3,835735	0,207456	0,955189
	Max GS обогащенный	0	0				
	Eden GS обогащенный	0,14	4,99				
	Muhammad Наивный	2,00425	8,190631	1,54505	5,832567	0,305842	1,829411
	Pedro Наивный	1,665405	2,23075				
	Diego Наивный	0,965494	7,07632				
PDX1+NeuroD1	Shalosh GS обогащенный	1,345204	13,19027	2,016969	16,19933	1,042752	2,502689
	Muhammad GS обогащенный	0,310173	14,16339				
	Eden Green	0	12,825				
	Yarn GS обогащенный	1,136	21,7188	1,926396	18,43701	1,387931	3,003895
	Max GS обогащенный	0	16,864				
	Eden GS обогащенный	8,767	31,86				
	Muhammad Наивный	0	17,52215	2,198114	11,72398	1,841633	3,875939
	Pedro Наивный	5,856674	13,28074				
	Diego Наивный	0,737667	4,369036				
	Shalosh обогащенный	5,984453	7,723947	3,954761	14,31825	0,917087	2,523347
	Yarn GS обогащенный	0,421	5,888				
	Muhammad GS обогащенный	2,468333	18,063				
	Max GS обогащенный	0,52	25,753	3,050957	14,85359	1,22808	3,634948
	Eden GS обогащенный	5,861	16,84				
	Muhammad Наивный	8,187757	14,31595	5,461101	13,42601	1,410137	4,709221
	Pedro Наивный	4,721848	4,860915				
	Diego Наивный	3,473699	21,10115				

Было проведено детальное сравнение между двумя факторами транскрипции поджелудочной железы. Было проведено сравнение смешанных популяций наивных первичных гепатоцитов и популяций гепатоцитов, обогащенных сортировкой для повышения экспрессии GS (обогащенный GS).

На фиг. 24A-24B и 25A-25D представлены табличные данные в виде гистограмм.

Измерения секреции инсулина показали, что нет статистической разницы в трансдифференцировке, вызванной использованием PAX4 или NeuroD1. Этот вывод справедлив как для наивных клеток, так и для обогащенных GS-клеток. Не только средние показатели обогащенных популяций GS и наивных клеток проявляли те же самые тенденции, когда изучались результаты той же культуры, что и Muhammad наивный и Muhammad GS обогащенный, были получены те же результаты (демонстрирующие способность обогащенной GS популяции служить модельной системой для процесса трансдифференцировки).

Предыдущие результаты показали, что популяции, обогащенные GS, имели явное преимущество перед полной культурой гепатоцитов в отношении эффективности трансдифференцировки. Поэтому было удивительно, что обогащенная GS популяция и несортированной популяции Muhammad показали аналогичные результаты (нет статистической значимости). Однако следует отметить, что была разница в числе пассажей обеих популяций. Обогащенная популяция GS была исследована на 19-м, а наивная популяция исследовалась на 7 пассаже. Эти результаты не должны рассматриваться как неспособность обо-

гашенной популяции GS пройти эффективную трансдифференцировку, но поскольку способность обогащенной GS подвергаться трансдифференцировке на высоких пассажах, наивные клетки, возможно, не смогут этого достичь.

Существенных различий в гибели клеток, инкубированных с PAX4, не было, по сравнению с клетками, инкубированными с NeuroD1. Единственная разница, которая была очевидна, заключалась в контрольной группе (необработанной/Ad-Null) по сравнению с обработанными группами (Ad-PAX4/Ad-NeuroD1). Об этом свидетельствуют те же выводы, что и для PAX4 и NeuroD1, независимо от того, изучают ли результаты для общего количества инсулина или нг INS/10⁶ клеток/ч.

Одно различие наблюдалось при расчете эффективности трансдифференцировки (в процентах от положительной трансдифференцировки, полученной при использовании конкретного аденовируса). Для Ad-NeuroD1 эффективность составила 87,5% (7 положительных трансдифференциаций из 8 экспериментов), а для Ad-PAX4 это было 71% (5 положительных трансдифференциаций из 7 экспериментов).

Выводы

Как Ad-PAX4, так и Ad-NeuroD1 поддерживают аналогичную трансдифференцировку гепатоцитов.

Пример 19. Определение оптимального протокола процесса трансдифференциации

Цель

Целью данного исследования было сравнить эффективность трансдифференцировки полной иерархии (протокол 1+1+1), протокол 2+1 и одновременного инфицирования всеми тремя аденовирусами.

Тест-система

Различные протоколы трансдифференцировки были исследованы на трех первичных культурах клеток печени человека Leon, Muhammad и Pedro, выращенных в DMEM 1г/л глюкозе. После того, как вирусные инфицирования клетки выращивали, в среду DMEM 1г/л глюкозы, добавляли 5 нМ экзендина-4, 20 нг/мл EGF и 10 мМ никотинамида.

Дизайн эксперимента

Различные протоколы трансдифференцировки (TD) были рассмотрены в соответствии с приведенной ниже табл. 6. Вкратце, в первый день эксперимента 300000 клеток высевали после вирусного инфицирования на 100-миллиметровой чашке Falcon в соответствии с табл. 6 ниже для протоколов А (ничего), В (2+1) и Е (1-иерархия 1+1+1), Во второй день эксперимента 100 000 клеток высевали на 6 лунок для протокола С (3 фактора одновременно) и 70000 клеток высевали на 6 лунок для протокола D (3 фактора одновременно). На третий день эксперимента клетки подсчитывали и обрабатывали Ad-MafA (протоколы В и Е) и высевали на 3 лунки 6-луночного планшета до конечной концентрации 100000 клеток/лунку.

Таблица 6

	День 1	День 2	День 3	День 6
A	Ничего (1300moi 1300moi)			GSIS*]
B	PDX1 1000moi+ 250moi		MafA 50moi	GSIS j
C		PDX1 1000moi+ NeuroD1 250moi+ ; MafA 50moi		GSIS j
D		PDX1 1000moi+ NeuroD1 250moi+ j MafA 50moi		GSIS l
E	PDX1 (E4) 1000moi	NeuroD1 250moi	MafA 50moi	GSIS l

* GSIS - стимулированная глюкозой секреция инсулина

На шестой день эксперимента клетки подвергали секреторному анализу в присутствии 2 мМ глюкозы (низкая) или 17,5 мМ глюкозы (высокая) (фиг. 26A-26C). Секрецию инсулина измеряли после инкубации клеток в течение 15 мин с использованием 2 мМ глюкозы или 17,5 мМ глюкозы в KRB.

Результаты и анализ

Настоящее исследование направлено на определение оптимального протокола для процесса трансдифференцировки. В традиционном протоколе иерархии (1+1+1) клетки обрабатываются последовательно тремя факторами транскрипции: PDX1 на 1-й день, NeuroD1 на 2-й день и MafA на 3-й день. Стремясь разработать эффективный и более простой протокол, эффективность трансдифференцировки традиционного протокола сравнивалась с протоколом 2+1 и одновременной обработкой со всеми тремя факторами транскрипции.

Записанным анализом для этого исследования была секреция инсулина. Согласно знаниям в этой области все методы обработки должны были представлять аналогичные уровни секреции инсулина, поскольку различия в эффективности должны быть представлены только при созревании клеток, например, как измерено с помощью С-пептидной секреции. Однако в настоящих экспериментах наблюдались неожиданные различия в эффективности трансдифференцировки, что было ясно видно из измерений секреции инсулина (фиг. 26A-26C). Наилучшие результаты были получены в протоколе 2+1. Эти результаты были статистически значимыми, как показано в табл. 5 ниже.

Таблица 7. р-значение (t-тест) для сравнения различных протоколов трансдифференцировки, представленных в табл. 4 выше

	Иерархия:	3 фактора	3 фактора	2+1
2+1	0,06691407	0,04561124	0,017915142	
3 фактора	0,223713506	0,35910095		0,017915142
3 фактора	0,376772188		0,35910095	0,04561124
Иерархия		0,376772188	0,223713506	0,06691407

Р-значение протокола 2+1 протокола и иерархии является значительным, но относительно высоким. Одновременная обработка всеми тремя факторами продемонстрировала наименьшие результаты, хотя были проанализированы две плотности посева (незначительная по сравнению с протоколом иерархии).

Пример 20. Промышленность процесса пролиферации клеток печени от чашки петри к мультипланшетному биореактору XPANSION

Цель

Был разработан биопроцесс в клетках для доклинических применений, который включал два основных этапа: пролиферацию клеток печени с последующей трансдифференцировкой клеток печени в клетки, продуцирующие инсулин. Для лечения пациентов в клинических испытаниях человека предполагается, что потребность в дозе около 1 млрд клеток на пациента будет использоваться для улучшения гипергликемии при сахарном диабете 1 типа. Такой масштаб производства потребует большой площади поверхности культуры, которая не обеспечивает технологическую стратегию обработки клеточной культуры (фиг. 27). Таким образом, целью этого исследования было индустриализировать клеточный процесс клеточной культуры, используя платформу XPANSION (биореакторная система Pall Corporation, США). Материалы и методы

Используемые материалы перечислены ниже:

- i) Биологические материалы: Человеческие взрослые клетки, полученные из печени (первичная культура).
- ii) Среда для роста: Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Life Technologies Cat. 21885-025), дополненная 10% термически инактивированной эмбриональной бычьей сывороткой (FBS; Life Technologies Cat. 10500-064), 1% Penicillin-Streptomycin-Amphotericin B (100X) (Lonza Cat. 17-745E) и 5 нМ эксендина-4 (Sigma-Aldrich Cat. E7144)
- iii) Другие реагенты: Dulbecco's Phosphate Buffered Salts (DPBS; Lonza Cat. 17-512Q) и TrypLE * Select (Life Technologies Cat. 12563-029).
- iv) Поддержка клеточной культуры: CellBIND* CellStack* 2-, 5- & 10- камерный (Corning Cat. COS-3310, COS-3311 & COS-3320), Xpansion 50 планшетный (XP-50) биореактор (Cat. XPAN050000000) и Xpansion 200 планшетный (XP-200) биореактор (Cat. 35 810155).
- v) Набор для извлечения клеток для непрерывной центрифуги Pall (позиция 6100043)
- vi) Контроль центрифуг: Система извлечения клеток в 500 мл центрифужной чаше

Методы следуют за технологической схемой, представленной на фиг. 27. Вкратце, предкультуры были выполнены в виде традиционных культур с несколькими лотками. Клетки использовались в биореакторах Xpansion в пассажах 14 и 15. Используемая биореакторная система представляет собой закрытую систему для снижения риска загрязнения. Культуры с несколькими лотками проводились параллельно с культурой Xpansion в качестве контроля роста клеток с контрольными точками pH: 7,3-7,6 и растворенного кислорода (DO): поддерживается выше 50%. В каждом пассаже целевая плотность посева составляла 4000 клеток/см².

Продолжительность культивирования составляла 7-9 дней при среднем обмене, применяемом каждые 2-4 дня (XP-50: Дни 4, 6 и 8 - XP-200: Дни 4 и 7) для поддержания уровня глюкозы выше 0,5 г/л во всей культуре.

Результаты

Представленные в настоящем документе результаты демонстрируют успешное масштабирование фазы амплификации клеток человека, полученных из печени, от чашек Петри до биореактора Xpansion 200 (Pall Corporation, США).

Рост клеток

Профиль размножения клеток, представленный на фиг. 28, наглядно демонстрирует, что клетки находятся в экспоненциальной фазе роста от первых этапов культуры до конечной культуры биореактора (XP-200). В течение 4-х пассажей клетки были размножены с 2 млн до ~1,8 млрд, что составляет 1000-кратное увеличение биомассы. Поэтому была продемонстрирована возможность крупномасштабного производства первичных клеток печени человека, и была достигнута цель - 1 млрд клеток/пациент и даже около 1,8 млрд клеток/пациент на XP-200.

Пассаж 1 проводили в CellStackIO (CSIO), пассаж 2 проводили в 2×CS10, пассаж 3 проводили в XP50, а проток 4 проводили в XP200.

Сравнение времени удвоения популяции (PDT) показало, что первичные клетки, полученные из печени человека, быстрее пролифелировали в биореакторе Xpansion, чем в традиционной системе с несколькими лотками (фиг. 29). Плотности собранных клеток составляли около 15000 клеток/см² биореактора Xpansion 50 и 14000 клеток/см² в биореакторе Xpansion 200, что составляет -160% от их соответствующих многорядных контролей. Лучшее управление культуральной средой (pH, DO) является основной гипотезой для объяснения этого результата.

Тенденции pH, растворенного кислорода и температурного контроля в величине pH-фактора pH и DO сохранялись в их соответствующих ожидаемых диапазонах (фиг. 30). DO поддерживали до 50% насыщения воздуха на протяжении всего процесса, а pH постепенно снижался с 7,4 до 7,2 в течение последних 2 дней каждой культуры из-за высокого количества клеток в конце процесса. Аналогичные тенденции наблюдались в обеих культурах, демонстрируя хорошую воспроизводимость и масштабируемость.

Микроскопические исследования с использованием микроскопа OviRio Holographi (OviRio Imaging Systems, Брюссель/Бельгия)

Конфлюэнтность и морфология клеток являются ключевыми параметрами для мониторинга процессов клеточной терапии. С этой целью был использован микроскоп, который позволяет наблюдать первые десять планшетов в биореакторе Xpansion.

Изображения микрофотографий, представленные на фиг. 31A-31D, подтверждают гомогенное распределение первичных клеток печени человека на всех планшетах Xpansion. Было определено, что конфлюэнтность клеток составляет около 90% после 9 дней культивирования и оценивается как эквивалентное как с биореактором XP-50, так и с XP-200 (фиг. 31A и 31B). Как на 50-, так и на 200-планшетной шкале конфлюэнтность в системе Xpansion была несколько выше, чем у системы с несколькими лотками. Эти изображения также демонстрируют, что морфология клеток не была изменена в последовательной культуре в системе Xpansion или непрерывным центрифугированием, используемым для извлечения клеток. Контрольные клетки, выращенные с использованием процесса с несколькими лотками, проиллюстрированы на фиг. 31C и 31D.

Данные продемонстрировали, что пролиферация первичных клеток печени человека с использованием биореактора Xpansion, не изменяла свойств трансдифференцировки или секреции инсулина в отношении трансдифференцированных клеток (данные не представлены).

Выводы

Биореакторы были успешно использованы для масштабирования процесса пролиферации клеток печеночного происхождения от взрослого человека. Результаты в настоящем документе демонстрируют, что с использованием процесса, включающего платформу биореактора, клетки могут быть надежно амплифицированы от 1 млн до 1,8 млрд клеток. Этот уровень масштабирования потенциально позволяет выделить 1,8 млрд клеток для введения пациентам во время аутологичной терапии на основе клеток, нацеленной на диабет. Это сравнимо только с 7 млн клеток, полученными с использованием процесса приготовления клеток, например, в чашках Петри (данные не представлены). Важно отметить, что процесс с использованием биореакторов сохранил жизнеспособность клеток, потенциал для трансдифференцировки и профиль секреции инсулина клетки.

Пример 21. Протокол для получения клеток, продуцирующих аутологический инсулин (AIP) для лечения диабетов

Цель

Целью этого исследования было разработать протокол промышленного масштаба для получения аутологичных клеток, продуцирующих инсулин (AIP) из непанкреатических клеток для лечения диабета. С помощью функционального корректирования для мультифункциональных β -клеток, продуцирующих инсулин поджелудочной железы, с новыми функциональными тканями, генерируемыми из собственных органов пациента, клеточная аутологичная терапия может успешно быть нацеленной на лечение диабета пациента.

Протокол, представленный в настоящем документе, использует молекулярный и клеточный подход, предназначенный для превращения клеток, полученных из печени человека, в функциональные клетки, продуцирующие инсулин, посредством трандифференциации, вызванной транскрипционными факторами (фиг. 32). Этот терапевтический подход генерирует клетки, продуцирующие аутологичный инсулин (AIP), для получения в промышленном масштабе, преодолевая нехватку в наличии тканей у доноров.

Обзор протокола

На фиг. 33 представлен обзор предоставленного в настоящем документе протокола, показывающий приблизительное время от биопсии до готового продукта 6 недель, а также приблизительные количества клеток на каждом этапе. На фиг. 34 представлена блок-схема процесса производства клеточного продукта, продуцирующего человеческий инсулин, который может в одном варианте реализации быть аутологичными или аллогенными клетками, продуцирующими инсулин (AIP). Подробности приведены ниже.

Получение ткани печени

Этап 1 на фиг. 34.

Ткань печени получали от взрослых людей. Вся полученная ткань печени была получена при одоб-

рении Хельсинкского комитета медицинского факультета. Соответственно все доноры тканевой ткани подписали информированное согласие, а донорский скрининг и тестирование доноров были выполнены для обеспечения того, чтобы биопсии доноров с клиническими или физическими доказательствами или факторами риска инфекционных или злокачественных заболеваний были исключены из производства клеток, продуцирующих человеческий инсулин.

Биопсии печени были получены в операционной квалифицированными и обученными хирургами. Биопсия размером около 2-4 г ткани печени была взята у пациентов, имеющих право на участие, и транспортировалась при температуре 2-8°C в растворе University of Wisconsin (UW) в стерильном пакете для облегчения GMP.

Культивирование *in vitro*

Этапы 2 и 3 на фиг. 34.

На месте производства биопсию печени обрабатывали как адгезивные клетки. Вкратце, ткань биопсии разрезали на тонкие слайсы и обрабатывали коллагеназой типа I в течение 20 мин при 37°C. Затем клетки неоднократно обрабатывали трипсином для получения изолированных одиночных клеток; начальные эксперименты показали, что примерно $0,5 \times 10^6$ клеток могут быть выделены на грамм биопсии.

Клетки затем размножали *ex vivo* в среде для клеток, дополненной 10% FCS, эксендином-4 и смесью антибиотиков (пенициллин, стрептомицин и амфотерицин В). Клетки пассировали при 37°C в увлажненной атмосфере с содержанием 5% CO₂/95% воздуха (до 20 пассажей) с использованием предварительно обработанных фибронектином чашек для культивирования тканей. Среда ежедневно менялась в течение первых трех дней после нанесения биопсии, чтобы удалить неадгезивные клетки, а затем два раза в неделю после первого пассажа клеток. Во время первого пассажа клеток по меньшей мере одна аликвота клеток была криоконсервирована (см. ниже, необязательный этап на фиг. 34).

Клетки пассировали 1:3 с использованием трипсина до тех пор, пока не было достигнуто требуемое количество клеток (около 1-3 млрд клеток в течение примерно 4-7 недель). Размножение клеток включало использование многопланшетных систем, как описано в примере 20 и проиллюстрированное на фиг. 33, примерно на 4-й и 7-й неделях (Этап 3 на фиг. 34).

Клетки печени человека, которые прикреплялись к планшетам тканевой культуры, подвергались процессу перехода от эпителиального к мезенхимальному (EMT) и эффективно пролиферировали. Близко к 100% из этих EMT-подобных клеток отображали известные мезенхимальные характеристики (CD29, CD105, CD90 и CD73), но также экспрессировали маркеры печени взрослого, такие как альбумин и ААТ. Клетки не экспрессируют гепатобласт и маркеры "стеблевости". В табл. 8 ниже приведены результаты анализа этих ЭМТ-подобных культивируемых клеток печени для присутствия мезенхимальных, гемопоэтических и печеночных маркеров на культивируемых клетках печени до трансдифференцировки (TD).

Таблица 8

До трансдифференцировки	Спецификация
Мезенхимальные маркеры CD105, CD73, CD90, CD44	>95%
Гемопоэтические маркеры	<2%
Печеночные маркеры Альбумин ААТ	>80% >60%

Проценты, показанные в табл. 8, имеют низкий номер пассажа.

Криоконсервация клеток 1 пассажа (фиг. 34)

Вкратце, клетки пассажа 1 были криоконсервированы в DMEM, дополненной 10% FBS и 10% ДМСО в 2 мл криовиализа (минимум $0,5 \times 10^6$ клеток). Рекомендуется криоконсервировать клетки как можно раньше. Замороженные клетки сначала хранили при -70°C в течение 24-48 ч, а затем переносили в жидкость N для длительного хранения.

Размораживание криоконсервированных клеток (фиг. 34)

Криоконсервированные клетки размораживали с использованием хорошо известных методов в данной области. Быстро флаконы удаляли из жидкого N₂ и оставляли медленно оттаивать до тех пор, пока стороны не были разморожены, но центр все еще был заморожен. Клетки осторожно переносили в планшеты для культивирования тканей. После того, как клетки прикреплены к планшету, проводилась обработка *in vitro* (этапы 2 и 3 на фиг. 34) для размножения клеточной культуры.

Выбор предрасположенных клеток печени (фиг. 34)

Опция на этапе 3 на фиг. 34 предназначена для сортировки первичных печеных клеток, чтобы обогатить клетки, предрасположенные к трансдифференцировке. Например, клетки могут быть отсортированы для активации элемента ответа на глютаминсинтетазу (GSRE) (обогащенные GS клетки), как описано выше в примерах 10-15. Альтернативно, клетки могут быть обогащены для того, чтобы иметь активный сигнальный путь Wnt, где они предрасположены к ответу на сигнализацию Wnt, как описано в настоящем документе выше в примере 17. Кроме того, клетки могут быть обогащены путем мониторинга увеличения или уменьшения экспрессии определенных генов, например, уменьшения экспрессии ABCB1, ITGA4, ABCB4 или PRNP или любой их комбинации или увеличения экспрессии HOMER 1, LAMP3, BMPR2, ITGA6, DCBLD2, THBS1 или VAMP4 или любой их комбинации, как описано выше в примере

16. Клеточную популяцию можно было обработать литием, как описано в примере 23, с целью усиления предрасположенности клеток к трансдифференцировке. После обогащения для повторной дифференциации клетки используют на этапе 4 фиг. 34. Трансдифференцировка (этап 4 на фиг. 34) Для трансдифференцированных клеток клетки выращивали в трансдифференцировочной среде в течение дополнительных 5 дней. Трансдифференцирующая среда представляет собой минимальную основную среду Дульбекко (1 г/л глюкозы), дополненную 10% FCS, эксендином-4, никотинамидом, EGF и смесью антибиотиков (пенициллин, стрептомицин и амфотерицин В).

Для трансдифференцировки клеток использовали два разных протокола. Клетки трансдифференцировались с использованием последовательного протокола 1-иерархии (1+1+1) или с использованием протокола 2+1. Примеры каждого метода приведены ниже.

Последовательный протокол иерархии (1+1+1)

Затем размноженные *ex vivo* клетки печени последовательно инфицировали 3 рекомбинантными репликационно-дефицитными аденовирусными векторами серотипа-5, каждый из которых несет человеческий ген одного из факторов транскрипции поджелудочной железы (пТФ), PDX-1, Neuro-D или MafA, под контролем цитомегаловируса промотор CMV. 3 человеческих пТФ гена были встроены в одну и ту же основу векторов FGAD под контролем промотора CMV. CMV-промотор представляет собой гетерологичный промотор, который обычно выключается через 3-4 недели после инфицирования. Тем не менее краткосрочная экспрессия эктопических генов пТФ была достаточной для индукции эндогенных человеческих гомологов.

Векторы FGAD были выбраны в качестве оптимального инструмента доставки генов для индукции перенаправления развития. Приведенные выше примеры продемонстрировали, что введение этих эктопических генов в первичные взрослые человеческие клетки печени действует как краткосрочные триггеры для необратимого процесса перепрограммирования взрослых клеток. С другой стороны, рекомбинантные аденовирусы были относительно безопасны, поскольку они не интегрируются в геном хозяина и, следовательно, не нарушают последовательность генетической информации хозяев. PDX-1 индуцирует эпигенетические изменения в хроматической структуре, что позволяет активировать, иными словами, молчащую генетическую информацию, одновременно отключая репертуар экспрессированных генов хозяина (сравните результаты табл. 8 и 9).

Процесс трансдифференцировки проводили с использованием замкнутой автоматической биореакторной системы Xpansion (Pall Life Sciences) в соответствии с последовательностью этапов, представленных на фиг. 33. Биореакторная система использовалась для культивирования клеточных культур в условиях, подходящих для высоких концентраций клеток. Система биореактора была сконструирована из двух основных систем: системы управления и самого биореактора (сосуда и аксессуаров).

Параметры процесса наблюдались и контролировались консолью управления, которая включала разъемы для зондов, двигателей и насосов, контуров управления для растворенного кислорода (DO), pH, системы контроля газов и места в инкубаторе для контроля температуры. Управляемые параметры процесса (такие как температура, pH, DO и т.д.) могут отображаться на интерфейсе оператора и контролироваться назначенным контроллером.

Процедура роста клеточной культуры в биореакторах

В стерильный биореактор XP-200 высевали $250 \pm 50 \times 10^6$ клеток. Ростовую среду в биореакторе поддерживали при следующих условиях: 37°C, 70% растворенного кислорода (DO) и pH 7,3. Отфильтрованные газы (воздух, CO₂, N и O₂) поставлялись, как определено системой управления, чтобы сохранить значение DO на уровне 70% и значение pH 7,3. Среда роста изменялась, когда концентрация глюкозы в среде снижалась ниже 500 мг/л. Среду закачивали из загрузочного контейнера в биореактор, используя стерильную силиконовую трубку. Все соединения труб были выполнены с помощью трубчатого сварщика, обеспечивающего стерильные соединители. Образец среды для выращивания брали каждые 1-2 дня для определения концентрации глюкозы, лактата, глутамина, глутамата и аммония. Скорость потребления глюкозы и скорость образования лактата клеточной культуры позволили измерить скорость роста клеток. Эти параметры были использованы для определения времени сбора на основе накопленных экспериментальных данных.

Сбор клеток из биореактора

Процесс сбора клеток начинался в конце фазы роста (8-16 дней). Культуру собирали в ламинарном участке класса 100 следующим образом:

Судно с биореактором опорожняли с помощью гравитации через трубу в контейнер для отходов. Затем резервуар для биореактора был пополнен 22 л предварительно нагретым PBS (37°C). PBS сливали через трубу давлением или силой тяжести в бутылку для отходов. Процедуру промывки повторяли дважды.

Для высвобождения клеток с поверхности к сосуду биореактора добавляли 22 л предварительно нагретого до 37°C трипсина-ЭДТА (трипсин 0,25%, ЭДТА 1 мМ). 500 мл FBS добавляли в сосуд для биореакторов, и клеточную суспензию собирали в стерильный контейнер. Суспензию клеток центрифугировали (600 об/мин, 10 мин, 4°C) и повторно суспендировали в культуральной среде.

Иерархия (1+1+1)

Этапы вирусного инфицирования

Эктопические трансгены последовательно вводили рекомбинантными аденовирусами в течение трех последовательных дней. Последовательное введение эктопических генов было документировано как для повышения эффективности трансдифференцировки, так и для увеличения созревания клеток, в частности, по линии и функции β -cell.

Процедура трансдифференцировки проводилась прибл. 7 дней, в конце которого клетки промывают для удаления не включенных рекомбинантных аденовирусов.

Кратко:

В первый день ресуспендированные клетки инфицировали аденовирусным вектором PDX-1 с использованием MOI 1000. Клетки затем высевали на чашки для культивирования, инкубировали в течение ночи в увлажненном 37°C инкубаторе, снабженном 5% СОС.

На 2-й день клетки отделяли от культуральных чашек с использованием трипсина и ресуспендировали. Ресуспендированные клетки инфицировали аденовирусным вектором NeuroD1 с использованием MOI 250. Клетки, которые затем высевают на чашки с культурой, инкубируют в течение ночи в увлажненном 37°C инкубаторе, снабженном 5% СОС.

На третий день клетки отделяли от культуральных чашек с использованием трипсина и ресуспендировали. Ресуспендированные клетки инфицировали аденовирусным вектором MafA с использованием MOI 50. Клетки затем высевали на чашки для культивирования, инкубировали в течение трех дней в увлажненном 37°C инкубаторе, снабженном 5% СОС.

Затем клетки извлекали и анализировали на маркеры и секрецию обработанного инсулина, регулируемой глюкозой. Контрольные клетки включали те, которые распространялись и инкубировались по тому же протоколу, но без добавления аденовируса.

Материалы и экспериментальные методы

Анализ FACS мембранных маркеров ---- клеток окрашивали моноклональными антителами следующим образом: 400 000-600 000 клеток суспендировали в 0,1 мл проточного цитометрического буфера в пробирке объемом 5 мл и инкубировали в течение 15 мин при комнатной температуре (RT) в темноте с каждым из следующих моноклональных антител (MAbs):

Ab	Полное имя антитела	Компания	Cat. No.
	BD Pharmingen™ PE Mouse anti-PDX-1	BD	562161
PDX1	Human/Mouse PDX-1/IPF1 Phycoerythrin	R&D	IC2419P
	Human/Mouse PDX-1/IPF1 Allophycocyanin	R&D	IC2419A
NEUROD1	BD Pharmingen™ PE Mouse Anti-NeuroD1	BD	S63001
	BD Pharmingen™ Alexa Fluor® 647 Mouse	BD	563566
MAFA	Anti-KLRG1 (MAFA) PE Vio770, human	Miltenyi	130-103-
	Anti-KLRG1 (MAFA)-APC-Vio770, human	Miltenyi	138-103-
Vimentin	BD Pharmingen™ PE Mouse Anti-Human	BD	562337
	BD Pharmingen™ Alexa Fluor® 488 Mouse	BD	582338
	BD Horizon™ 8V421 Mouse Anti-E-Cadherin	BD	554186
	BD Pharmingen™ PE Mouse anti-E-Cadherin	BD	562526
	BD Pharmingen™ Alexa Fluor® 488 Mouse	BD	563570
E-	BD Pharmingen™ PerCP-Cy™5.5 Mouse Anti-	BD	563573
	BD Pharmingen™ Alexa Fluor® 647 Mouse	BD	583571
	BD Pharmingen™ PE Mouse Anti-Human	BD	S62870
	BD Horizon™ PE-CF594 Mouse Anti- Human	BD	563572

Сбор AIP-клеток (этап 5 на фиг. 34). Затем клетки дважды промывали буфером проточной цитометрии, ресуспендировали и анализировали с помощью проточной цитометрии с использованием проточного цитометра FC-500 (Beckman Coulter). Отрицательные контрольные образцы были приготовлены с соответствующими молекулами изотипической флуоресценции.

Упаковка и выпуск

В конце изготовления клетки AIP будут упаковываться для транспортировки и выпуска на месте производства. Планируется отправить AIP-клетки в 2-8°C в больницы.

Результаты протокола Иерархии (1+1+1)

Аденовирусное инфицирование клеток приводило к временной экспрессии трансгенов, которая вызывает постоянную индукцию эндогенных генов, что приводит к стабильной трансдифференцировке к клеткам AIP (данные не представлены). В результате не было никаких модификаций или вставок вирусной ДНК в конечный продукт.

Анализ собранных AIP-клеток (этап 6 на фиг. 34)

Анализ трансдифференцированных клеток печени (AIP-клеток) на присутствие мезенхимальных, гемопоэтических и печеночных маркеров представлен в табл. 7. Отрицательные маркеры включают гемопоэтические маркеры.

Таблица 9

% CD105	% CD73	% CD90	% CD44	% Негативные маркеры
99,32	99,85	99,55	99,77	0,93
98,75	99,71	99,67	99,70	0,73
97,89	98,71	99,80	99,77	0,94
96,77	98,60	99,50	99,64	0,58

Несмотря на то, что вариабельность отмечалась у разных образцов пациентов в биореакторах Xrap-sion, во всех клетках плотность клеток собранных клеток значительно возростала по сравнению с исходной культурой (фиг. 35).

Очищенный продукт AIP-клеток анализировали для идентификации экспрессии многочисленных маркеров. Идентичность была оценена с помощью ОТ-ПЦР и FACS. Результаты, представленные в табл. 10 и 11 ниже, демонстрируют кратность увеличения эндогенной экспрессии генов поджелудочной железы В-клеток, включая PDX-1, NeuroD, MafA, Pax4, Nkx6.1 и инсулин.

Таблица 10

ОТ-ПЦР	Кратность увеличения (Контроль над)
Pdx1	$>10^5$
NeuroD	$>10^4$
MafA	$>10^3$
инсулин	$>10^1$

Таблица 11

ОТ-ПЦР	Кратность увеличения (Контроль над)
глюкагон	$>10^2$
соматостатин	$>10^1$
Nkx6.1	$>10^1$
Pax4	$>10^1$

Гистограммы, представленные на фиг. 36А и 36В, демонстрируют типичные результаты, полученные после использования протокола иерархии. Приведено сравнение трансдифференцированных клеток печени (AIP-клеток) с клетками поджелудочной железы и контрольной популяции нетрансдифференцированных клеток печени, где можно видеть, что клетки AIP демонстрируют значительное увеличение маркеров поджелудочной железы по сравнению с контролем.

Результат дополнительной характеристики клеток для фенотипа функции печени и панкреатита клеток AIP представлен в табл. 12 ниже. Значительное снижение печеночных маркеров в клетках PDX-1 в сочетании с увеличением маркеров поджелудочной железы указывает на успешное превращение клеток печени в клетки, имеющие фенотип и функцию β -клеток поджелудочной железы.

Таблица 12. Спецификация продукта клеток AIP, идентифицированная FACS

После транс- дифференциации	Характеристики
Печеночные маркеры в клетках Pdx-1++	<1%
Каждый эктопический пТФ	>80%
Инсулин/с-пептид	>10%
NKX6.1	>10%
глюкагон	>10%

Анализ мертвых клеток в популяции собранных клеток AIP показал, что менее 20% клеток были мертвы (данные не представлены).

Собранный продукт AIP-клеток также анализировали по функции секреции инсулина. На фиг. 37 проиллюстрирована потенциальная продуктивность AIP клеток (секреция инсулина, регулируемая глюкозой, измеренная с использованием ELISA). Испытаемый продукт клетки AIP представляет собой трансдифференцированную популяцию клеток, которая была размножена в биореакторе XP-200. Секрецию инсулина измеряли GSIS (секреция инсулина, стимулированной глюкозой, при низких (2 мМ) и высоких (17,5 мМ) концентрациях глюкозы с KRB+0,1% BSA RIA-grade или рекомбинантной BSA). Результаты представлены как нг инсулина на миллион клеток в час и демонстрируют значительное увеличение ответа клеток AIP.

2+1 Протокол трансдифференцировки (TD)

На фиг. 38 представлены "2+1" TD-протоколы с использованием систем биореактора Xpansion, а также контроль процесса. Результаты использования протокола "2+1" TD в сочетании с многосистемным биореактором продемонстрировали осуществимость этого протокола, который эффективно продуцировал клетки продукта AIP. Первое инфицирование было выполнено на 3-й день с использованием либо аденовирусного вектора, содержащего нуклеиновую кислоту, которая кодировала полипептиды PDX-1 и NeuroD1 на двух аденовирусных векторах - одна из которых содержала нуклеиновую кислоту, кодирующую PDX-1, а другая, содержащую нуклеиновую кислоту, кодирующую NeuroD1. MOI для PDX-1 как 1:1000 и для NeuroD1 составлял 1:250. Затем клетки инкубировали в течение 3 дней и второе инфицирование проводили на 6-й день с использованием аденовирусного вектора, содержащего нуклеиновую кислоту, кодирующую MafA (1:50 MOI). Клетки собирали через два дня на 8-й день и проверяли на маркеры контроля качества, аналогичные описанным выше, когда использовался протокол иерархии (1+1+1).

Наблюдение культур клеток во время второго инфицирования (6-й день) продемонстрировало сходные показатели конfluентности, не зависящие от используемых условий (фиг. 39A-39D и 40A-40B). Во время окончательного сбора клеток, обработанных в условиях CTL (контроль), была продемонстрирована несколько более высокая конfluентность клеток, чем в других условиях (фиг. 41A-41D). Различия в плотности клеток объяснялись главным образом разной плотностью посева, а урожайность клеток и смертность в течение последующих дней после инфицирования.

Содержание инсулина в собранных клетках анализировалось, и результаты, представленные на фиг. 42, демонстрируют повышенное содержание инсулина (микроинтернациональные единицы/миллион клеток) для клеток, трансдифференцированных во всех трех проверенных протоколах 2+1, по сравнению с контрольными, которые не были обработаны (не инфицированными вирусными векторами, включающими нуклеиновые кислоты, кодирующие PDX-1, NeuroD1 и MafA). Условие CTL процесса показало ожидаемую тенденцию, дающую значительно более высокое содержание инсулина, чем необработанные клетки (-2,5 раза выше). Условие CTL Xpansion также представляло ожидаемую тенденцию, при которой обработанные клетки демонстрировали значительно более высокое содержание инсулина, чем необработанные клетки (на -1,7 раза выше). Клетки, трансдифференцированные в системе Xpansion 10, демонстрировали сходное содержание инсулина, чем обработанные клетки в условиях СТр Xpansion (на -1,7 х выше, чем необработанный контроль). Использование протокола трансдифференцировки "2+1" было эффективным (сокращенное количество этапов и возможностей для потери клеток) при производстве AIP-клеточного продукта со значительно более высоким содержанием инсулина, чем необработанные клетки печени.

Анализ чистоты

Анализ чистоты были разработаны для уверенности в том, что более 90% клеток на этапах размножения и трансдифференцировки имели фенотип мезенхимальной стволовой клетки (MSC) (см. выше в методах). Эти анализы чистоты использовали независимо от протокола, используемого для трансдифференцировки. Культивируемые MSC должны окрашиваться положительно для CD73, CD90, CD105 и CD44. Кроме того, MSC должны быть отрицательными для молекул поверхностей CD45, CD34, CD14 или CD11b или CD79 # и HLA-DR. Предыдущие результаты (фиг. 44A и 44B) показали, что маркеры MSC стабильны с течением времени и во время трансдифференцировки клеток печени. Результаты, демонстрирующие MSC-подобный фенотип AIP-клеток, представлены в табл. 6 и 7. Для анализа этих параметров использовались как проточная цитометрия, так и иммунофлуоресцентные анализы.

Пример 22. Анализ методов обработки

Цель

Целью данного исследования было проверить, что различные методы обработки не влияют на способность клеток печени трансдуцироваться аденовирусами.

Методы

Вкратце, клетки печени инфицировали Ad.CMV.GFP и экспрессию GFP измеряли через 96 ч. Клетки печени трансдуцировали с 10, 100 и 500 moi вируса Ad5.CMV.GFP или оставляли без лечения. Через 96 ч экспрессию GFP измеряли с помощью флуоресцентной микроскопии (фиг. 45A, 46A) и FACS (фиг. 45B-45C, 46B-46C).

Результаты

На фиг. 45A-45C проиллюстрирована эффективность трансдукции клеток BPO01, полученных в результате обработки печени с помощью коллагеназ Serva и Worthington. Хотя процент трансдуцированных клеток был схожим, печень, обработанная коллагеназой Serva, продуцировала больше GFP, чем печень, обработанная коллагеназой Worthington, как проиллюстрировано интенсивностью флуоресценции GFP (фиг. 45B и 45C). Аналогично, эффективность трансдукции клеток TS001 не влияла на использование коллагеназы Serva (фиг. 46A-46C).

Пример 23. Обработка WNT до трансдифференцировки улучшает компетентность трансдифференцировки

Задача

Целью данного исследования было улучшение трансдифференцировочной компетентности в попу-

ляции клеток.

Как описано выше в примере 17, активная сигнализация WNT характеризует предварительно распределенную популяцию eGFP⁺. Хотя описанный выше эксперимент показал, что индукция передачи сигналов WNT повышает эффективность трансдифференцировки при применении вместе с факторами транскрипции для трансдифференцировки, он не показал, связана ли уже существовавшая сигнализация WNT в eGFP⁺ с их повышенной компетенцией, чтобы перенаправить свою дифференциационную судьбу.

Методы

Для того, чтобы проверить, обладают ли клетки WNT сигнализацией с компетенцией для трансдифференцировки, клетки eGFP⁺ обрабатывали 10 мМ литием (Li) в течение 48 часов до добавления факторов трансдифференцировки. Затем литий удаляли из среды при добавлении факторов транскрипции поджелудочной железы.

Результаты

После трансдифференцировки клетки, которые были предварительно обработаны Li, продемонстрировали увеличение секреции инсулина (фиг. 48A), а также экспрессию генов поджелудочной железы (фиг. 48B), что указывает на то, что сигнализация WNT является "встроенным" сигнальным путем, позволяющим клеткам подвергаться эффективной трансдифференцировке. Интересно, что эндогенные уровни экспрессии PDX-1 не были усилены предварительной обработкой Li (фиг. 48C), что указывает на то, что поздний сигнал WNT необходим для стабильного панкреатического репертуара.

Хотя некоторые признаки, раскрытые в настоящем документе, были проиллюстрированы и описаны в настоящем документе, многие модификации, замены, изменения и эквиваленты будут теперь встречаться обычным специалистам в данной области техники. Поэтому следует понимать, что прилагаемая формула изобретения охватывает все такие модификации и изменения, которые относятся к истинной сущности, раскрытой в настоящем документе

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения популяции клеток человека, продуцирующих человеческий инсулин, причем способ включает этапы:

- (a) получение ткани взрослого человека;
- (b) обработка указанной ткани для извлечения первичных клеток взрослого человека;
- (c) культивирование указанных первичных клеток взрослого человека;
- (d) трансдифференцировка указанных культивированных клеток, где указанная трансдифференцировка содержит:

(1) инфицирование указанных культивированных клеток по меньшей мере одним вектором экспрессии,

(i) причем указанный по меньшей мере один вектор экспрессии содержит аденовирусный вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид PDX-1, и аденовирусный вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид второго панкреатического фактора транскрипции, причем указанное инфицирование указанными аденовирусными векторами происходит в одно и то же время, или

(ii) причем указанный по меньшей мере один вектор экспрессии содержит аденовирусный вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид PDX-1 человека и полипептид второго панкреатического фактора транскрипции; и

(2) инфицирование указанных культивированных инфицированных клеток, полученных на этапе (1), аденовирусным вектором, содержащим нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид MafA; и

(e) сбор указанных трансдифференцированных клеток;

таким образом позволяя производить указанную популяцию клеток, продуцирующих человеческий инсулин, причем указанные клетки взрослого человека не проходят стадию, на которой указанные клетки имеют эмбриональные маркеры, причем указанные клетки, продуцирующие человеческий инсулин, обеспечивают непродолжительную эктопическую экспрессию факторов транскрипции PDX-1, NeuroD1 и MafA после инфицирования; экспрессию и продуцирование глюкагона, повышенное содержание инсулина; повышенную секрецию инсулина, регулируемую глюкозой; повышенную секрецию С-пептида; или повышенное содержание эндогенного фактора транскрипции Nkx6.1; или любую их комбинацию, по сравнению с контрольными нетрансдифференцированными первичными клетками взрослого человека, и причем указанные клетки, продуцирующие человеческий инсулин, не экспрессируют эмбриональные маркеры.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что указанные клетки культивируют в биореакторе.

3. Способ по любому из пп.1, 2, отличающийся тем, что на этапе (a) указанная ткань человека содержит:

а) ткань, полученную от субъекта, страдающего нарушением со стороны панкреатической железы или инсулинзависимым диабетом; или

б) ткань печени, жировую ткань, костный мозг, кожу, плаценту, пуповину, вартонов студень или пуповинную кровь;

или любую их комбинацию.

4. Способ по любому из пп.1-3, отличающийся тем, что первичные клетки человека содержат эндотелиальные клетки, эпителиальные клетки, фибробласты, клетки печени, клетки костного мозга, мышечные клетки, клетки селезенки, почечные клетки, клетки крови, клетки кожи, клетки поджелудочной железы, перикардиальные клетки печени, неопанкреатические клетки, неопанкреатические бета клетки, гепатоциты, гемопоэтические стволовые клетки, печеночные стволовые клетки, мезенхимальные стволовые клетки, мезенхимальные стволовые клетки, полученные из жировой ткани, плацентарные стволовые клетки, нейронные стволовые клетки или эмбриональные клетки печени.

5. Способ по любому из пп.2-4, отличающийся тем, что указанная биореакторная система содержит один биореактор или несколько биореакторов.

6. Способ по любому из пп.2-5, где указанный биореактор включает одноразовый биореактор, многократный биореактор, биореактор с замкнутой системой или биореактор с открытой системой или любую их комбинацию.

7. Способ по любому из пп.2-6, отличающийся тем, что этап (d) осуществляют в системе биореакторов.

8. Способ по любому из пп.1-7, отличающийся тем, что указанный второй панкреатический фактор транскрипции выбран из NeuroD1 и Pax4.

9. Способ по любому из пп.1-8, дополнительно включающий этап обогащения указанных первичных клеток взрослого человека для клеток, предрасположенных к трансдифференцировке, причем указанный этап обогащения выполняют до проведения этапа указанной трансдифференцировки или параллельно с указанной трансдифференцировкой.

10. Способ по п.9, отличающийся тем, что указанные предрасположенные клетки включают:

(a) активный Wnt-сигнальный путь;

(b) способность активации элемента ответа глутаминсинтетазы (GSRE);

(c) увеличенную экспрессию HOMER1 (homer scaffolding protein 1), LAMP3 (lysosomal associated membrane protein 3), ITGA6 (integrin subunit alpha 6), DCBLD2 (Discodin, CUB and LCCL Domain Containing 2), THBS1 (Thrombospondin 1), VAMP4 (Vesicle Associated Membrane Protein 4) или BMPR2 (bone morphogenetic protein receptor type 2) или любой их комбинации, когда указанные клетки содержат клетки печени;

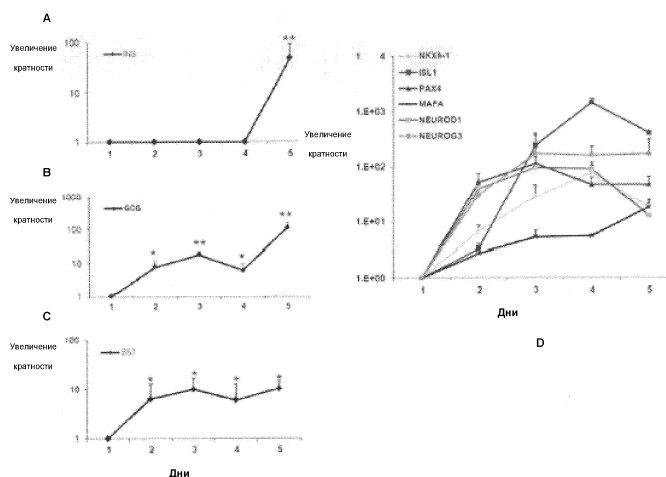
(d) уменьшенную экспрессию ABCB1 (ATP binding cassette subfamily B member 1), ITGA4 (integrin subunit alpha 4), ABCB4 (ATP binding cassette subfamily B member 4) или PRNP (prion protein) или любой их комбинации, когда указанные клетки содержат клетки печени; или любую их комбинацию.

11. Способ по любому из пп.1-10, дополнительно включающий этап усиления активации Wnt-сигнального пути в указанных первичных клетках.

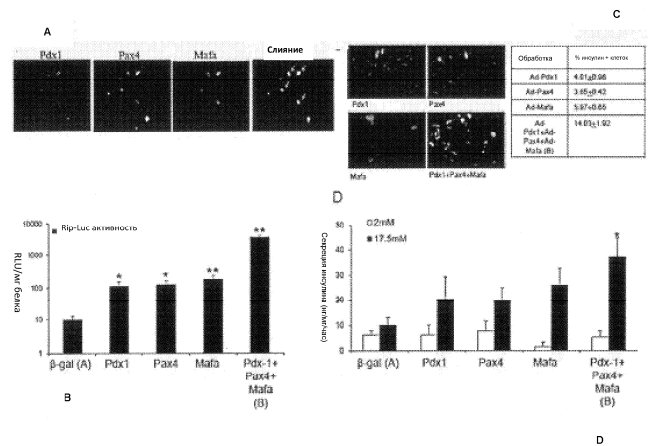
12. Способ по п.11, отличающийся тем, что указанная индукция включает инкубацию указанных первичных клеток взрослого человека с литием.

13. Способ по любому из пп.1-12, отличающийся тем, что заданное количество клеток составляет примерно 1-2 млрд клеток.

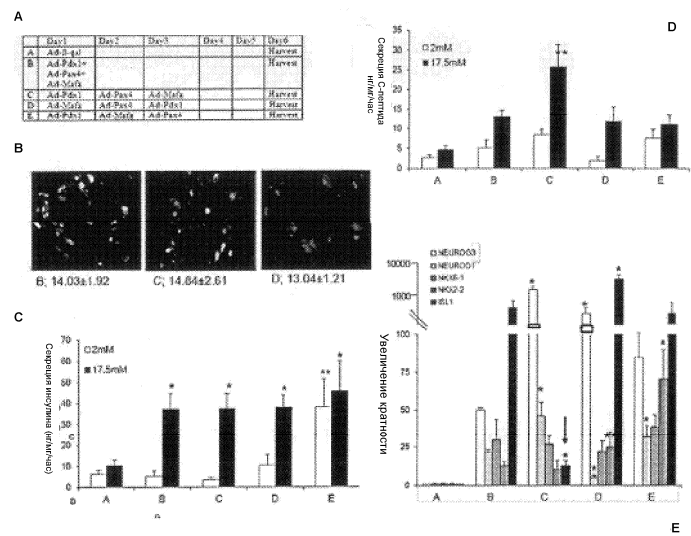
14. Способ по любому из пп.1-13, отличающийся тем, что по меньшей мере 90% указанной популяции культивированных клеток экспрессируют CD73, CD90, CD105 или CD44 или любую их комбинацию до этапа (d).



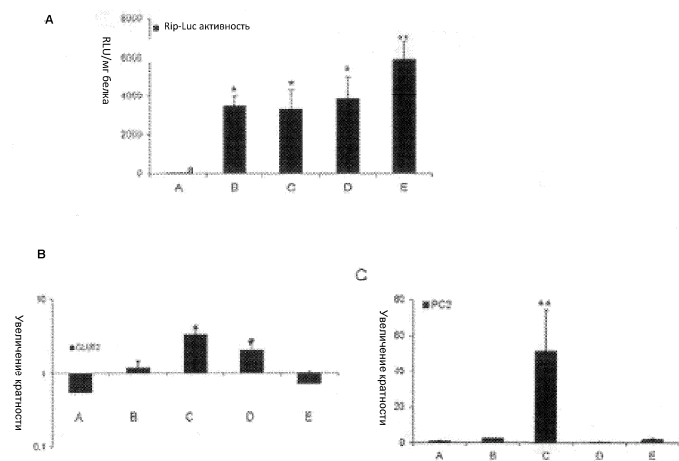
Фиг. 1A-D



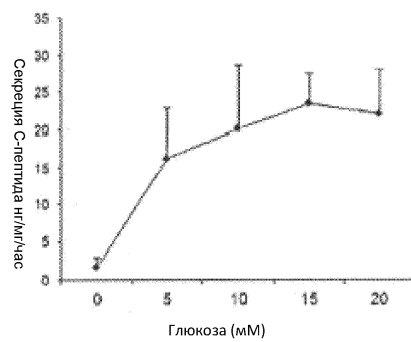
Фиг. 2A-D



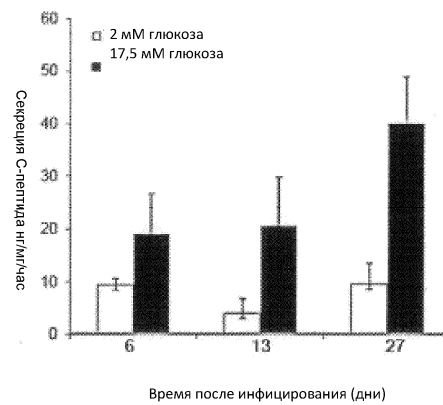
Фиг. 3A-E



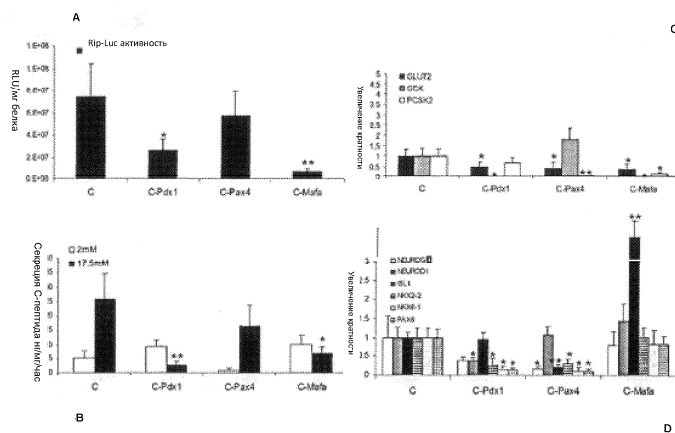
Фиг. 4A-C



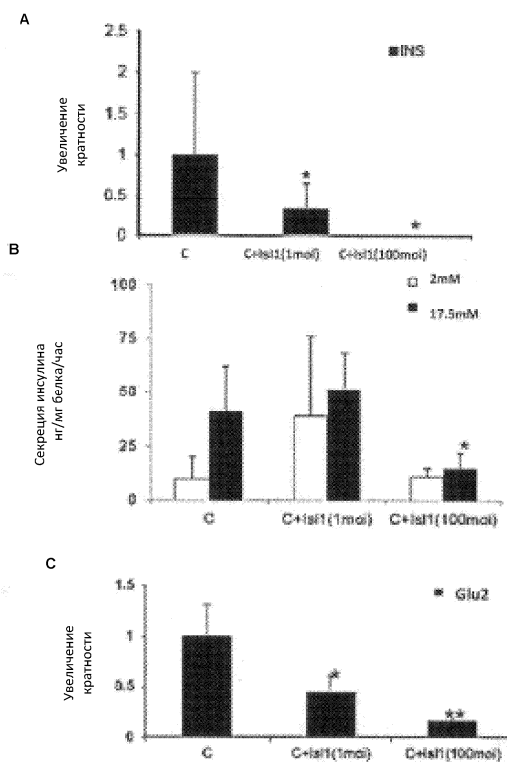
Фиг. 5А



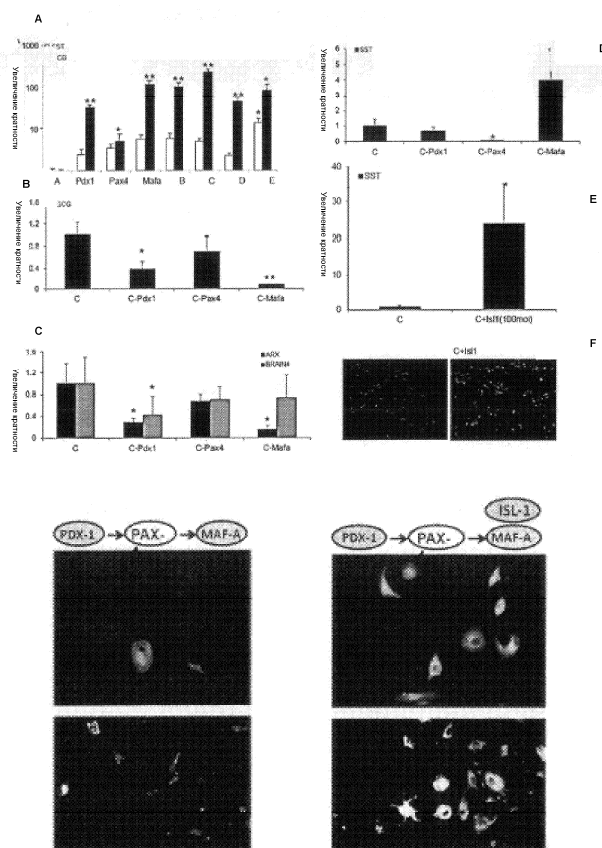
Фиг. 4А



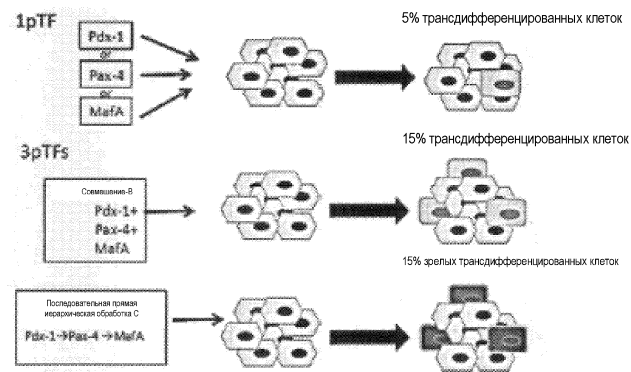
Фиг. 6А-Д



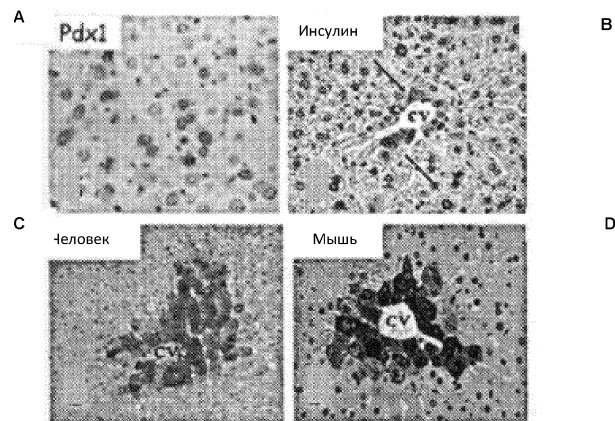
Фиг. 7А-С



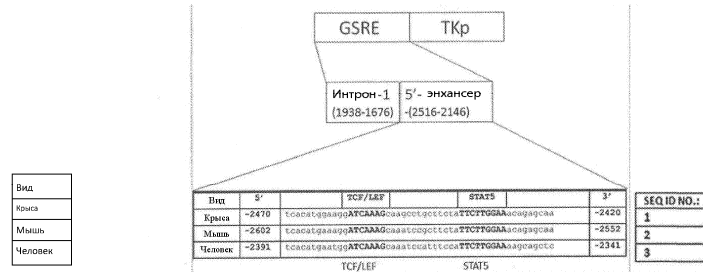
Фиг. 8А-Г



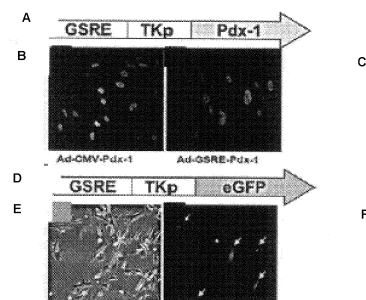
ФИГ. 9



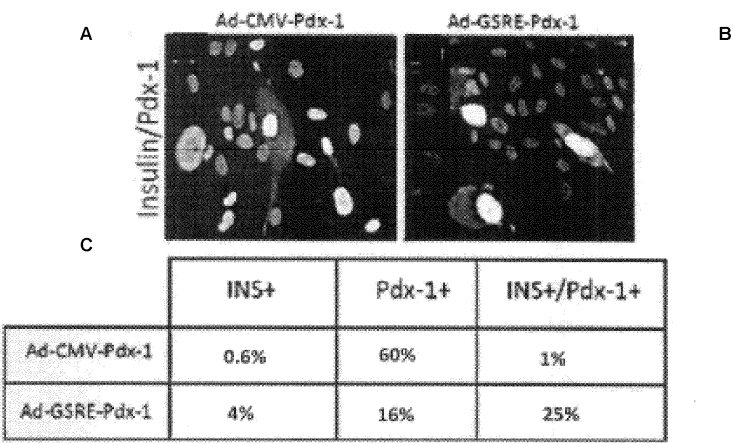
ФИГ. 10А-D



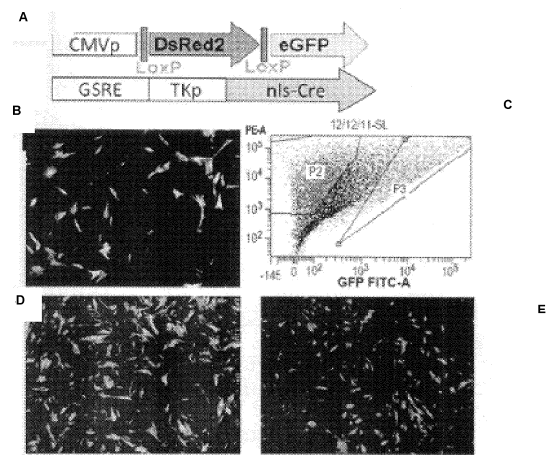
ФИГ. 11



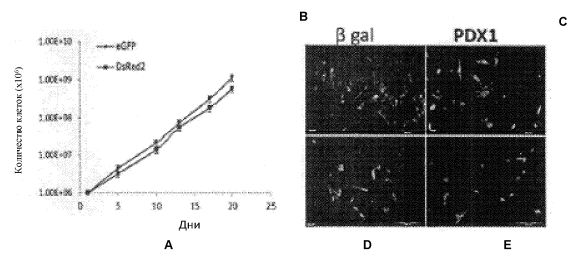
Фиг. 12А-Е



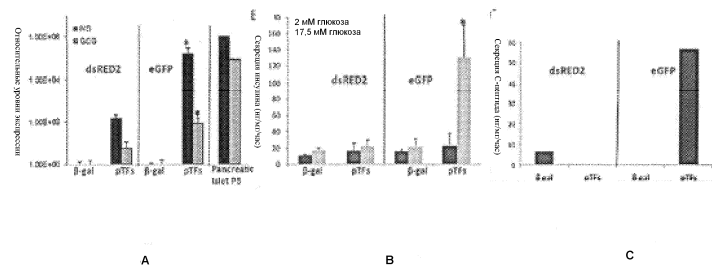
Фиг. 13A-C



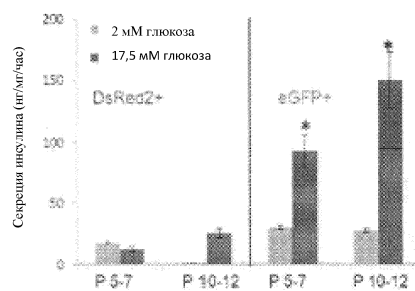
Фиг. 14A-E



Фиг. 15A-E



Фиг. 16A-C

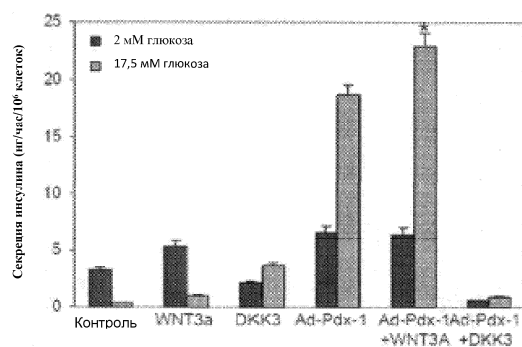


Фиг. 17

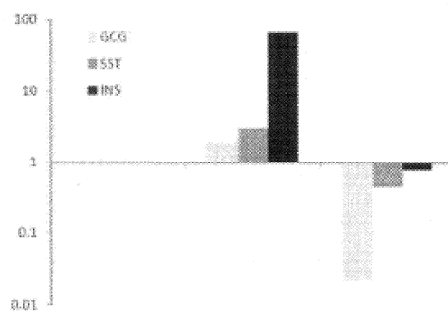
Количество дифференцированных генов



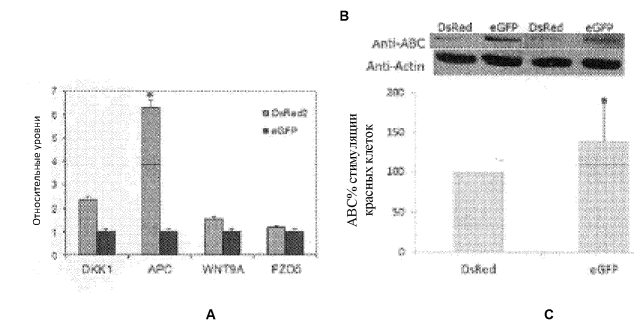
Фиг. 18



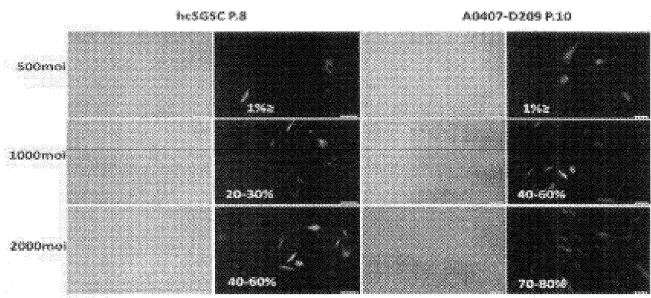
Фиг. 19



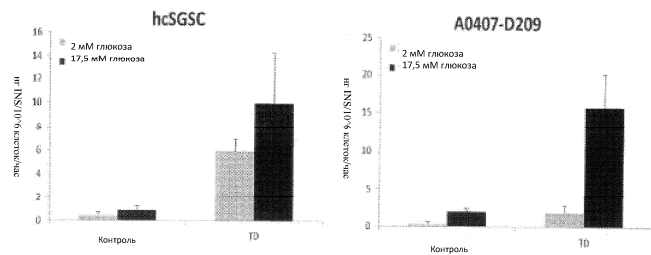
Фиг. 20



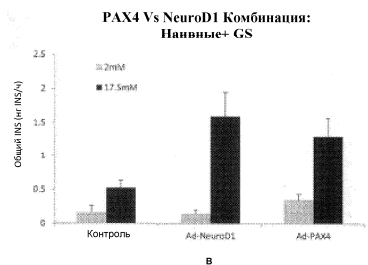
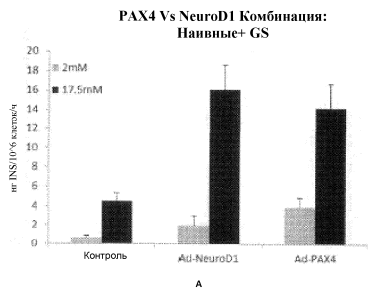
Фиг. 21A-C



Фиг. 22

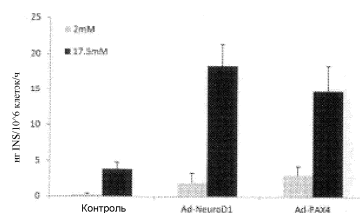


Фиг. 23



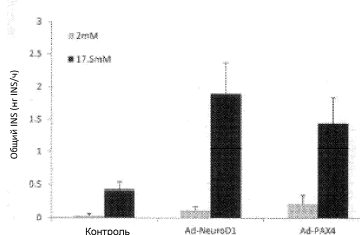
Фиг. 24A-B

PAX4 Vs NeuroD1-GS клетки



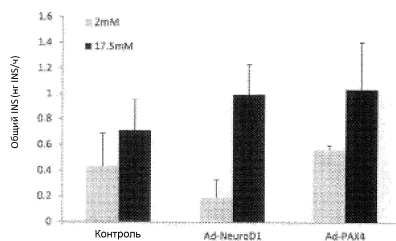
A

PAX4 Vs NeuroD1-GS клетки



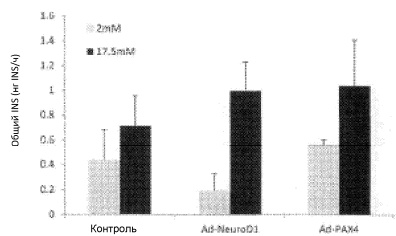
B

Vs NeuroD1- Навные клетки



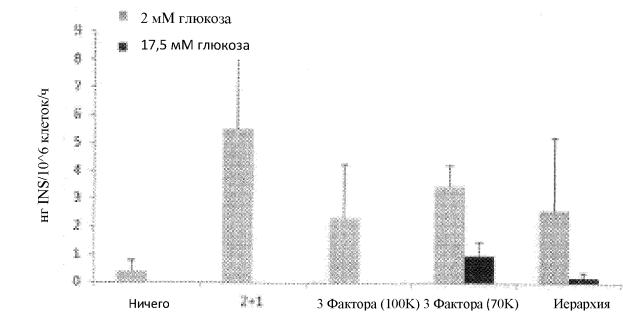
C

Vs NeuroD1- Навные клетки

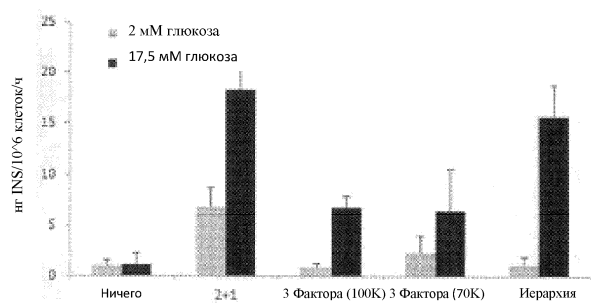


D

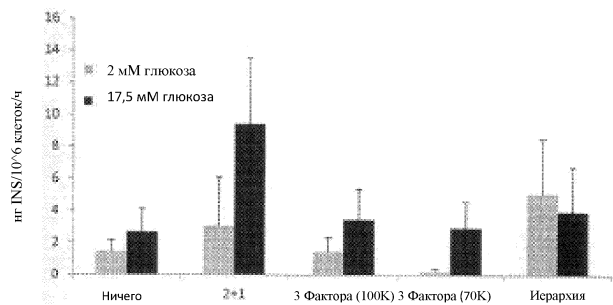
Фиг. 25A-D



A



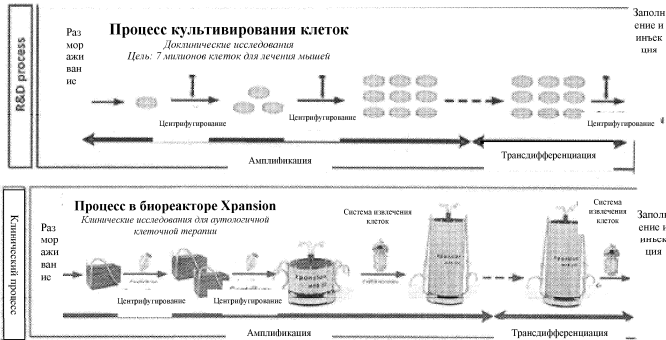
B



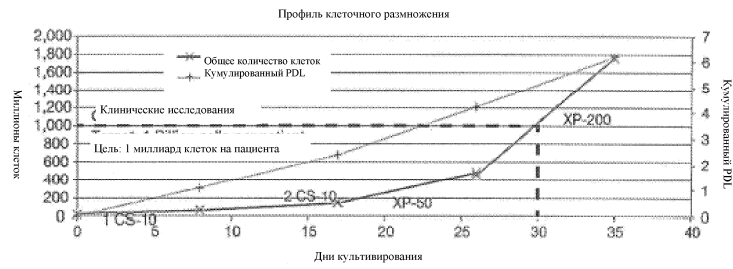
C

Фиг. 26А-С

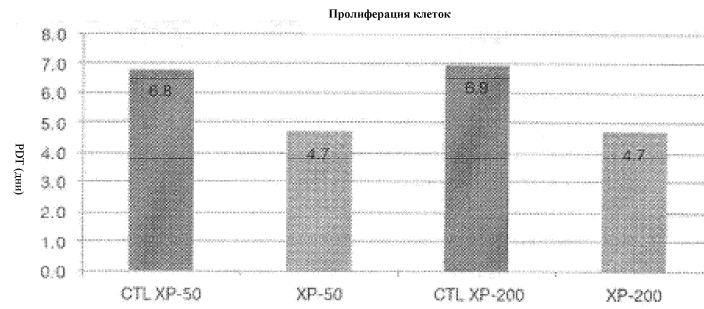
Амплификация и трансдифференциация клеток из печени человека
От доклинического процесса до клинического процесса



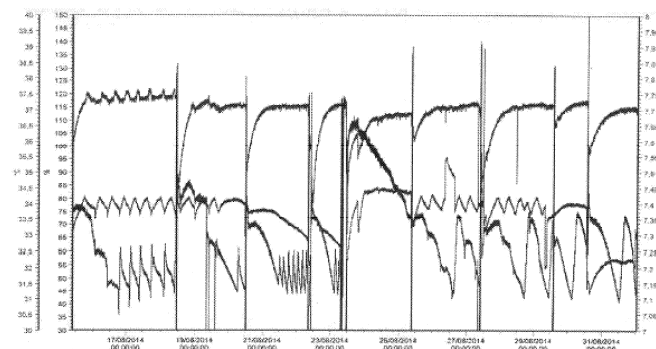
Фиг. 27



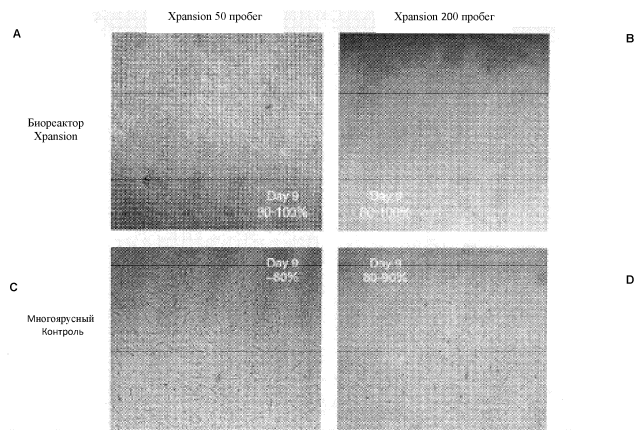
Фиг. 28



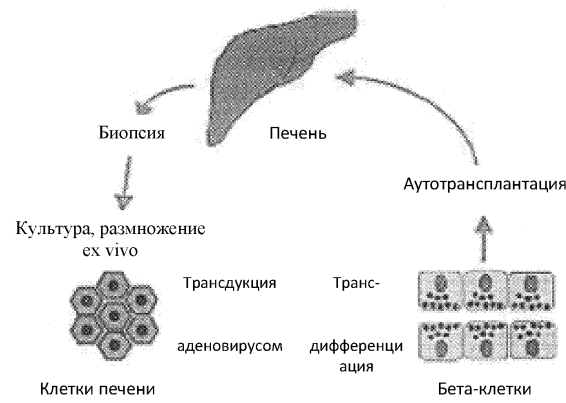
Фиг. 29



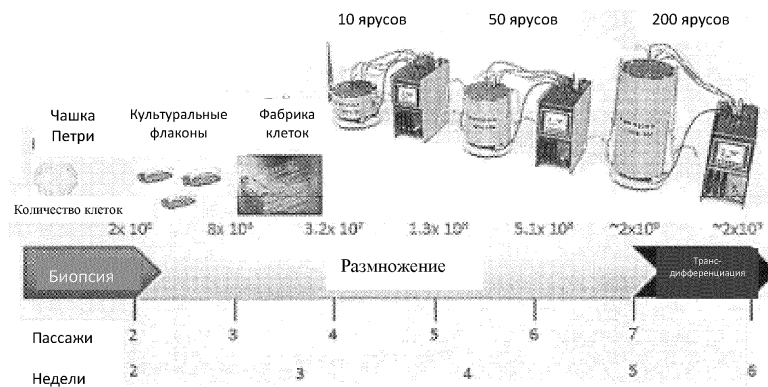
Фиг. 30



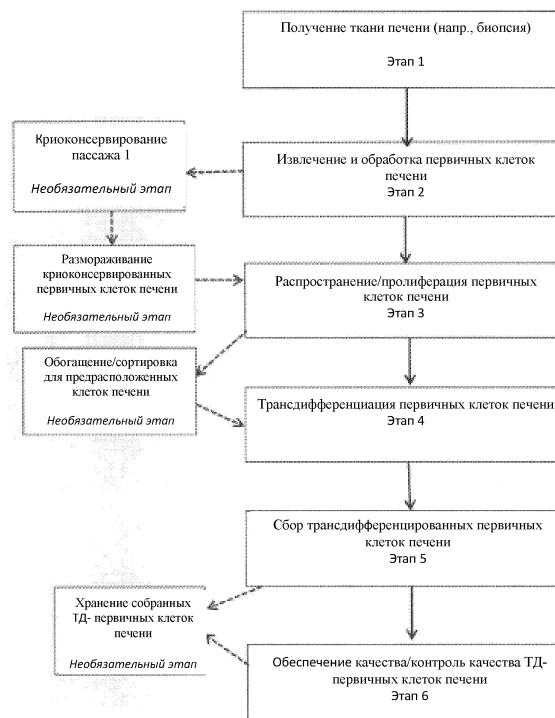
Фиг. 31A-D



Фиг. 32



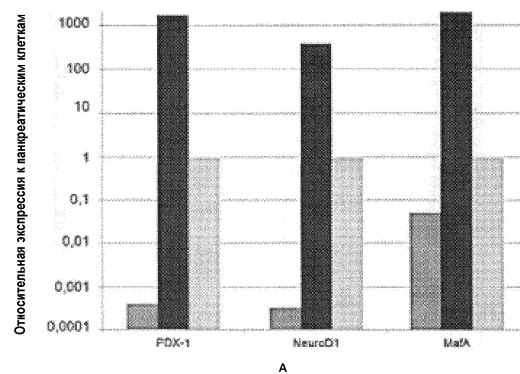
Фиг. 33



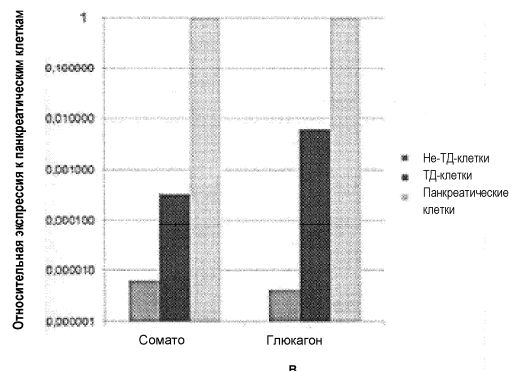
Фиг. 34

Пробег	Плотность посева (клеток/см ²)	Сбор посева (клеток/см ²)	Продолжительность культивирования (дни)
ORG-009	4,000	17,500	8
ORG-014	4,000	22,780	7
ORG-017	3,972	19,412	9

Фиг. 35

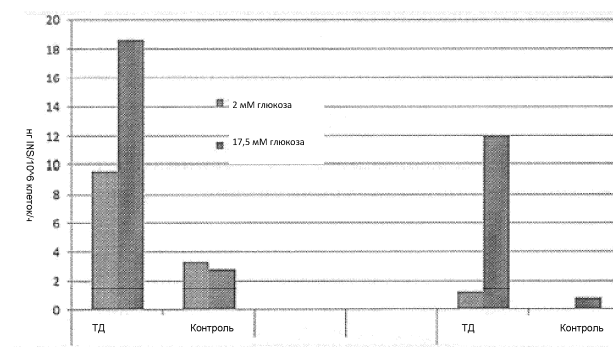


А

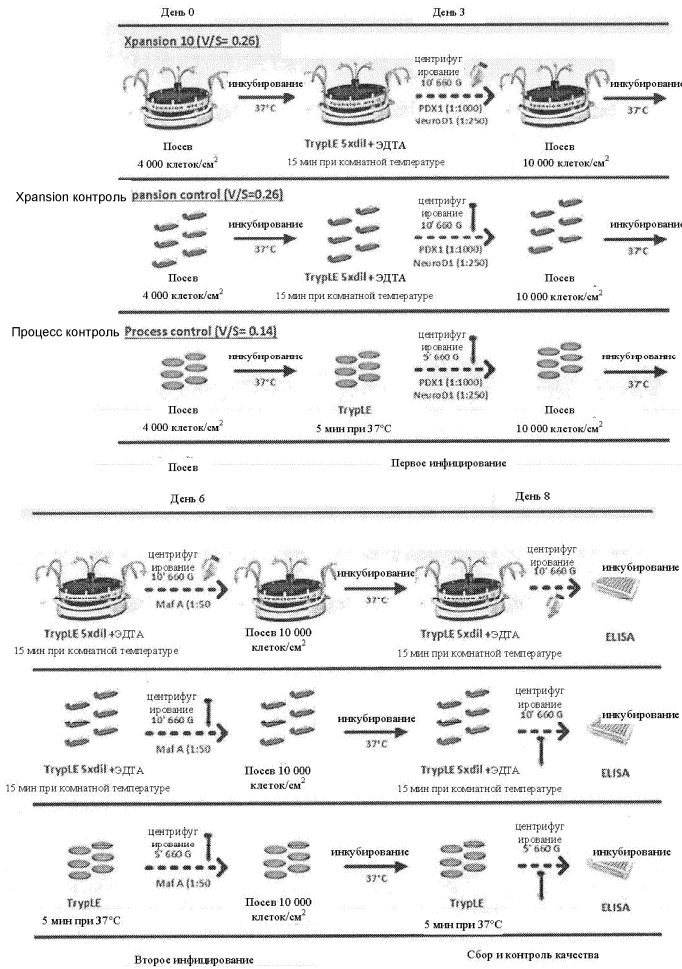


В

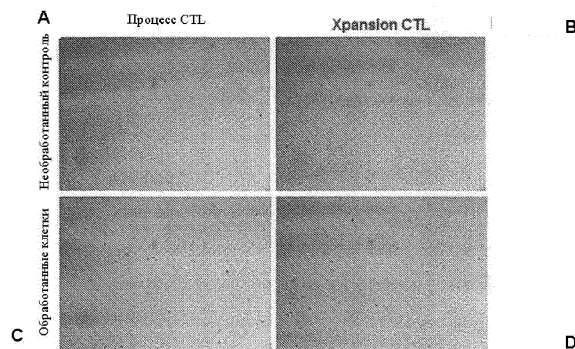
Фиг. 36А-В



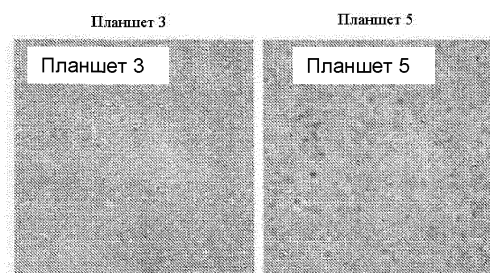
Фиг. 37



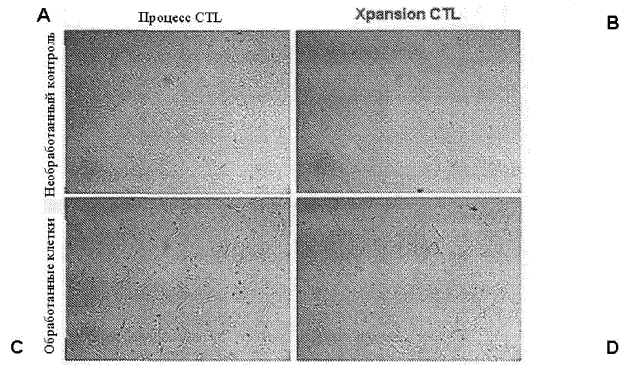
ФИГ. 38



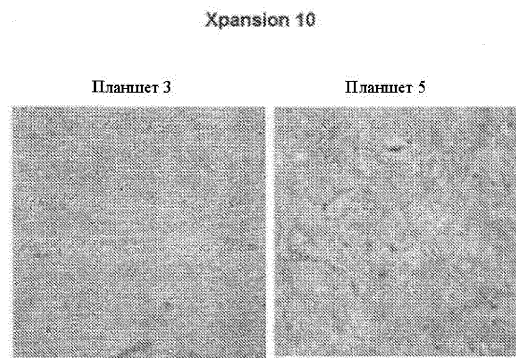
ФИГ. 39А-D



ФИГ. 40А-В



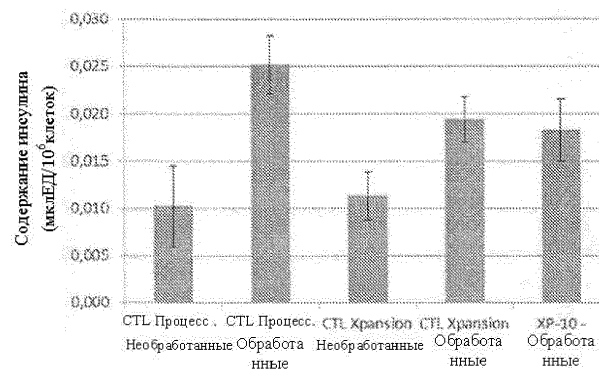
Фиг. 41A-D



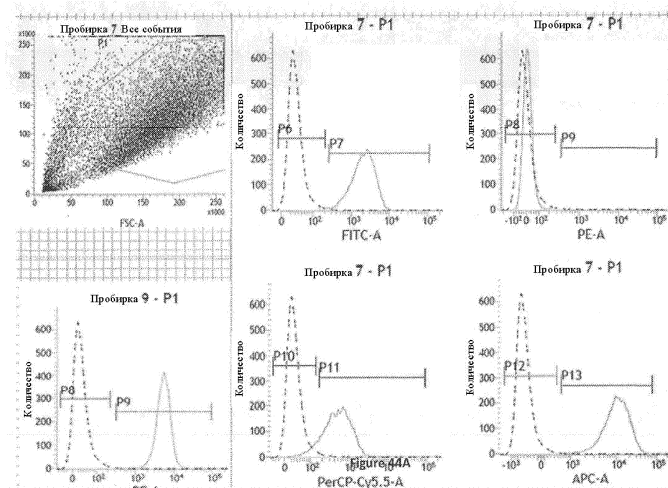
Фиг. 42A

Фиг. 42B

Фиг. 42A-B



Фиг. 43

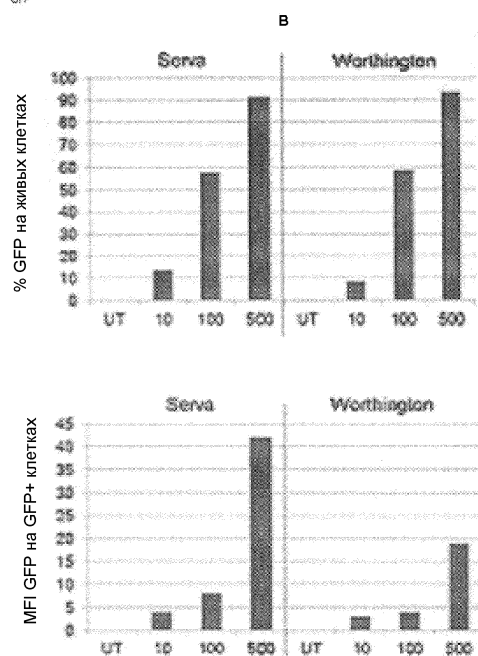
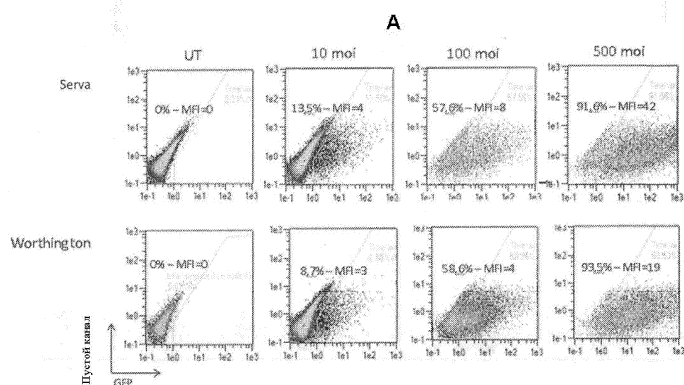
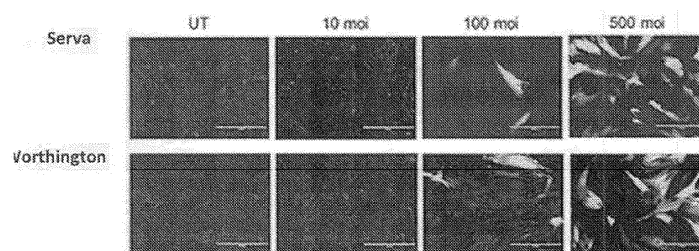


A

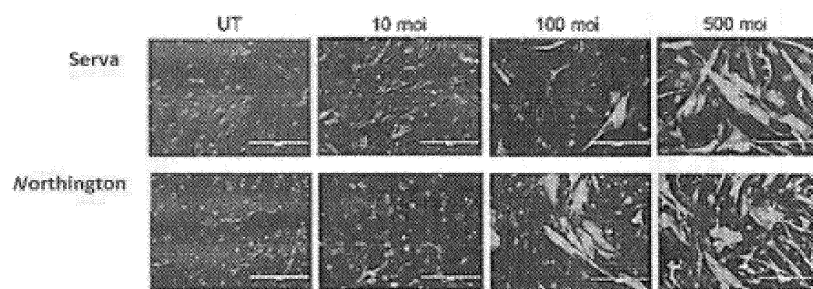
ORG GIL	% CD105	% CD73	% CD90	% CD44	% негативных маркеров
P12	99,32	99,85	99,55	99,77	0,93
P13	98,75	99,71	99,67	99,70	0,73
P14	96,77	98,60	99,50	99,64	0,58
P16_AdV	89,77	99,41	99,22	99,91	0,44

инфицирование

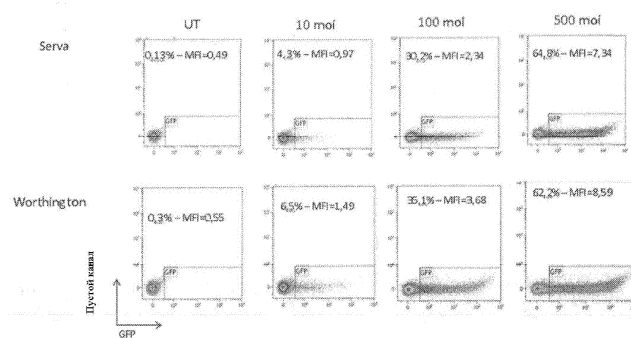
В
Фиг. 44А-В



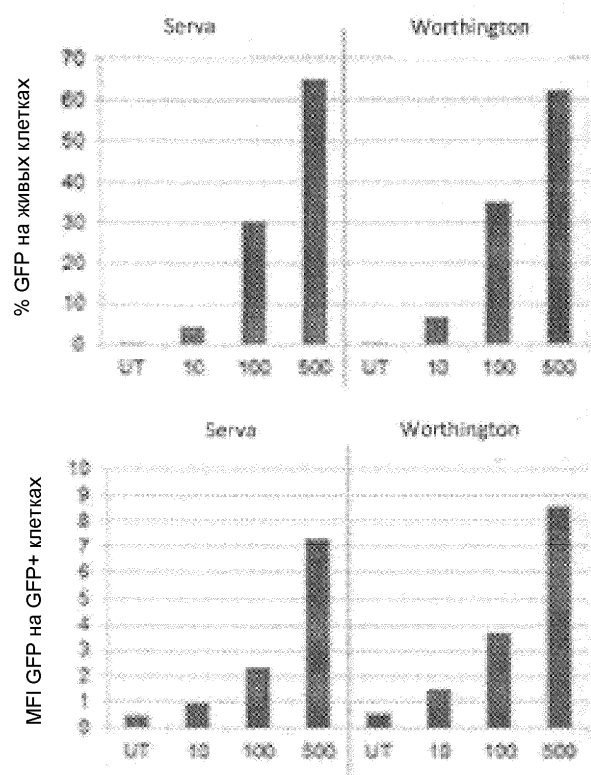
С
Фиг. 45А-С



A

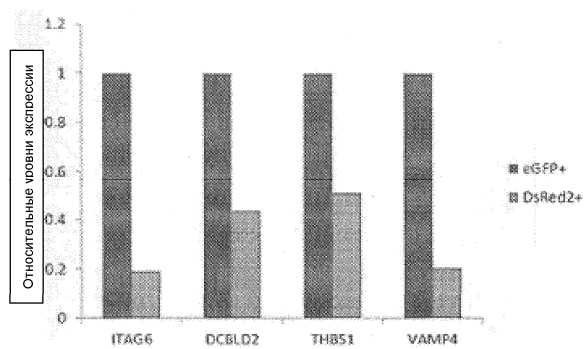


B

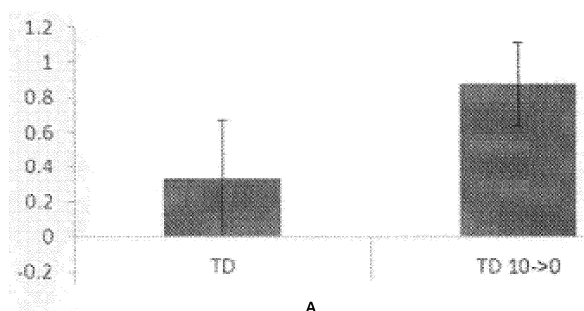


C

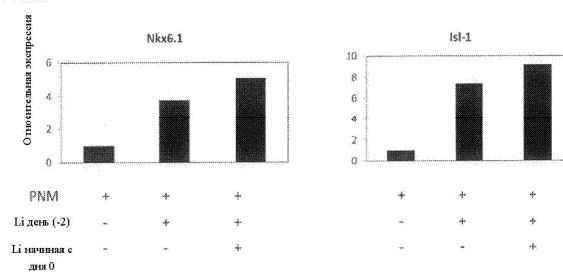
Фиг. 46А-С



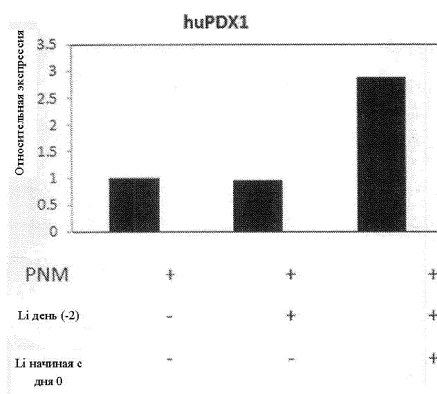
Фиг. 47



A



B



C

Фиг. 48А-С

