

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **035413**

(13) **B1**

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

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.06.10

(51) Int. Cl. *A61K 35/12* (2015.01)

(21) Номер заявки
201690014

(22) Дата подачи заявки
2014.06.13

(54) **ПОПУЛЯЦИИ КЛЕТОК, СПОСОБЫ ТРАНСДИФФЕРЕНЦИРОВКИ И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**

(31) **61/834,759; 61/834,767**

(32) **2013.06.13**

(33) **US**

(43) **2016.06.30**

(86) **PCT/IB2014/002164**

(87) **WO 2014/207578 2014.12.31**

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

(56) WO-A2-2010022395
BHANDARI et al. "Cloning, nucleotide sequence, and potential regulatory elements of the glutamine synthetase gene from murine 3T3-L1 adipocytes". Proc. Natl. Acad. Sci. August 1988, vol. 85, p. 5789-5793, entire document
US-A1-20060122104
WO-A2-2011159726
WO-A2-2013021389

(72) Изобретатель:
Фербер Сара (IL)

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

(57) В настоящем изобретении предложены способы последовательного и регулируемого по времени введения панкреатических факторов транскрипции для индукции непанкреатических клеток с целью трансдифференцировки и созревания по панкреатической β -клеточной линии. В настоящем изобретении также предложены способы идентификации, выделения и обогащения клеток, предрасположенных к трансдифференцировке, а также способы лечения дегенеративного панкреатического нарушения, такого как диабет.

B1

035413

035413

B1

Родственные заявки

Заявка на настоящий патент испрашивает приоритет и преимущества предварительной заявки USSN 61/834759, поданной 13 июня 2013 г., и USSN 61/834767, поданной 13 июня 2013 г., содержание которых полностью включено в настоящее изобретение посредством отсылки.

Область техники, к которой относится изобретение

Изобретение в целом относится к популяциям клеток, которые предрасположены к трансдифференцировке, и к способу получения клеток, имеющих фенотип и функцию зрелых бета-клеток поджелудочной железы.

Уровень техники

Бета-клетки островков Лангерганса в поджелудочной железе секретируют инсулин в ответ на факторы, такие как аминокислоты, глицеральдегид, жирные кислоты в свободном состоянии и, наиболее заметно, глюкозу. Способность нормальных островковых бета-клеток обнаруживать повышение концентрации глюкозы в крови и реагировать на повышенные уровни глюкозы секрецией инсулина является важной в отношении контроля уровней глюкозы в крови. Повышенная секреция инсулина в ответ на глюкозную нагрузку предотвращает гипергликемию у здоровых людей при стимуляции поглощения глюкозы в периферических тканях, в особенности мышечной и жировой ткани.

Лица, у которых ослаблена функция островковых бета-клеток, страдают диабетом. Инсулинозависимый сахарный диабет или IDDM (также известный как ювенильный диабет или диабет 1 типа) представляет приблизительно 10% всех случаев диабета у человека. IDDM отличается от инсулиннезависимого диабета (NIDDM) тем, что только IDDM включает специфическое разрушение инсулин-продуцирующих бета-клеток островков Лангерганса. Разрушение бета-клеток при IDDM, по-видимому, является результатом специфической аутоиммунной атаки, при которой собственная иммунная система пациента распознает и разрушает бета-клетки, но не окружающие альфа-клетки (вырабатывающие глюкагон) или дельта-клетки (вырабатывающие соматостатин), которые составляют островок.

Выбор лечения при IDDM сосредоточен на самостоятельной инъекции инсулина - неудобного и недостаточно точного решения - и, таким образом, крайне желательна разработка новых терапевтических стратегий. Возможность трансплантации островка или фрагмента поджелудочной железы была исследована как средство постоянного восполнения инсулина (Lacy, 1995; Vajkoczy et al., 1995). В современных методах используют либо трупные материалы, либо свиные островки в качестве субстратов трансплантата (Korbitt et al., 1997). Однако значительными проблемами, сложными для решения, является низкая доступность донорской ткани, вариабельность и низкий выход островков, получаемых при разделении, а также ферментативное и физическое повреждение, которое может происходить в результате процесса выделения (см. обзоры Secchi et al., 1997; Sutherland et al., 1998). Кроме того, существуют проблемы иммунного отторжения и текущие вопросы, связанные с ксенотрансплантацией при использовании свиных островков.

Очевидно, что сохраняется критическая потребность в создании альтернатив для лечения диабета путем самостоятельных инъекций инсулина. Хотя исследование стволовых клеток в этом отношении показало многообещающие результаты, не было достигнуто большого успеха. Существует потребность в улучшенных методиках выделения, культивирования и трансдифференцировки непанкреатических клеток, применяемых при лечении диабета.

Сущность изобретения

В настоящем изобретении предложен способ получения популяции клеток, имеющих фенотип и функцию зрелых бета-клеток поджелудочной железы, посредством контакта зрелых непанкреатических клеток млекопитающих с полипептидом панкреатодуоденального гомеобокса (PDX-1) или нуклеиновой кислотой, кодирующей полипептид панкреатодуоденального гомеобокса (PDX-1), при условиях, обеспечивающих поглощение полипептида или нуклеиновой кислоты в первом периоде времени; последующего контакта клеток с полипептидом Pax-4, полипептидом NeuroD1 или нуклеиновой кислотой, кодирующей полипептид Pax-4, или нуклеиновой кислотой, кодирующей полипептид NeuroD1, при условиях, обеспечивающих поглощение полипептида или нуклеиновой кислоты во втором периоде времени; и последующего контакта клеток этапа с полипептидом MafA или нуклеиновой кислотой, кодирующей полипептид MafA, при условиях, обеспечивающих поглощение нуклеиновой кислоты в третьем периоде времени. Второй период времени наступает по меньшей мере через 24 ч после первого периода времени. Третий период времени наступает по меньшей мере через 24 ч после второго периода времени. В некоторых вариантах осуществления первый, второй и третий период времени наступают в одно время.

В альтернативе в изобретении предложен способ получения популяции клеток, имеющих фенотип и функцию зрелых бета-клеток поджелудочной железы, посредством контакта зрелых непанкреатических клеток млекопитающих с полипептидом панкреатодуоденального гомеобокса (PDX-1) или нуклеиновой кислотой, кодирующей полипептид панкреатодуоденального гомеобокса (PDX-1), и вторым панкреатическим фактором транскрипции, при условиях, обеспечивающих поглощение полипептида PDX-1 или нуклеиновой кислоты и второго панкреатического фактора транскрипции в первом периоде времени; и последующего контакта клеток с полипептидом MafA или нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид MafA, при условиях, обеспечивающих поглощение нуклеиновой кислоты во втором периоде време-

ни. В некоторых вариантах осуществления второй период времени наступает по меньшей мере через 2, 3, 4, 5, 6 или 7 дней после первого периода времени. Вторым панкреатическим фактором транскрипции является, например, NeuroD1, Pax-4 или Ngn3.

Нуклеиновая кислота является рибонуклеиновой кислотой или дезоксирибонуклеиновой кислотой.

Необязательно клетки далее подвергают контакту с нуклеиновой кислотой, кодирующей полипептид Sox-9, или полипептидом Sox-9 при условиях, обеспечивающих поглощение нуклеиновой кислоты или полипептида.

Клетки являются клетками костного мозга, мышцы, селезенки, почки, крови, кожи, поджелудочной железы и печени. Клетки подвергают контакту *in vivo*. Клетки подвергают контакту *in vitro*. Популяция клеток, полученных способами настоящего изобретения, включает по меньшей мере 0,5 миллиарда клеток. В некоторых вариантах осуществления клетки выращивают в культуре перед контактом с полипептидами или нуклеиновыми кислотами.

Также изобретение включает способы лечения дегенеративного панкреатического нарушения посредством введения субъекту, нуждающемуся в этом, композиции, включающей полипептид PDX-1 или нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид PDX-1, в первом периоде времени; композиции, включающей полипептид Pax-4, полипептид NeuroD1, нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид Pax-4, или нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид NeuroD1, во втором периоде времени; и композиции, включающей полипептид MafA или нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид MafA, в третьем периоде времени. Второй период времени наступает по меньшей мере через 24 ч после первого периода времени. Третий период времени наступает по меньшей мере через 24 ч после второго периода времени. В некоторых вариантах осуществления первый, второй и третий период времени наступают в одно время.

Также в изобретении предложены способы лечения дегенеративного панкреатического нарушения посредством введения субъекту, нуждающемуся в этом, композиции, включающей полипептид PDX-1, нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид PDX-1, и второй панкреатический фактор транскрипции, в первом периоде времени; и композиции, включающей полипептид MafA или нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид MafA, во втором периоде времени. В некоторых вариантах осуществления второй период времени наступает по меньшей мере через 2, 3, 4, 5, 6 или 7 дней после первого периода времени. Вторым панкреатическим фактором транскрипции является, например, NeuroD1, Pax-4 или Ngn3.

Нуклеиновая кислота является рибонуклеиновой кислотой или дезоксирибонуклеиновой кислотой.

Необязательно субъекту также вводят нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид Sox-9, или полипептид Sox-9 при условиях, обеспечивающих поглощение нуклеиновой кислоты или полипептида.

Также изобретение включает способы лечения дегенеративного панкреатического нарушения посредством введения субъекту, нуждающемуся в этом, популяции клеток, полученной способами изобретения.

Дегенеративное панкреатическое нарушение является диабетом, таким как диабет I типа, II типа или гестационный диабет. В альтернативе дегенеративным панкреатическим нарушением является рак поджелудочной железы или панкреатит.

В настоящем изобретении также предложен вектор экспрессии, включающий нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид PDX-1, и нуклеиновую кислоту, кодирующую второй фактор транскрипции, или применение в любом из способов получения популяции клеток, имеющих фенотип зрелых бета-клеток поджелудочной железы, или способах лечения дегенеративного панкреатического нарушения. Вторым фактором транскрипции является, например, NeuroD1, Pax-4, Ngn3 или Sox-9.

Также в изобретение включена обогащенная популяция клеток человека, способных активировать глутаминсинтетаза-отвечающий элемент (GSRE). По меньшей мере 5, 10, 15, 20, 25, 30% или больше клеток в популяции способны активировать глутаминсинтетаза-отвечающий элемент (GSRE). Клетки являются эндотелиальными клетками, эпителиальными клетками, мезенхимальными клетками, фибробластами или клетками печени. В некоторых аспектах клетки печени получены из периферической печени. Предпочтительно клетки имеют активную сигнализацию Wnt. По меньшей мере 5, 10, 15, 20, 25, 30% или больше клеток в популяции вырабатывают инсулин или секретируют С-пептид, когда клетки обработаны так, что они эктопически экспрессируют панкреатический фактор транскрипции, такой как Pdx-1, Pax-4, MafA, NeuroD1, или их комбинацию. Необязательно популяция клеток экспрессирует по меньшей мере одно из Wnt3a; пониженные уровни DKK1 или DKK3; пониженные уровни APC; повышенные уровни активированного бета-катенина; или STAT3 связывающих элементов (факторов, действующих в *cis*-положении). В некоторых аспектах популяция клеток печени, выделенная из популяции клеток, экспрессирует повышенные уровни HOMER1, LAMP3 или BMPR2; или пониженные уровни ABCB1, ITGA4, ABCB4 или PRNP.

Также в изобретении предложены способы выделения популяции клеток, которые обладают повышенной способностью к индуцированной фактором транскрипции трансдифференцировке, посредством получения гетерогенной популяции клеток человека; введения конструкции нуклеиновой кислоты, включающей глутаминсинтетаза-отвечающий элемент (GSRE) или его фрагмент, способный активиро-

вать транскрипцию глутаминсинтетазы, функционально связанной с репортерным белком, и выделения клеток, экспрессирующих репортерный белок. Необязательно конструкция нуклеиновой кислоты также включает промотор/энхансер. Репортерный белок является флуоресцентным белком. Репортерный белок обеспечивает устойчивость к селективному прессу. Клетки являются эндотелиальными клетками, фибробластами, мезенхимальными клетками или клетками печени. Клетки печени получены из периферической печени.

Необязательно способ дополнительно включает культивирование выделенных клеток.

Также в изобретение включена популяция клеток, выделенная способами согласно изобретению.

В других аспектах изобретение включает способ лечения или облегчения симптома панкреатического нарушения посредством введения панкреатического фактора транскрипции в популяцию клеток, выделенную согласно способам изобретения, введения популяции клеток субъекту, нуждающемуся в этом. Панкреатическим нарушением является диабет или панкреатит. Панкреатическим фактором транскрипции является Pdx-1, Pdx-4, MafA, NeuroD1 или их комбинация.

Также в изобретение включен способ получения популяции клеток, имеющих фенотип и функцию зрелых бета-клеток поджелудочной железы, посредством контакта популяции клеток, выделенных согласно изобретению, с полипептидом панкреатодуоденального гомеобокса (PDX-1) или нуклеиновой кислотой, кодирующей полипептид панкреатодуоденального гомеобокса (PDX-1), при условиях, обеспечивающих поглощение полипептида или нуклеиновой кислоты в первом периоде времени; последующего контакта клеток с полипептидом Pdx-4, полипептидом NeuroD1 или нуклеиновой кислотой, кодирующей полипептид Pdx-4, или нуклеиновой кислотой, кодирующей полипептид NeuroD1, при условиях, обеспечивающих поглощение полипептида или нуклеиновой кислоты во втором периоде времени; и последующего контакта клеток этапа с полипептидом MafA или нуклеиновой кислотой, кодирующей полипептид MafA, при условиях, обеспечивающих поглощение нуклеиновой кислоты в третьем периоде времени. Второй период времени наступает по меньшей мере через 24 ч после первого периода времени. Третий период времени наступает по меньшей мере через 24 ч после второго периода времени. В некоторых вариантах осуществления первый, второй и третий период времени наступают в одно время.

В альтернативе в изобретении предложен способ получения популяции клеток, имеющих фенотип и функцию зрелых бета-клеток поджелудочной железы, посредством контакта популяции клеток, выделенных согласно изобретению, с полипептидом панкреатодуоденального гомеобокса (PDX-1) или нуклеиновой кислотой, кодирующей полипептид панкреатодуоденального гомеобокса (PDX-1), и вторым панкреатическим фактором транскрипции, при условиях, обеспечивающих поглощение полипептида PDX-1 или нуклеиновой кислоты и второго панкреатического фактора транскрипции в первом периоде времени; и последующего контакта клеток с полипептидом MafA или нуклеиновой кислотой, кодирующей полипептид MafA, при условиях, обеспечивающих поглощение нуклеиновой кислоты во втором периоде времени. В некоторых вариантах осуществления второй период времени наступает по меньшей мере через 2, 3, 4, 5, 6 или 7 дней после первого периода времени. Вторым панкреатическим фактором транскрипции является, например, NeuroD1, Pdx-4 или Ngn3.

Нуклеиновая кислота является рибонуклеиновой кислотой или дезоксирибонуклеиновой кислотой.

Необязательно клетки далее подвергают контакту с нуклеиновой кислотой, кодирующей полипептид Sox-9 или полипептид Sox-9, при условиях, обеспечивающих поглощение нуклеиновой кислоты или полипептида.

В изобретении предложена конструкция нуклеиновой кислоты, включающая один или более глутаминсинтетаза-отвечающих элементов (GSRE), функционально связанных с промотором и репортерным белком. Промотор является слабым промотором. Конструкция нуклеиновой кислоты также содержит фактор транскрипции. Фактор транскрипции является панкреатическим фактором транскрипции, таким как Pdx-1, Pdx-4, MafA или NeuroD1. Также в изобретение включен вектор, содержащий конструкцию нуклеиновой кислоты изобретения. Вектор является аденовирусным вектором.

Если не определено иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем описании, имеют такое же значение, которое обычно известно среднему специалисту в данной области техники, к которой относится настоящее изобретение. Хотя методы и материалы, подобные или эквивалентные описанным в настоящем изобретении, могут использоваться при практическом осуществлении или тестировании настоящего изобретения, подходящие методы и материалы описаны ниже. Все публикации, заявки на патенты, патенты и другие источники, указанные в настоящем описании, полностью включены посредством отсылки. В случае конфликта настоящее описание, включая определения, будет иметь преимущественную силу. Кроме того, материалы, методы и примеры являются лишь иллюстративными и не должны быть ограничивающими.

Другие признаки и преимущества изобретения будут очевидны из следующего подробного описания и из формулы изобретения.

Краткое описание фигур

На фиг. 1 показано, что экспрессия Pdx-1 в человеческих клетках печени *in vitro* вызывает постепенную активацию экспрессии гормонов поджелудочной железы. (A) Инсулин (INS); (B) глюкагон (GCG); (C) соматостатин (SST); и (D) другие специфические для поджелудочной железы факторы транскрипции (NKX6.1, ISL1, PAX4, MAFA, NeuroD1, NeuroG3). Результаты были нормализованы по экспрессии гена β -актина в том же образце кДНК и представлены как среднее \pm SE относительной экспрессии в сравнении с клетками, обработанными контрольным вирусом в тот же день. $n \geq 4$ в двух независимых экспериментах (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

На фиг. 2 показано, что эктопическая коэкспрессия панкреатических факторов транскрипции (pTF) Pdx-1, Pax4 и MafA в человеческих клетках печени *in vitro* усиливает секрецию (про)инсулина по сравнению с индукцией каждым pTF в отдельности. (A) Иммунофлуоресцентное (IF) окрашивание показывает экспрессию pTF: Pdx-1 (левая панель), Pax4 (средняя левая панель), MafA (средняя правая панель) и 3 pTF вместе (правая панель), стрелками указаны клетки, экспрессирующие все три pTF. (B) Люциферазный анализ активации промотора инсулина указанными pTF; β -gal использовали в качестве контроля. Результаты выражены в Относительных Световых Единицах (RLU)/мг белка. Каждая точка данных представляет среднее \pm SE по меньшей мере из двух независимых экспериментов, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ по сравнению с клетками, обработанными контрольным вирусом ($n > 4$). (C) Иммунофлуоресцентное окрашивание показывает инсулин-положительные клетки после эктопической экспрессии указанных pTF. Исходное увеличение $\times 20$. Количественное выражение IF окрашивания приведено в таблице (справа). Процент инсулин-положительных клеток вычисляли путем подсчета по меньшей мере 500 положительных клеток по меньшей мере из двух независимых экспериментов. (D) Секрецию инсулина после инкубирования с указанными концентрациями глюкозы обнаруживали с помощью радиоиммуноанализа. * $p < 0,05$, $n \geq 12$ в пяти независимых экспериментах. Значимость представляет различия между тройной инфекцией и всеми прочими обработками.

На фиг. 3 показано влияние совместной и последовательной экспрессии pTF Pdx-1, Pax4 и MafA на созревание β -клеток поджелудочной железы. (A) схематическая демонстрация порядка инфицирования pTF (обработки В-Е) или контрольным вирусом (Ad-CMV-P-gal, обработка А). (B) Иммунофлуоресцентное окрашивание на инсулин: обработка В (левая панель), обработка С (средняя панель), обработка D (правая панель). Исходное увеличение - $\times 20$. Количественное выражение окрашивания (процентное) указано под каждым изображением. Процент инсулин-положительных клеток вычисляли при подсчете по меньшей мере 1000 положительных клеток по меньшей мере в двух независимых экспериментах. Секрецию (C) инсулина и (D) С-пептида после инкубирования с указанной концентрацией глюкозы измеряли с помощью радиоиммуноанализа. Обработки инфекции указаны на оси X и описаны в табл. 3А. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, в сравнении с клетками, обработанными контрольным вирусом; $n \geq 12$ в 5 независимых экспериментах. (E) Уровни экспрессии указанных эндогенных, специфических для поджелудочной железы факторов транскрипции после указанных обработок (ось X) измеряли с помощью ОТ-ПЦР. Значения St нормализованы по экспрессии гена β -актина в том же образце кДНК. Результаты представлены как относительные уровни среднего \pm SE для относительной экспрессии в сравнении с клетками, обработанными контрольным вирусом, * $p < 0,05$, $n \geq 8$ в 4 независимых экспериментах. Стрелка указывает определенное уменьшение уровня экспрессии Isl-1 при обработке С.

На фиг. 4 показаны три графика, демонстрирующие эффективность трансдифференцировки, указывающие, что иерархический последовательный порядок инфицирования (обработка С) является наиболее эффективным. (A) Активацию промотора инсулина измеряли с помощью люциферазного анализа после указанных обработок инфекции. Результаты выражены в относительных световых единицах (RLU)/мг белка. Каждое значение данных представляет собой среднее \pm SE по меньшей мере в двух независимых экспериментах, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ в сравнении с клетками, обработанными контрольным вирусом ($n > 4$). (B) Анализ уровня экспрессии переносчика глюкозы 2 (GLUT2) с помощью ОТ-ПЦР выполняли после указанных обработок инфекции. Значения St нормализованы по экспрессии гена β -актина в том же образце кДНК. Результаты представлены как относительные уровни среднего \pm SE в сравнении с клетками, обработанными контрольным вирусом. * $P < 0,05$, в сравнении с клетками, обработанными контрольным вирусом, $n \geq 8$ в 4 независимых экспериментах. (C) Уровни экспрессии прогормонконвертазы 2 (PC2; PCSK2) определяли с помощью ОТ-ПЦР после указанных обработок инфекции. Значения St нормализованы по экспрессии гена β -актина в том же образце кДНК. Результаты представлены как относительные уровни среднего \pm SE в сравнении с клетками, обработанными контрольным вирусом, ** $P < 0,01$, $n \geq 8$ в 4 независимых экспериментах.

На фиг. 5 показаны два графика, демонстрирующие секрецию С-пептида после иерархического последовательного порядка инфицирования (обработка С). (A) секрецию С-пептида измеряли с помощью радиоиммуноанализа при статическом инкубировании в течение 15 мин в присутствии 0, 5, 10, 15, 20 мМ глюкозы в клетках, обработанных прямым "иерархическим" последовательным порядком (обработка С), * $P < 0,05$, $n \geq 7$ в 3 независимых экспериментах. (B) секрецию С-пептида измеряли с помощью радиоиму-

ноанализа в течение 13 или 28 дней в бессывороточной среде с добавкой инсулина, трансферрина и селена перед анализом секреции С-пептида. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, $n \geq 5$ в 2 независимых экспериментах. Значимость представляет различия в сравнении со стандартным протоколом (обработка С в день 6).

На фиг. 6 представлены четыре графика, на которых показана роль каждого рTF в процессе трансдифференцировки при использовании порядка обработки инфекции С и исключения каждого рTF (С-Pdx1, исключение Pdx1; С-Pax4, исключение Pax4; и С-Mafa, исключение Mafa). (А) активацию промотора инсулина измеряли с помощью люциферазного анализа. Результаты представлены как среднее \pm SE, * $p < 0,1$, ** $p < 0,05$ в сравнении с прямым "иерархическим" последовательным порядком инфицирования (обработка С), $n \geq 6$ в трех независимых экспериментах. (В) Секрецию С-пептида после инкубирования в течение 15 мин с указанными концентрациями глюкозы измеряли с помощью радиоиммуноанализа. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ в сравнении с прямым "иерархическим" последовательным порядком инфицирования (С), $n \geq 6$ в трех независимых экспериментах. (С) Уровни экспрессии ферментов поджелудочной железы измеряли с помощью ОТ-ПЦР: переносчик глюкозы 2 (GLUT2); глюкокиназа (GCK); и прогормон-конвертаза (PCSK2). (D) Уровни экспрессии указанных эндогенных панкреатических факторов транскрипции измеряли с помощью ОТ-ПЦР. Значения St нормализованы по экспрессии гена β -актина в том же образце кДНК. Результаты представлены как относительные уровни среднего \pm SE в сравнении с обработанными "иерархически последовательной инфекцией" клетками печени. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, $n \geq 6$ в трех независимых экспериментах.

На фиг. 7 представлены три графика, на которых показано влияние экспрессии Isl1 на созревание β -клеток из трансдифференцированных клеток печени после инфекции "иерархическим" последовательным порядком (обработка С). (А) Уровни экспрессии инсулина измеряли с помощью ОТ-ПЦР. Значения St нормализованы по экспрессии гена β -актина в том же образце кДНК. Результаты представлены как относительные уровни среднего \pm SE в сравнении с клетками, обработанными контрольным вирусом. * $P < 0,05$, $n \geq 6$ в 3 независимых экспериментах. (В) секрецию инсулина измеряли с помощью радиоиммуноанализа. ** $P < 0,01$, $n \geq 6$ и в сравнении с прямым "иерархическим" последовательным порядком инфицирования (С), $n \geq 6$ в 3 независимых экспериментах. (С) Уровень экспрессии переносчика глюкозы 2 (Glut2) измеряли с помощью ОТ-ПЦР.

На фиг. 8 показана роль каждого рTF в поддержке дифференцировки клеток для секреции глюкагона (а) и соматостатина (8) при использовании иерархического порядка инфицирования (обработка С) и исключения каждого рTF. Уровни экспрессии гормонов поджелудочной железы глюкагона (GCG) (А и В) и соматостатина (SST) (А и D) определяли с помощью ОТ-ПЦР после указанных обработок инфекции. (С) Уровни экспрессии клеточноспецифических факторов транскрипции ARX и BRATN4 также измеряли с помощью ОТ-ПЦР для указанных обработок инфекции. (Е) Уровни экспрессии соматостатина (SST) определяли с помощью ОТ-ПЦР после дополнительного инфицирования Isl1 (100 MOI). Значения St (для А, В, С и D) нормализовали по экспрессии гена β -актина в том же образце кДНК. Результаты представлены как относительные уровни среднего \pm SE в сравнении с клетками, обработанными контрольным вирусом, (а) или с клетками печени, обработанными "иерархически последовательной инфекцией" (b-e). * $P < 0,05$, ** $P < 0,1$, $n \geq 6$ в 3 независимых экспериментах. (F) иммунофлуоресцентное окрашивание на соматостатин после обработки С инфекции (левая панель) и после обработки С инфекции с дополнительным инфицированием Isl1 (правая панель). Исходное увеличение - $\times 20$. (G) иммунофлуоресцентное окрашивание на инсулин и соматостатин показывает, что последовательное введение факторов транскрипции в прямом иерархическом методе приводит к увеличению созревания трансдифференцированных клеток по линии бета-подобных клеток поджелудочной железы.

На фиг. 9 показано схематическое изображение предположительного механизма индуцированной панкреатическими факторами транскрипции трансдифференцировки клеток печени в клетки поджелудочной железы. Совместная экспрессия трех рTF приводит к увеличению количества трансдифференцированных клеток печени по сравнению с отдельным эффектом каждого фактора (В). Последовательное введение факторов транскрипции в прямом иерархическом методе приводит к увеличению созревания трансдифференцированных клеток по линии бета-подобных клеток поджелудочной железы.

Фиг. 10. Индуцированная Pdx-1 активация IPC у мышей *in vivo* ограничена клетками, прилегающими к центральным венам, которые характеризуются экспрессией GS.

Иммуногистохимический анализ Pdx-1 (А) и инсулина (В) через 14 дней после введения Ad-CMV-PDX-1. Стрелки указывают положительные клетки, расположенные главным образом вблизи от центральных вен (cv). (С и D) анализ экспрессии GS в печени человека (С) и мыши (D) показывает экспрессию GS в слоях 1-2 клеток, прилегающих к центральным венам. Исходное увеличение $\times 400$.

Фиг. 11. GSRE содержит Wnt-сигнализация отвечающий элемент-TCF-LEF связывающий сайт. Схематическое изображение GSRE, показывающее присутствие TCF-LEF и STAT 5 связывающих сайтов.

Фиг. 12. GSRE воздействует на субпопуляцию человеческих клеток печени *in vitro*. (А и D) Схематические изображения Ad-GSRE-TK-Pdx-1 или GFP рекомбинантных аденовирусов. Клетки печени были

инфицированы Ad-GSRE-TK-Pdx-1 (C) или Ad-CMV-Pdx-1 (B). Иммунофлуоресцентный анализ экспрессии Pdx-1 показал, что $13 \pm 2\%$ человеческих клеток печени, инфицированных Ad-GSRE-TK-Pdx-1 (C), и $70 \pm 12\%$ обработанных Ad-CMV-Pdx-1 клеток (B) экспрессировали эктопический ядерный фактор (антитела кролика к Pdx-1, великодушно предоставлены С. Wright, розовый; B и C соответственно). Аналогичные результаты были получены при использовании Ad-GSRE-TK-eGFP; 15% клеток были положительными по eGFP (E и F). Инфицирование Ad-CMV-eGFP привело к получению приблизительно 75-80% eGFP положительных клеток в течение 3-4 дней (данные не представлены)

Фиг. 13. GSRE воздействует на поддающиеся трансдифференцировке клетки. Клетки печени инфицировали Ad-GSRE-TK-Pdx-1 (B) или Ad-CMV-Pdx-1 (A) в течение 5 дней. (A и B) иммунофлуоресцентный анализ совместного окрашивания инсулина (антитело морской свинки к инсулину, Dako, зеленый) и (Pdx-1 кроличье антитело к Pdx-1, великодушно предоставлено С. Wright, розовый). (C) Статистический анализ активации инсулина в обработанных клетках; Ad-GSRE-TK-Pdx-1 активировал продукцию инсулина в 50%, тогда как Ad-CMV-Pdx-1 - только в 5% Pdx-1-положительных клеток. Синий - DAPI, ядерное окрашивание; исходное увеличение - $\times 20$.

Фиг. 14. In vitro поиск клеточных линий GSRE активирующих клеток человека. (A) схематическое изображение лентивирусных векторов. (B) Зрелые человеческие клетки печени после 3-10 пассажей инфицировали двойной лентивирусной системой. Клетки печени визуализировали через 10 дней после инфицирования с флуоресценцией DsRed2 (красный) или eGFP (зеленый). (C) клетки сортировали на клеточном сортере с активацией флуоресценции (FACS); клеточный сортер Aria; Becton Dickinson, San Jose, CA) с флуоресцеинизотиоцианатным фильтром (530/30 нм) для eGFP и фильтром Pe-Texas Red (610/20 нм) для DsRed2. (D и E) Выделенные клетки культивировали отдельно с несколькими пассажами (исходное увеличение - $\times 10$).

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

Фиг. 16. eGFP+ клетки более эффективно, чем DsRed2+ клетки, отвечают на pTFs-индуцированную трансдифференцировку. Эти две группы аналогично обрабатывали растворимыми факторами и pTFs: Ad-Pdx-1+Ad-Pax-4+Ad-MafA или контрольный вирус (Ad- β -gal) в течение 6 дней. β -клетка-подобные характеристики и функцию сравнивали в отделенных группах: (A) на молекулярном уровне, экспрессию генов инсулина и глюкагона исследовали с помощью количественной ПЦР в реальном времени в сравнении с контрольно обработанными клетками. Культивируемые человеческие клетки островков поджелудочной железы (пассаж 3) использовали в качестве положительного контроля. (B и C) На функциональном уровне, глюкоза-регулируемую секрецию инсулина анализировали путем статического инкубирования при низкой, а затем высокой концентрациях глюкозы (2 мМ и 17,5 мМ глюкозы в KRB соответственно). Секрецию инсулина (B) и С-пептида (C) измеряли при использовании набора для радиоиммуноанализа человеческого инсулина (DPC; $n \geq 8$ в 3 различных экспериментах) или набора для радиоиммуноанализа человеческого С-пептида (Linco $n \geq 8$ в 3 различных экспериментах). * $P < 0,01$ по сравнению с DsRed2+ клетками при использовании t-критерия Стьюдента.

Фиг. 17. Более высокая эффективность трансдифференцировки в eGFP+ популяции стабильна при увеличении пассажей в культуре. Эти две группы пролиферировали отдельно после сортировки и были аналогично обработаны pTFs (Ad-Pdx-1+Ad-Pax-4+ad-MafA и растворимыми факторами) после нескольких пассажей (5-7 пассажей после сортировки) или более высокого количества пассажей (10-12 пассажей после сортировки). Регулируемую секрецию инсулина анализировали путем статического инкубирования при низкой, а затем высокой концентрациях глюкозы (2 мМ и 17,5 мМ глюкозы в KRB соответственно). Секрецию инсулина измеряли при использовании набора для радиоиммуноанализа человеческого инсулина (DPC; $n \geq 6$ в 2 различных экспериментах). Никаких статистически значимых различий между низким и высоким количеством пассажей в обеих популяциях клеток обнаружено не было, что указывает на стойкую тенденцию eGFP-меченных клеток к pTF-индуцированной трансдифференцировке по β -клеточной линии и функции.

Фиг. 18. Дифференциальные профили экспрессии генов в eGFP+ и DsRed2+ клетках анализировали с помощью микроматричного анализа и согласно DAVID Bioinformatics Resources 6.7. Четыре процента дифференциальных генов принадлежат к сигнальному пути Wnt.

Фиг. 19. Активная сигнализация Wnt способствует трансдифференцировке клеток печени в клетки поджелудочной железы. Зрелые человеческие клетки печени обрабатывали Ad-CMV-Pdx-1 и растворимыми факторами, как сообщали ранее, с добавкой Wnt3A (50 нг/мл R&D или DKK3 нг/мл R&D). Через 5 дней секрецию инсулина анализировали путем статического инкубирования при низкой, а затем высокой концентрациях глюкозы (2 мМ и 17,5 мМ глюкозы в KRB соответственно). Секрецию инсулина измеряли при использовании набора для радиоиммуноанализа человеческого инсулина (DPC; $n \geq 8$ в 3 различных

экспериментах) и в сравнении с необработанными клетками (контр.). * $p < 0,01$ в сравнении с одним Ad-CMV-Pdx-1 при использовании t-критерия Стьюдента.

Фиг. 20. Блокирование сигнального пути Wnt останавливает трансдифференцировку eGFP+ клеток. Клетки eGFP обрабатывали Ad-CMV-Pdx-1 или контрольным вирусом (Ad-CMV-p-gal) в течение 5 дней в присутствии DKK3 (0,5 мкг/мл R&D). Экспрессию генов гормонов поджелудочной железы исследовали с помощью количественной ПВ-ПЦР в реальном времени в сравнении с контрольно обработанными клетками.

Фиг. 21. eGFP+ клетки экспрессируют более низкие уровни APC и более высокие уровни активного β -катенина, чем DsRed2+ клетки. (A) экспрессия APC и DKK1 заметно увеличена в DsRed2+ клетках. Это может также указывать, что эти клетки экспрессируют более высокие уровни репрессоров сигнального пути Wnt по сравнению с eGFP+ клетками. $n \geq 6$ в 2 различных экспериментах. * $p < 0,01$ в DsRed2+ в сравнении с eGFP+ клетками при использовании t-критерия Стьюдента. (B) Вестерн-блот-анализ с использованием специфичного антитела к активированному β -катенину (анти-ABC клон 8E7, Millipore, 1:2000) в экстрактах eGFP и DsRed2 положительных клеток. β -актин (SC-1616, Санта-Круз, 1:1000) использовали в качестве белка для нормализации. (C) Количественный анализ уровней белка β -катенина выполняли при использовании программы ImageJ 1.29x.

Подробное описание изобретения

Было показано, что факторы транскрипции (TF) вызывают трансдифференцировку целого ряда клеточных линий. Как указано в настоящем изобретении, "трансдифференцировка" относится к процессу, в котором клетки первого типа теряют отличительные признаки и изменяют свой фенотип на фенотип клеток второго типа. В некоторых вариантах осуществления первые и вторые клетки происходят из различных тканей или клеточных линий. Предпочтительно трансдифференцировка включает превращение зрелой или дифференцированной клетки в другую зрелую или дифференцированную клетку. В частности, было сделано предположение, что линиеспецифические факторы транскрипции (TF) играют важную роль в превращении зрелых клеток в эндокринные клетки поджелудочной железы (Meivar-Levy et al., 2006; Meivar-Levy et al., 2010; Yechoor et al., 2010; Russ et al., 2011), нейроны (Vierbuchen et al., 2010; Ambasudhan et al., 2011; Pang et al., 2011), гематопозитические клетки (Szabo et al., 2010) и линии кардиомиоцитов (Ieda et al., 2010), что указывает на то, что процессы трансдифференцировки протекают в целом ряде сред. Во всех протоколах трансдифференцировки эктопические TF служат быстрым триггером потенциально широкого, функционального и необратимого процесса развития (Ber et al., 2003; Meivar-Levy et al., 2003; Meivar-Levy et al., 2006). Многочисленные исследования указывали, что эктопическая экспрессия отдельных TF активировала требуемый дополнительный репертуар и функцию в процессе, связанном с активацией дополнительных соответствующих TF, неактивных в иных условиях. Однако динамика, относительные уровни и иерархия или порядок индуцированных TF остаются неизвестными.

При использовании относительно недостаточной индукции эндогенных факторов транскрипции (TF) посредством введения отдельных эктопических TF, настоящее изобретение связано с трансдифференцировкой как последовательным и временно регулируемым процессом, на который влияет иерархическая сеть TF.

Настоящее изобретение основано на открытии, согласно которому TF-индуцированная трансдифференцировка печени в поджелудочную железу является постепенным и последовательным процессом. Важно то, что лишь последовательное введение панкреатических TF, а не их совместная экспрессия, селективно направляет специфические программы клеточных линий в эндокринной части поджелудочной железы. Последовательная экспрессия панкреатических TF в прямом иерархическом режиме, как показали, обязательна для созревания трансдифференцированных клеток по β -клеточной линии. В частности, роль панкреатического β -клеточного фактора транскрипции MafA была установлена на заключительном этапе процесса трансдифференцировки. На данном этапе MafA поддерживает созревание трансдифференцированных клеток печени по β -клеточной линии в процессе, связанном с репрессией соматостатина и Isl1.

Результаты, описанные в настоящем изобретении, предполагают фундаментальные временные характеристики трансдифференцировки, опосредованной факторами транскрипции, что может способствовать увеличению терапевтической ценности применения TF-индуцированного репрограммирования зрелых клеток для лечения дегенеративных заболеваний, в том числе диабета.

Панкреатические факторы транскрипции (pTF), такие как Pdx-1, NeuroD1, Ngn-3 и Pax4, активируют трансдифференцировку печени в поджелудочную железу и индивидуально вызывают уменьшение гипергликемии у мышей с диабетом (Ferber et al., 2000; Ber et al., 2003; Kojima et al., 2003; Koizumi et al., 2004; Kaneto et al., 2005; Kaneto et al., 2005). Кроме того, при использовании *in vitro* экспериментальной системы зрелых человеческих клеток печени авторы ранее продемонстрировали, что Pdx-1 активирует экспрессию многочисленных β -клеточных маркеров и индуцирует регулируемую глюкозой секрецию процессированного инсулина (Sapir et al., 2005; Meivar-Levy et al., 2007; Aviv et al., 2009; Gefen-Halevi et al., 2010; Meivar-Levy et al., 2011). Индуцированный процесс был связан с экспрессией множества ключевых эндогенных pTF, причем уменьшение гипергликемии было продемонстрировано при транспланта-

ции трансдифференцированных зрелых человеческих клеток печени мышам с диабетом (Sapir et al., 2005). Впрочем, многие другие исследования показали, что использование комбинаций нескольких ключевых TF заметно увеличивает эффективность репрограммирования по сравнению с индуцированной эктопической экспрессией отдельных TF (Kaneto et al., 2005; Tang et al., 2006; Song et al., 2007; Wang et al., 2007; Gefen-Halevi et al., 2010; Zhou et al., 2008; Vierbuchen et al., 2010; Ambasudhan et al., 2011; Pang et al., 2011). Это указывает на потенциально ограниченную способность отдельных эктопических факторов активировать эндогенные дополнительные TF до достаточных уровней, необходимых для эффективного процесса трансдифференцировки (Kaneto et al., 2005; Zhou et al., 2008; Ambasudhan et al., 2011; Pang et al., 2011). Направленное разрушение или временная мисэкспрессия панкреатических факторов транскрипции во время органогенеза поджелудочной железы препятствуют развитию поджелудочной железы, как и дифференцировке и функции островковых клеток (Nishimura et al., 2009). При использовании относительно недостаточной индукции эндогенных TF отдельными эктопическими TF, настоящее изобретение относится к трансдифференцировке как последовательному и временно регулируемому процессу, на который влияет иерархическая сеть TF.

Панкреатическая спецификация инициируется фактором транскрипции гомеобокса Pdx1, который также необходим для β -клеточной функции у взрослых (Offield et al., 1996; Staffers et al., 1997). Эндокринную дифференцировку затем опосредует основной фактор типа спираль-петля-спираль, Ngn3 (Gradwohl et al., 2000). Парные гомеобокс факторы, Pax4 и Arx, участвовали в качестве ключевых факторов при разделении различных типов эндокринных клеток (Collombat et al., 2003; Brun et al., 2008). Заключительное созревание по β -клеточной линии и функции связывают с селективной экспрессией MafA в β -клетках зрелой поджелудочной железы (Kataoka et al., 2002).

Настоящее изобретение частично основано на неожиданном открытии, согласно которому человеческие клетки печени могут быть непосредственно трансдифференцированы с получением клеток совершенно другого типа, вырабатывающих гормоны поджелудочной железы, включая бета-клетки. Применение выбранных факторов транскрипции во временно регулируемой последовательности вызывало трансдифференцировку зрелых клеток печени в функциональные зрелые бета-клетки. Изобретение решает проблему получения больших популяций инсулин-продуцирующих клеток или панкреатических бета-клеток, предоставляя способы размножения и трансдифференцировки зрелых клеток. Композиции, включающие выбранные факторы транскрипции или созданную популяцию трансдифференцированных панкреатических клеток, могут применяться для лечения нарушений функции поджелудочной железы с применением способов, описанных в настоящем изобретении.

В предыдущих попытках по трансдифференцировке непанкреатических клеток в панкреатические клетки, такие как бета-клетки, использовали либо только один фактор транскрипции, либо совместное или одновременное введение больше одного панкреатического фактора транскрипции. В изобретении, описанном в настоящем изобретении, предложены способы упорядоченного, последовательного введения определенных факторов транскрипции в определенные моменты времени. Кроме того, способы, описанные в настоящем изобретении, существенно повышают эффективность трансдифференцировки по сравнению с индуцируемой каждым фактором транскрипции в отдельности.

В настоящем изобретении также предложена популяция клеток, которые обладают повышенной способностью к трансдифференцировке. Указанные клетки характеризуются: (1) потенциальными маркерами клеточной мембраны, (2) наличием способности активировать регуляторный элемент глутаминсинтетазы (GSRE) и (3) уникальной активной Wnt-сигнализацией. По меньшей мере 30% клеток в популяции способны активировать GSRE. Например, клетки являются эндотелиальными клетками, эпителиальными клетками, мезенхимальными клетками, фибробластами или клетками печени. Предпочтительно клетки являются клетками человека. В некоторых вариантах осуществления клетки могут быть трансдифференцированы по панкреатической линии в зрелые панкреатические клетки с панкреатической функцией. В других вариантах осуществления клетки могут быть трансдифференцированы по нервной линии в нервные клетки.

Таким образом, настоящее изобретение также решает проблему предшествующих методик трансдифференцировки или репрограммирования, которые часто имели ограниченную эффективность. Например, хотя эктопическая экспрессия ключевых панкреатических факторов транскрипции приводит к экспрессии в каждой клетке-хозяине, лишь до 15% клеток успешно проходят трансдифференцировку, демонстрируя при этом панкреатическую функцию.

В настоящем изобретении также предложены способы выделения популяции клеток с увеличенной или повышенной способностью к трансдифференцировке. Например, один из способов выделения таких клеток осуществляют посредством сортировки клеток, которые активируют экспрессию GFP, функционально связанного с регуляторным элементом глутаминсинтетазы или его фрагментом, с выделением в результате тех клеток, которые могут активировать GSRE. Клетки могут быть отсортированы с помощью FACS и могут быть выращены в культуре, отдельно от остальной части клеток, для быстрого размножения клеток с увеличенной способностью к трансдифференцировке. Популяция клеток с увеличенной способностью к трансдифференцировке является лишь малой частью клеток, которые составляют ткань

in vivo. Например, в данной ткани или популяции клеток популяция клеток с увеличенной способностью к трансдифференцировке составляет меньше чем приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, приблизительно 10%, приблизительно 15% от всей популяции клеток в данной ткани. Таким образом, в настоящем изобретении также предложены способы отделения указанных клеток с увеличенной способностью к трансдифференцировке от клеток, которые не имеют увеличенной способности к трансдифференцировке. Таким образом, настоящее изобретение обеспечивает преимущество популяции клеток с большей пропорцией клеток, которые обладают повышенной способностью к трансдифференцировке, что увеличивает эффективность трансдифференцировки с получением трансдифференцированных клеток для лечения различных заболеваний или нарушений.

Специалисту в данной области будет очевидно, что в способы, описанные в настоящем изобретении, могут быть внесены различные изменения и модификации в пределах сущности и объема изобретения.

Способы получения бета-клеток поджелудочной железы.

В настоящем изобретении предложены способы получения клеток, которые демонстрируют фенотип зрелых бета-клеток поджелудочной железы, посредством контакта зрелых непанкреатических клеток млекопитающего с панкреатическими факторами транскрипции, такими как PDX-1, Pax-4, NeuroD1 и MafA, в определенные моменты времени. В некоторых вариантах осуществления способы включают контакт зрелой непанкреатической клетки млекопитающего с PDX-1 в первом периоде времени; контакт клеток из первого этапа с Pax-4 во втором периоде времени; и контакт клеток из второго этапа с MafA в третьем периоде времени. В одном варианте осуществления способы включают контакт зрелой непанкреатической клетки млекопитающего с PDX-1 в первом периоде времени; контакт клеток из первого этапа с NeuroD1 во втором периоде времени; и контакт клеток из второго этапа с MafA в третьем периоде времени. В другом варианте осуществления способы включают контакт зрелой непанкреатической клетки млекопитающего с PDX-1 и вторым фактором транскрипции в первом периоде времени и контакт клеток из первого этапа с MafA во втором периоде времени. Факторы транскрипции могут быть полипептидами, рибонуклеиновыми кислотами или нуклеиновыми кислотами, кодирующими полипептиды факторов транскрипции. Например, факторами транскрипции, предусмотренными вместе с PDX-1, являются Pax-4, NeuroD1, Ngn3 или Sox-9.

Предпочтительно, фактором транскрипции является NeuroD1.

В одном аспекте способы, описанные в настоящем изобретении, дополнительно включают контакт клеток в течение, до или после любого из вышеуказанных этапов с фактором транскрипции Sox-9.

В одном аспекте второй период времени наступает по меньшей мере через 24 ч после первого периода времени. В одном аспекте третий период времени наступает по меньшей мере через 24 ч после второго периода времени. В некоторых вариантах осуществления второй и третий период времени могут наступать по меньшей мере через 24 ч, по меньшей мере 48 ч, по меньшей мере 72 ч и по меньшей мере через 1 неделю или больше после первого или второго периода времени соответственно.

Факторы транскрипции для применения в настоящем изобретении могут быть полипептидом, рибонуклеиновой кислотой или нуклеиновой кислотой. При использовании в настоящем описании, термин "нуклеиновая кислота" включает молекулы ДНК (например, кДНК или геномную ДНК), молекулы РНК (например, мРНК, микроРНК или другие производные РНК), аналоги ДНК или РНК, полученные при использовании аналогов нуклеотидов, и их производные, фрагменты и гомологи. Молекула нуклеиновой кислоты может быть одноцепочечной или двухцепочечной. Предпочтительно нуклеиновой кислотой является ДНК.

Предпочтительными факторами транскрипции для применения в способах, описанных в настоящем изобретении, являются PDX-1, Pax-4, NeuroD1 и MafA. Другими факторами транскрипции, которые могут использоваться, являются Ngn3 и Sox9.

Гомеодоменный белок PDX-1 (панкреатодуоденального гомеобокса ген-1), также известный как IDX-1, IPF-1, STF-1 или IUF-1, играет центральную роль в регулировании развития и функции островков Лангерганса. PDX-1, прямо или косвенно, участвует в специфичной экспрессии в островковых клетках различных генов, таких как, например, инсулин, глюкагон, соматостатин, проинсулин-конвертаза 1/3 (PC 1/3), GLUT-2 и глюкокиназа. Кроме того, PDX-1 опосредует транскрипцию гена инсулина в ответ на глюкозу. Подходящие источники нуклеиновых кислот, кодирующих PDX-1, включают например нуклеиновую кислоту PDX-1 человека (и кодируемые белковые последовательности), доступный под рег. номерами GenBank U35632 и AAA88820 соответственно. Другие источники включают нуклеиновую кислоту PDX крысы и последовательности белков, показанные в GenBank U35632 и AAA18355, соответственно, и полностью включены в настоящее изобретение посредством отсылки. Дополнительный источник включает нуклеиновую кислоту PDX-1 Данио-рерио, а также белковые последовательности, показанные в GenBank AF036325 и AAC41260, соответственно, которые полностью включены в настоящее изобретение посредством отсылки.

Pax-4, также известный как парный бокс 4, белок paired box 4, ген paired box 4, MODY9 и KPD, панкреато-специфический фактор транскрипции, который связывается с элементами промоторов глюкагона, инсулина и соматостатина, и, как считают, играет важную роль в дифференцировке и развитии бета-

клеток панкреатических островков. В некоторых клеточных условиях Pax-4 демонстрирует репрессорную активность. Подходящие источники нуклеиновых кислот, кодирующих Pax-4, включают например нуклеиновые кислоты Pax-4 человека (и кодируемые белковые последовательности), доступные под номерами GenBank NM_006193.2 и AAD02289.1 соответственно.

MafA, также известный как V-maf, мышечно-апоневротической фибросаркомы онкогена гомолог A или RIPE3B1, является специфическим бета-клеточным и глюкоза-регулируемым транскрипционным активатором экспрессии гена инсулина. MafA может участвовать в функции и развитии бета-клеток, как и в патогенезе диабета. Подходящие источники нуклеиновых кислот, кодирующих MafA, включают, например, нуклеиновую кислоту MafA человека (и кодируемые белковые последовательности), доступные под номерами GenBank NM_201589.3 и P_963883.2 соответственно.

Neurog3, также известный как нейрогенин 3 или Ngn3, является фактором транскрипции с основным мотивом спираль-петля-спираль (bHLH), требуемым для эндокринного развития поджелудочной железы и кишечника. Подходящие источники нуклеиновых кислот, кодирующих Neurog3, включают например нуклеиновую кислоту Neurog3 человека (и кодируемые белковые последовательности), доступные под номерами GenBank NM_020999.3 и NP_066279.2 соответственно.

NeuroD1, также известный как Neuro Differentiation 1 и бета-2 (β 2), является фактором транскрипции типа Neuro D. Это фактор транскрипции с основным мотивом спираль-петля-спираль, который образует гетеродимеры с другими bHLH-белками и активирует транскрипцию генов, которые содержат специфическую последовательность ДНК, известную как E-бокс. Он регулирует экспрессию гена инсулина, при этом мутации в данном гене приводят к сахарному диабету II типа. Подходящие источники нуклеиновых кислот, кодирующих NeuroD1, включают, например, нуклеиновую кислоту NeuroD1 человека (и кодируемые белковые последовательности), доступные под номерами GenBank NM_002500.4 и NP_002491.2 соответственно.

Sox9 - фактор транскрипции, который участвует в эмбриональном развитии. Sox9, прежде всего, исследовали из-за его важности в развитии костной ткани и скелета. SOX-9 распознает последовательность CCTTGAG наряду с другими представителями ДНК-связывающих белков HMG-бокс класса. В рамках настоящего изобретения использование Sox9 может быть включено в поддержание клеточной массы панкреатических клеток-предшественников, до или после индукции трансдифференцировки. Подходящие источники нуклеиновых кислот, кодирующих NeuroD1, включают, например, нуклеиновую кислоту NeuroD1 человека (и кодируемые белковые последовательности), доступные под номерами GenBank NM_000346.3 и NP_000337.1 соответственно.

Клетка может быть любой клеткой, которая способна к продукции панкреатических гормонов, например, клеткой костного мозга, мышцы, селезенки, почки, крови, кожи, поджелудочной железы или печени. В одном варианте осуществления клетка является непанкреатической клеткой. В другом варианте осуществления клетка способна функционировать как клетка островков Лангерганса, т.е. накапливать, процессировать и секретировать гормоны поджелудочной железы, предпочтительно инсулин, в ответ на внеклеточный триггер. В другом варианте осуществления клетка является клеткой печени. В дополнительных вариантах осуществления клетка является тотипотентной или плюрипотентной. В альтернативных вариантах осуществления клетка является гематопозитической стволовой клеткой, эмбриональной стволовой клеткой или, предпочтительно, стволовой клеткой печени.

Популяция клеток, которую подвергают воздействию, т.е. контакту с соединениями (т.е. полипептидами PDX-1, Pax-4, MafA, NeuroD1 и/или Sox-9 или нуклеиновой кислотой, кодирующей полипептиды PDX-1, Pax-4, MafA, NeuroD1 и/или Sox-9), может быть любым количеством клеток, т.е. одной или более клетками, и может быть предоставлена *in vitro*, *in vivo* или *ex vivo*. Популяция клеток, которая контактирует с факторами транскрипции, может быть размножена *in vitro* перед контактом с факторами транскрипции. Полученная популяция клеток демонстрирует фенотип зрелых бета-клеток поджелудочной железы. Эти клетки могут быть размножены *in vitro* методами, известными в уровне техники, перед трансдифференцировкой и созреванием по β -клеточной линии, и перед введением или доставкой пациенту или субъекту, нуждающемуся в этом.

Субъектом предпочтительно является млекопитающее. Млекопитающее может быть, например, человеком, не относящимся к человеку приматом, мышью, крысой, собакой, кошкой, лошадью или коровой.

В некоторых вариантах осуществления фактор транскрипции является полипептидом, таким как PDX-1, Pax-4, MafA, NeuroD1 или Sox-9, или их комбинацией, при этом его доставляют в клетку методами, известными в уровне техники. Например, полипептид фактора транскрипции вводят в клетки непосредственно или доставляют с помощью микрочастицы или наночастицы, например, липосомного носителя.

В некоторых вариантах осуществления фактор транскрипции является нуклеиновой кислотой. 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 введена в клетку любым способом, известным в уровне техники. В некоторых вариантах осуществления

нуклеиновую кислоту включают в вектор экспрессии или вирусный вектор. Предпочтительно вирусный вектор является аденовирусным вирусным вектором. Экспрессионный или вирусный вектор может быть введен в клетку любым из следующих методов: трансфекция, электропорация, инфицирование или трансдукция.

Популяции клеток, предрасположенных к трансдифференцировке.

В настоящем изобретении предложены популяции полученных из печени клеток, которые предрасположены к трансдифференцировке. Популяции клеток могут применяться в способах получения панкреатических бета-клеток, описанных в настоящем изобретении. Клетки, которые предрасположены к трансдифференцировке согласно настоящему изобретению, также указаны как имеющие повышенную или увеличенную способность к трансдифференцировке. Под "увеличенной способностью к трансдифференцировке" понимается, что когда популяцию клеток настоящего изобретения подвергают протоколу дифференцировки (т.е. введению панкреатического фактора транскрипции), более 15%, более 20%, более 30%, более 40%, более 50%, более 60%, более 70% или более 80% дифференцируется в клетки другого типа. Например, популяция эндотелиальных клеток, эпителиальных клеток, мезенхимальных клеток, фибробластов или клеток печени с увеличенной способностью к трансдифференцировке может быть дифференцирована в зрелые панкреатические клетки или зрелые нервные клетки.

В другом варианте осуществления популяции клеток, которые предрасположены к трансдифференцировке, обладают способностью активировать глутаминсинтетазу-отвечающий элемент (GSRE). Например, в популяциях клеток настоящего изобретения 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. Предпочтительно, по меньшей мере 30% клеток в популяции способны активировать GSRE. Глутаминсинтаза является ферментом, преимущественно экспрессирующимся в мозге, почках и печени, и играет важную роль в метаболизме азота, катализируя конденсацию глутамата и аммиака с образованием глутамина. Глутаминсинтаза, например, уникально экспрессируется в периферическом клетках печени и астроцитах в мозге. Данные, представленные в настоящем изобретении, указывают, что клетки, которые демонстрируют активацию GSRE, обеспечивают уникальный селективный параметр для выделения клеток, предрасположенных к трансдифференцировке.

Активация GSRE может быть измерена способами, известными среднему специалисту в данной области техники. Например, может быть получен рекомбинантный аденовирус, содержащий глутаминсинтазу-отвечающий элемент, функционально связанный с промотором и репортерным геном, таким как флуоресцентный белок. Этот рекомбинантный аденовирус с GSRE-репортером может быть введен в гетерогенную смесь клеток, содержащих некоторую пропорцию клеток, которые предрасположены к трансдифференцировке. Те клетки, которые способны к активации GSRE, будут экспрессировать репортерный ген, который может быть обнаружен методами, известными в уровне техники, с идентификацией клеток, предрасположенных к трансдифференцировке.

Гетерогенная популяция клеток, в которой неизвестны клетки, которые предрасположены к трансдифференцировке, может быть подвергнута контакту с аденовирусным вектором, который содержит GSRE, функционально связанный с минимальным ТК промотором и eGFP. Клетки, которые могут активировать GSRE, будут экспрессировать GFP и могут быть обнаружены различными методами, известными в уровне техники для обнаружения экспрессии GFP. Например, отделение GSRE-активированных клеток, которые предрасположены к трансдифференцировке, от клеток, которые не предрасположены к трансдифференцировке, может быть выполнено с помощью прибора FACs, сортера и методик, известных специалистам в данной области техники (фиг. 14). Выделенные клетки, которые предрасположены к трансдифференцировке, могут быть затем выращены или размножены *in vitro*. Результаты, описанные в настоящем изобретении, демонстрируют, что пассирование клеток, предрасположенных к трансдифференцировке, в 5-12 или больше пассажах сохраняет их способность к трансдифференцировке. Например, выделенные клетки печени, предрасположенные к трансдифференцировке, продолжают вырабатывать и секретировать инсулин в глюкозозависимом механизме даже после 12 пассажей в культуре (фиг. 17).

В другом варианте осуществления популяции клеток, которые предрасположены к трансдифференцировке, также имеют активные сигнальные пути Wnt. Сигнальные пути Wnt играют значительную роль в плюрипотентности стволовой клетки и направлении дифференцировки клетки во время развития, а также в формировании оси тела, пролиферации клеток и миграции клеток. Сигнальные пути Wnt активируются при связывании лиганда Wnt-белка с рецептором семейства Frizzled (Fz) (рецептором, сопряженным с G-белком), необязательно активируя корецепторный белок и последующую активацию эндоплазматического белка под названием Dishevelled (Dsh). В каноническом пути Wnt корецептор LRP-5/6 также активируется и бета-катенин накапливается в цитоплазме и, в конечном счете, перемещается в ядро, действуя в качестве транскрипционного коактиватора факторов транскрипции TCF/LEF. Без сигнализации Wnt, разрушающий комплекс, который включает белки аденоматозного полипоза толстой кишки (APC), аксин, протеинфосфатазу 2A (PP2A), киназу гликогенсинтазы 3 (GSK3) и казеинкиназу 1 α (CK1 α), воз-

действует на β -катенин, вызывая его убиквитинирование и последующее разложение протеасомой. Впрочем, активация рецептора Frizzled при связывании Wnt вызывает разборку разрушающего комплекса и позволяет таким образом накапливаться β -катенину.

Сигнализация Wnt также может проходить через неканонические пути, в которых используются другие корецепторные белки и активируются другие нижестоящие эффекторы, например, для регуляции цитоскелета, стимуляции высвобождения кальция из эндоплазматического ретикулума, активации путей mTOR и регуляции миогенеза.

Специалист в данной области техники с легкостью сумеет использовать способы, известные в уровне техники, для определения активации сигнальных путей Wnt. Например, клетки, которые экспрессируют Wnt3a, пониженные уровни DKK1 или DKK3, пониженные уровни APC, повышенные уровни активированного бета-катенина или STAT3 связывающие элементы, имеют активные сигнальные пути Wnt. DKK1, DKK3 и APC - известные ингибиторы сигнальных путей Wnt. Другие сигнальные эффекторы, которые указывают на активные сигнальные пути Wnt, известны в уровне техники.

Предпочтительно популяции клеток предрасположены к трансдифференцировке по панкреатической линии, где трансдифференцированные клетки демонстрируют панкреатический фенотип и функцию. Например, трансдифференцированные клетки демонстрируют фенотип и функцию зрелых бета-клеток поджелудочной железы, что включает, без ограничения, экспрессию, продукцию и/или секрецию панкреатических гормонов. Панкреатические гормоны могут включать, без ограничения перечисленными, инсулин, соматостатин, глюкагон или островковый амилоидный полипептид (IAPP). Инсулин может быть инсулином печени или инсулином сыворотки. Предпочтительно инсулин является полностью процессированной формой инсулина, способной активировать утилизацию глюкозы и метаболизм углеводов, жиров и белков. Например, клетки, предрасположенные к трансдифференцировке, могут охватывать приблизительно 15% всех клеток в гетерогенной *in vitro* первичной культуре клеток печени человека. Когда клетки эктопически экспрессируют pTF, больше 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50% клеток в культуре продуцируют инсулин или секретируют С-пептид.

В одном варианте осуществления популяции клеток, которые предрасположены к трансдифференцировке, расположены в непосредственной близости от центральных вен печени, или являются периферическими клетками печени. Как показано в настоящем изобретении, хотя более 40-50% клеток печени эктопически экспрессируют панкреатические факторы транскрипции, такие как PDX-1, только субпопуляция клеток вырабатывает инсулин при экспрессии pTF. Такие инсулинпродуцирующие клетки (IPC) были, прежде всего, расположены близко к вентральным венам, как показано на фиг. 1В. Эти клетки также характеризуются экспрессией глутаминсинтетазы и активной сигнализацией Wnt.

В другом предпочтительном варианте осуществления популяции клетки настоящего изобретения предрасположены к трансдифференцировке по невральная линия, где трансдифференцированные клетки экспрессируют нейроспецифические маркеры, демонстрируют невральную фенотип или демонстрируют невральную функцию. Трансдифференцированные клетки могут быть нейронами или глиальными клетками.

В другом варианте осуществления клетки с увеличенной предрасположенностью к трансдифференцировке могут быть идентифицированы по специфическим маркерам клеточной поверхности. Например, клетки с увеличенными уровнями HOMER1, LAMP3 или BMPR2 указывают на клетки с увеличенной способностью к трансдифференцировке по сравнению с клетками без предрасположенности к трансдифференцировке. Клетки с пониженными уровнями ABCB1, ITGA4, ABCB4 или PRNP указывают на клетки с увеличенной способностью к трансдифференцировке по сравнению с клетками без предрасположенности к трансдифференцировке. Любая комбинация описанных маркеров клеточной поверхности может использоваться для определения отличия популяции клеток, предрасположенных к трансдифференцировке, от популяции клеток, которые не предрасположены к трансдифференцировке. Антитела к указанным маркерам клеточной поверхности коммерчески доступны. Иммуноанализ или иммуноаффинные методики, известные в уровне техники, могут использоваться, чтобы отличать клетки с увеличенной способностью к трансдифференцировке от клеток без способности к трансдифференцировке.

Применение популяций клеток настоящего изобретения для получения клеток, которые демонстрируют фенотипы панкреатических клеток, обеспечивает определенные преимущества по сравнению с дифференцировкой гетерогенных популяций непанкреатических клеток с целью получения клеток, которые демонстрируют фенотипы панкреатических клеток. Предыдущие исследования, которые описывают экспрессию панкреатического фактора транскрипции (pTF), такого как PDX-1, в гетерогенной популяции непанкреатических клеток (т.е. клеток печени), показывают, что в лучшем случае лишь 15% клеток, экспрессирующих PDX-1, способны вырабатывать инсулин. Поэтому только 15% клеток были успешно дифференцированы в зрелую панкреатическую бета-клетку, способную к продуцированию и секретированию панкреатических гормонов. Напротив, введение pTF в популяции клеток настоящего изобретения приводит к дифференцировке 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 в зрелые бета-клетки с панкреатическим фенотипом, например, продуцирующие инсулин, глюкагон и/или секретирующие С-

пептид. Предпочтительно, когда клетки в популяции клеток настоящего изобретения экспрессируют панкреатический фактор транскрипции, по меньшей мере 30% клеток вырабатывают инсулин или секретируют С-пептид.

Способы трансдифференцировки.

В настоящем изобретении также предложены способы применения популяции клеток с увеличенной способностью к трансдифференцировке для получения клеток, которые демонстрируют зрелый дифференцированный тип клеток, где дифференцированная клетка имеет отличный фенотип от исходной популяции клеток. Например, популяция клеток с увеличенной способностью к трансдифференцировке (т.е. эпителиальных клеток, фибробластов или клеток печени) может быть дифференцирована в клетки по панкреатической или невральной линии, демонстрирующие фенотипы зрелых дифференцированных панкреатических или нервных клеток. Могут быть использованы любые способы, известные в уровне техники, для дифференцировки клеток в панкреатическую или невральную линию.

В одном варианте осуществления популяция клеток, предрасположенная к трансдифференцировке, может быть дифференцирована по невральной линии путем экспрессии невральных факторов транскрипции. Подходящие невральные факторы транскрипции известны в уровне техники. В других вариантах осуществления популяция клеток настоящего изобретения может быть дифференцирована в зрелые нервные клетки при контакте клеток с различными цитокинами, факторами роста или другими средствами, известными в уровне техники для дифференцировки клеток в невральную линию. Дифференцированные нервные клетки могут экспрессировать нейроспецифические маркеры, демонстрировать невральный фенотип (т.е. невральный профиль экспрессии генов) или демонстрировать невральную функцию. Дифференцированные клетки могут быть нейронами или глиальными клетками.

В другом варианте осуществления популяция клеток, предрасположенная к трансдифференцировке, может быть дифференцирована по панкреатической линии путем экспрессии панкреатических факторов транскрипции. Панкреатическими факторами транскрипции являются, например, PDX-1, Pax-4, MafA, NeuroD1 или их комбинация. Способы получения панкреатических бета-клеток описаны в патенте США 6774120 и публикации США 2005/0090465, содержание которых полностью включено посредством отсылки.

В другом варианте осуществления популяция клеток, предрасположенная к трансдифференцировке, может быть дифференцирована по панкреатической линии с помощью способов, описанных в настоящем изобретении.

Фенотипы панкреатических бета-клеток.

Способы, предложенные в настоящем изобретении, позволяют получать клетки с фенотипом или функцией зрелых панкреатических бета-клеток. Под "фенотипом или функцией панкреатических бета-клеток" понимается, что клетка проявляет одну или более особенностей, типичных для панкреатических бета-клеток, т.е. продукцию панкреатических гормонов, процессинг, накопление в секреторных гранулах, секрецию гормонов, активацию промоторов панкреатических генов, или характерный профиль экспрессии генов бета-клеток. Секреция гормонов включает регулируемую питанием и/или гормонами секрецию. Предпочтительно полученные клетки демонстрируют по меньшей мере один фенотип или функцию панкреатических бета-клеток, как описано в настоящем изобретении.

Панкреатический гормон может быть, например, инсулином, глюкагоном, соматостатином или островковым амилоидным полипептидом (IAPP). Инсулин может быть инсулином печени или инсулином сыворотки. В другом варианте осуществления панкреатический гормон является инсулином печени. В альтернативном варианте осуществления панкреатический гормон является инсулином сыворотки (т.е. полностью процессированной формой инсулина, способной активировать, например, утилизацию глюкозы, метаболизм углеводов, жиров и белков).

В некоторых вариантах осуществления панкреатический гормон находится в форме "прогормона". В других вариантах осуществления панкреатический гормон находится в полностью процессированной биологически активной форме гормона. В других вариантах осуществления панкреатический гормон находится под регуляторным контролем, т.е. секреция гормона находится под пищевым и гормональным контролем, подобно эндогенно вырабатываемым панкреатическим гормонам. Например, в одном аспекте изобретения гормон находится под регуляторным контролем глюкозы. Секреция инсулина может быть также измерена, например, по процессингу и секреции С-пептида.

Фенотип панкреатических бета-клеток может быть определен, например, при измерении продукции панкреатического гормона, т.е. мРНК белка инсулина, соматостатина или глюкагона, или экспрессии белка. Продукция гормона может быть определена способами, известными в уровне техники, т.е. с помощью иммуноанализа, вестерн-блоттинга, анализов связывания рецептора, или функционально, по способности снижать гипергликемию после имплантации реципиенту с диабетом.

В некоторых вариантах осуществления клетки могут быть направлены на продукцию и секрецию инсулина при использовании способов, описанных в настоящем изобретении. Способность клетки вырабатывать инсулин может быть протестирована множеством способов, известных средним специалистам в данной области техники. Например, мРНК инсулина может быть обнаружена с помощью ОТ-ПЦР, или инсулин может быть обнаружен антителами, индуцированными против инсулина. Кроме того, другие

индикаторы панкреатической дифференцировки включают экспрессию генов Isl-1, Pdx-1, Pdx-4, Pdx-6 и Glut-2. Другие фенотипические маркеры для идентификации островковых клеток раскрыты в заявке U.S. 2003/0138948, полностью включенной в настоящее изобретение.

Фенотип панкреатических бета-клеток может быть определен, например, по активации промоторов генов, специфических для поджелудочной железы. Панкреатоспецифические промоторы, представляющие особый интерес, включают промоторы инсулина панкреатических факторов транскрипции, т.е. эндогенного PDX-1. Активация промотора может быть определена известными методами, например, с помощью люциферазного анализа, EMSA или обнаружения экспрессии нижестоящих генов.

В некоторых вариантах осуществления фенотип панкреатической бета-клетки может быть также определен по индукции профиля экспрессии панкреатических генов. Под "профилем экспрессии панкреатических генов" понимается: экспрессия одного или более генов, которые обычно являются транскрипционно молчащими в неэндокринных тканях, т.е. панкреатического фактора транскрипции, панкреатических ферментов или панкреатических гормонов. Панкреатическими ферментами являются, например, PCSK2 (PC2 или прогормонконвертаза), PC 1/3 (прогормонконвертаза 1/3), глюкокиназа, переносчик глюкозы 2 (GLUT-2).

Панкреатоспецифические факторы транскрипции включают, например, Nkx2.2, Nkx6.1, Pdx-4, Pdx-6, MafA, NeuroD1, NeuroG3, Ngn3, бета-2, ARX, BRAIN4 и Isl-1.

Индукция профиля экспрессии панкреатических генов может быть обнаружена при использовании методик, известных среднему специалисту в данной области техники. Например, последовательности РНК панкреатических гормонов могут быть обнаружены, например, в Нозерн-блот гибридационном анализе, методах обнаружения на основе амплификации, таких как полимеразная цепная реакция на основе обратной транскрипции, или при системном детектировании с помощью микроматричного анализа. В альтернативе экспрессия может также быть измерена на белковом уровне, т.е. путем измерения уровней полипептидов, кодируемых геном. В определенном варианте осуществления экспрессия гена или белка PC1/3 может быть определена по его активности в процессинге прогормонов в их активную зрелую форму. Такие методы известны в уровне техники и включают, например, иммуноанализы на основе антител к белкам, кодируемым генами, или ВЭЖХ процессированных прогормонов.

В некоторых вариантах осуществления клетки, демонстрирующие фенотип зрелых бета-клеток, полученные способами, описанными в настоящем изобретении, могут подавлять по меньшей мере один ген или профиль экспрессии гена исходной клетки. Например, клетка печени, у которой индуцирован фенотип зрелой бета-клетки, может подавлять по меньшей мере один ген, специфический для печени. Специалист в данной области с легкостью сумеет определить экспрессию специфического для печени гена исходной клетки и полученных клеток при использовании способов, известных в уровне техники, т.е. измерения уровней мРНК или полипептидов, кодируемых генами. При сравнении снижение экспрессии специфического для печени гена указывала бы на то, что прошла трансдифференцировка.

Способы лечения панкреатического нарушения.

В настоящем изобретении раскрыты способы применения в лечении, т.е. предотвращении или задержке начала, или облегчении симптома, панкреатического нарушения у субъекта. Например, панкреатическое нарушение является дегенеративным панкреатическим нарушением. Способы, раскрытые в настоящем изобретении, особенно полезны для таких панкреатических нарушениях, которые вызваны или приводят к потере клеток поджелудочной железы, например, островковых бета-клеток, или потере функции панкреатических клеток.

Распространенные дегенеративные панкреатические нарушения включают, без ограничения перечисленными: диабет (например, I типа, II тип или гестационный) и рак поджелудочной железы. Другими панкреатическими нарушениями или связанными с поджелудочной железой нарушениями, которые можно лечить с применением способов, раскрытых в настоящем изобретении, являются, например, гипергликемия, панкреатит, псевдокисты поджелудочной железы или поражение поджелудочной железы, вызванное повреждением.

Диабет является нарушением обмена веществ, присутствующим в трех формах: 1 тип, 2 тип и гестационный. Тип 1, или IDDM (инсулинозависимый сахарный диабет), является аутоиммунным заболеванием; иммунная система разрушает инсулин-продуцирующие бета-клетки поджелудочной железы, снижая или устраняя способность поджелудочной железы вырабатывать инсулин. Больной диабетом 1 типа должен ежедневно принимать дополнительное количество инсулина, чтобы поддерживать свою жизнь. Симптомы обычно развиваются быстро и включают повышенную жажду и мочеиспускание, постоянное чувство голода, потерю веса, нечеткое зрение и усталость. Диабет 2 типа является наиболее распространенным, присутствуя у 90 - 95 процентов больных диабетом. Он ассоциируется с пожилым возрастом, ожирением, семейным анамнезом, предшествующим гестационным диабетом, сниженной физической активностью и этнической принадлежностью. Гестационный диабет встречается только при беременности. Женщины, у которых развивается гестационный диабет, имеют 20-50-процентную вероятность развития диабета 2 типа в течение пяти - 10 лет.

Субъекта, страдающего или подверженного риску развития диабета, идентифицируют методами, известными в уровне техники, например, путем определения уровней глюкозы в крови. Например, зна-

чение глюкозы в крови выше 140 мг/дл по меньшей мере в двух случаях утром натощак означает, что человек имеет диабет. Лицо, не страдающее или не подвергающееся риску развития диабета, характеризуется как имеющее уровни сахара натощак в пределах 70-110 мг/дл.

Симптомы диабета включают усталость, тошноту, частое мочеиспускание, избыточную жажду, потерю веса, нечеткое зрение, частые инфекции и медленное заживление ран или повреждений кожи, артериальное давление постоянно на уровне или выше 140/90, холестерин ЛПВП ниже 35 мг/дл или триглицериды выше 250 мг/дл, гипергликемия, гипогликемия, дефицит инсулина или инсулинорезистентность. Больных диабетом или лиц, предрасположенных к диабету, которым вводят соединения, идентифицируют при использовании диагностических методов, известных в уровне техники.

Гипергликемия является нарушением, связанным с поджелудочной железой, при котором избыточное количество глюкозы циркулирует в плазме крови. Обычно при гипергликемии уровень глюкозы превышает 200 мг/дл. Субъект с гипергликемией может иметь диабет или не иметь диабет.

Рак поджелудочной железы является четвертым из наиболее распространенных онкологических заболеваний в США, главным образом встречается у людей старше 60 лет и имеет самую низкую пятилетнюю выживаемость из всех типов рака.

Аденокарцинома, самый распространенный тип рака поджелудочной железы, встречается в выстилающей оболочке протока поджелудочной железы; цистаденокарцинома и ацинарноклеточная карцинома встречаются реже. Однако доброкачественные опухоли также растут в поджелудочной железе; они включают инсулиному - опухоль, которая секретирует инсулин, гастриному, которая секретирует повышенные уровни гастрина, и глюкагоному, опухоль, которая секретирует глюкагон.

Рак поджелудочной железы не имеет известных причин, а только нескольких рисков, включая диабет, курение сигарет и хронический панкреатит. Симптомы могут включать боль в верхней области живота, плохой аппетит, желтуху, потерю веса, диспепсию, тошноту или рвоту, понос, усталость, зуд или увеличенные органы брюшной полости. Диагноз ставят, используя ультразвук, компьютерную томографию, магнитно-резонансную томографию, ЭРХПГ, чрескожную чреспеченочную холангиографию, биопсию поджелудочной железы или анализы крови. Лечение может включать хирургическую операцию, лучевую терапию или химиотерапию, терапию боли или зуда, пероральные препараты ферментов или инсулинотерапию.

Панкреатит является воспалением и самоперевариванием поджелудочной железы. При самопереваривании поджелудочная железа разрушается своими собственными ферментами, что вызывает воспаление. Острый панкреатит обычно включает только один случай, после которого поджелудочная железа возвращается в нормальное состояние. Хронический панкреатит, в то же время, включает постоянное повреждение поджелудочной железы и нарушение ее функции и может приводить к фиброзу. С другой стороны, он может проходить после нескольких приступов. Панкреатит наиболее часто вызывают желчные конкременты, блокирующие проток поджелудочной железы, или злоупотребление алкоголем, которое может приводить к блокированию малых протоков поджелудочной железы. Другие причины включают травму живота или абдоминальную хирургию, инфекции, почечную недостаточность, волчанку, муковисцидоз, опухоль или укусы скорпиона.

Симптомы, часто ассоциируемые с панкреатитом, включают боль в животе, возможно отдающую в спину или грудь, тошноту или рвоту, учащенный пульс, лихорадку, вздутие в верхней области живота, асцит, пониженное давление или умеренную желтуху. Симптомы могут быть отнесены к другим болезням перед их идентификацией как связанных с панкреатитом. Способ лечения неврологических нарушений В настоящем изобретении также предложены способы лечения субъекта с неврологическим заболеванием или нарушением, таким как нейродегенеративное заболевание или нарушение. Популяция клеток, описанных в настоящем изобретении, может применяться для лечения субъекта с неврологическим заболеванием или нарушением, которое характеризуется потерей нервных клеток или нервной функции, посредством восполнения дегенеративных или нефункциональных клеток. Нейродегенеративные заболевания, которые можно лечить с применением способов, описанных в настоящем изобретении, включают, без ограничения перечисленными, болезнь Паркинсона, паркинсонические нарушения, болезнь Альцгеймера, болезнь Хантингтона, амиотрофический боковой склероз, болезнь телец Леви, возрастную нейродегенерацию, неврологический рак и травму головного мозга, возникшую в результате хирургической операции, аварии, ишемии или инсульта. Популяция клеток, описанных в настоящем изобретении, может быть дифференцирована в популяцию нервных клеток с нервной функцией, после чего дифференцированная популяция нервных клеток может быть введена субъекту с неврологическим заболеванием или нарушением.

Композиции терапевтических средств.

Описанные в настоящем изобретении индуцирующие трансдифференцировку соединения или эктопические панкреатические факторы транскрипции (т.е. полипептиды PDX-1, Pax-4, MafA, NeuroD1 или Sox-9, рибонуклеиновые кислоты или нуклеиновые кислоты, кодирующие полипептиды PDX-1, Pax-4, MafA, NeuroD1 или Sox-9), в случае терапевтического применения, именуется в настоящем изобретении как "терапевтические средства". Способы введения терапевтических средств включают, без ограничения перечисленными, кожный, внутримышечный, внутрибрюшинный, внутривенный, подкожный, интрана-

зальный, эпидуральный и пероральный пути. Терапевтические средства настоящего изобретения могут быть введены любым удобным путем, например инфузией или болюсной инъекцией, абсорбцией через эпителиальную или кожно-слизистую оболочку (например, слизистую оболочку полости рта, слизистую оболочку прямой кишки и кишечника, и т.д.) и могут быть введены вместе с другими биологически активными средствами. Введение может быть системным или местным. Кроме того, может быть выгодным ввести терапевтическое средство в центральную нервную систему любым подходящим путем, включая интравентрикулярную и интратекальную инъекцию. Интравентрикулярная инъекция может быть облегчена применением интравентрикулярного катетера, присоединенного к резервуару (например, резервуару Оммайя). Ингаляционное введение также может применяться при помощи ингалятора или небулайзера, а также состава с пропеллентом. Может быть также желательным применять терапевтическое средство местно на участке, требующем обработки; это может быть выполнено, например, без ограничения, посредством местной инфузии во время хирургической операции, наружного применения, инъекции, с помощью зонда, с применением суппозитория или имплантата. Различные системы доставки известны и могут применяться для введения терапевтического средства настоящего изобретения, включая, например: (i) инкапсулирование в липосомы, микрокапсулы, микрокапсулы; (ii) рекомбинантные клетки, способные экспрессировать терапевтическое средство; (iii) рецептор-опосредованный эндоцитоз (см., например, Wu and Wu, 1987. *J Biol Chem* 262:4429-4432); (iv) конструирование терапевтической нуклеиновой кислоты как части ретровирусного, аденовирусного или другого вектора, и т.п. В одном варианте осуществления настоящего изобретения терапевтическое средство может быть доставлено в везикуле, в особенности липосоме. В липосоме белок настоящего изобретения объединен, в дополнение к другим фармацевтически приемлемым носителям, с амфифильными веществами, такими как липиды, которые существуют в агрегированной форме в виде мицелл, нерастворимых монослоев, жидких кристаллов или ламеллярных слоев в водном растворе. Подходящие липиды для липосомной композиции включают, без ограничения, моноглицериды, диглицериды, сульфатиды, лизолецитин, фосфолипиды, сапонин, желчные кислоты и т.п. Получение таких липосомных композиций известно специалистам в данной области техники, как раскрыто, например, в патенте США 4,837,028 и патенте США 4,737,323, которые включены в настоящее изобретение посредством отсылки. В еще одном варианте осуществления терапевтическое средство может быть доставлено в системе с контролируемым высвобождением, включающей, например: подающий насос (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 помещена в близости терапевтической мишени (например, мозга), требуя при этом лишь части системной дозы. См., например, Goodson, *Medical Applications of Controlled Release*, 1984 (CRC Press, Boca Raton, Fla.).

В определенном варианте осуществления настоящего изобретения, где терапевтическим средством является нуклеиновая кислота, кодирующая белок, терапевтическая нуклеиновая кислота может быть введена *in vivo*, чтобы активировать экспрессию кодируемого ею белка, создавая ее как часть подходящего нуклеотидного вектора экспрессии и ввода ее так, чтобы она становилась внутриклеточной (например, при использовании ретровирусного вектора, прямой инъекцией, при использовании бомбардировки микрочастицами, при покрытии липидами или поверхностными клеточными рецепторами или трансфицирующими агентами), или ввода ее в связи с гомеобокс-подобным пептидом, который, как известно, поступает в ядро (см., например, Joliot, et al., 1991. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:1864-1868), и т.п. В альтернативе терапевтическая нуклеиновая кислота может быть введена внутриклеточно и включена в ДНК клетки-хозяина для экспрессии, гомологичной рекомбинации, или может оставаться эпизомной.

Предпочтительно терапевтическое средство вводят внутривенно. В частности, терапевтическое средство может быть доставлено путем инфузии в воротную вену.

При использовании в настоящем описании, термин "терапевтически эффективное количество" означает общее количество каждого активного компонента фармацевтической композиции или способа, которое является достаточным, чтобы обеспечить значимый эффект для пациента, т.е. лечение, заживление, предотвращение или уменьшение тяжести соответствующего заболевания, или увеличение эффективности лечения, заживления, предотвращения или уменьшения тяжести таких состояний. В случае применения в отношении отдельного действующего компонента, вводимого самостоятельно, термин относится к указанному компоненту в отдельности. В случае применения в отношении комбинации, данный термин относится к объединенным количествам действующих компонентов, которые обеспечивают терапевтический эффект, независимо от введения в комбинации, последовательно или одновременно.

Количество терапевтического средства изобретения, которое будет эффективно при лечении конкретного нарушения или состояния, будет зависеть от природы нарушения или состояния, и может быть определено с помощью стандартных клинических методик средними специалистами в данной области техники. Кроме того, могут необязательно использоваться анализы *in vitro*, способствующие установлению оптимальных диапазонов дозы. Точная доза, которая будет использоваться в лекарственной форме, будет также зависеть от пути введения и общей тяжести заболевания или нарушения, и должна быть определена согласно решению практикующего медицинского работника и состоянию каждого пациента. В конечном счете, лечащий врач будет определять количество белка настоящего изобретения для лечения

каждого конкретного пациента. Первоначально лечащий врач будет применять низкие дозы белка настоящего изобретения и наблюдать реакцию пациента. Большие дозы белка настоящего изобретения могут применяться, пока не будет получен оптимальный терапевтический эффект для пациента, причем в этот момент дозу больше не увеличивают. Впрочем, подходящие диапазоны дозы для внутривенного введения терапевтических средств настоящего изобретения обычно составляют по меньшей мере 1 миллион трансдифференцированных клеток, по меньшей мере 2 миллиона трансдифференцированных клеток, по меньшей мере 5 миллионов трансдифференцированных клеток, по меньшей мере 10 миллионов трансдифференцированных клеток, по меньшей мере 25 миллионов трансдифференцированных клеток, по меньшей мере 50 миллионов трансдифференцированных клеток, по меньшей мере 100 миллионов трансдифференцированных клеток, по меньшей мере 200 миллионов трансдифференцированных клеток, по меньшей мере 300 миллионов трансдифференцированных клеток, по меньшей мере 400 миллионов трансдифференцированных клеток, по меньшей мере 500 миллионов трансдифференцированных клеток, по меньшей мере 600 миллионов трансдифференцированных клеток, по меньшей мере 700 миллионов трансдифференцированных клеток, по меньшей мере 800 миллионов трансдифференцированных клеток, по меньшей мере 900 миллионов трансдифференцированных клеток, по меньшей мере 1 миллиард трансдифференцированных клеток, по меньшей мере 2 миллиарда трансдифференцированных клеток, по меньшей мере 3 миллиарда трансдифференцированных клеток, по меньшей мере 4 миллиарда трансдифференцированных клеток или по меньшей мере 5 миллиардов трансдифференцированных клеток. Предпочтительно, доза составляет 1-2 миллиарда трансдифференцированных клеток для субъекта весом 60-75 кг. Специалист в данной области техники сумеет оценить, что эффективные дозы могут быть экстраполированы на основе кривой зависимости доза-эффект, полученных в тест-системах *in vitro* или в моделях на животных.

Продолжительность внутривенной терапии с применением терапевтических средств настоящего изобретения будет изменяться в зависимости от тяжести заболевания, которое лечат, а также состояния и потенциальной идиосинкразической реакции каждого конкретного пациента. Предполагается, что продолжительность каждого применения белка настоящего изобретения будет находиться в диапазоне 12-24 ч непрерывного внутривенного введения. В конечном счете, лечащий врач подберет нужную продолжительность терапии с применением фармацевтической композиции настоящего изобретения.

Клетки можно также культивировать *ex vivo* в присутствии терапевтических средств, нуклеиновых кислот или белков настоящего изобретения с целью вызвать их пролиферацию или получения требуемого воздействия на или активности в таких клетках. Обработанные клетки могут быть затем введены *in vivo* путями введения, описанными в настоящем изобретении в терапевтических целях.

Рекомбинантные векторы экспрессии и клетки-хозяева.

Другой аспект изобретения относится к векторам, предпочтительно векторам экспрессии, содержащим нуклеиновую кислоту, кодирующую белок PDX, Pax-4, NeuroD 1 или MafA, или другой панкреатический фактор транскрипции, такой как Ngn3, или их производные, фрагменты, аналоги, гомологи или комбинации. В некоторых вариантах осуществления вектор экспрессии включает одну нуклеиновую кислоту, кодирующую любой из следующих факторов транскрипции: PDX-1, Pax-4, NeuroD1, Ngn3, MafA или Sox-9, или их производные или фрагменты. В некоторых вариантах осуществления вектор экспрессии включает две нуклеиновых кислоты, кодирующие любую комбинацию следующих факторов транскрипции: PDX-1, Pax-4, NeuroD1, Ngn3, MafA или Sox-9, или их производные или фрагменты. В предпочтительном варианте осуществления вектор экспрессии содержит нуклеиновые кислоты, кодирующие PDX-1 и NeuroD1.

При использовании в настоящем описании, термин "вектор" относится к молекуле нуклеиновой кислоты, способной транспортировать другую нуклеиновую кислоту, с которой он был связан. Одним из типов векторов является "плазмида", которая относится к линейной или кольцевой петле двунитевой ДНК, в которую могут быть лигированы дополнительные сегменты ДНК. Другим типом вектора является вирусный вектор, где дополнительные сегменты ДНК могут быть лигированы в вирусный геном. Некоторые векторы способны к автономной репликации в клетке-хозяине, в которую они введены (например, бактериальные векторы, содержащие бактериальную точку начала репликации, и эписомные векторы млекопитающих). Другие векторы (например, неэписомные векторы млекопитающих) интегрируются в геном клетки-хозяина при введении в клетку-хозяина, и таким образом реплицируются вместе с хозяйским геномом. Кроме того, некоторые векторы способны направлять экспрессию генов, с которыми они функционально связаны. Такие векторы именуется в настоящем описании как "векторы экспрессии". В общем, векторы экспрессии, применяемые в генно-инженерных методиках, часто находятся в форме плазмид. В настоящем описании "плазмида" и "вектор" могут использоваться попеременно, поскольку плазмида является наиболее часто используемой формой вектора. Впрочем, предполагается, что изобретение включает такие другие формы векторов экспрессии, такие как вирусные векторы (например, репликация дефектных ретровирусов, лентивирус, аденовирусы и аденоассоциированные вирусы), которые имеют эквивалентные функции. Кроме того, некоторые вирусные векторы способны направленно воздействовать на клетки определенного типа, специфично или неспецифично.

Рекомбинантные векторы экспрессии изобретения включают нуклеиновую кислоту изобретения в

форме, подходящей для экспрессии нуклеиновой кислоты в клетке-хозяине, что означает, что рекомбинантные векторы экспрессии включают одну или более регуляторных последовательностей, выбранных на основе клеток-хозяев, которые будут использоваться для экспрессии, которые функционально связаны с последовательностью нуклеиновой кислоты, которая будет экспрессирована. В рамках рекомбинантного вектора экспрессии, "функционально связанный" означает, что целевая нуклеотидная последовательность связана с регуляторной последовательностью(ями) таким способом, который обеспечивает экспрессию нуклеотидной последовательности (например, в системе *in vitro* транскрипции/трансляции или в клетке-хозяине, при введении вектора в клетку-хозяина). Термин "регуляторная последовательность", как предполагается, включает промоторы, энхансеры и другие элементы регуляции экспрессии (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 последовательности, которые направляют конститутивную экспрессию нуклеотидной последовательности во многих типах клеток-хозяев, и последовательности, которые направляют экспрессию нуклеотидной последовательности только в определенных клетках-хозяевах (например, тканеспецифические регуляторные последовательности). Специалистам в данной области будет очевидно, что дизайн вектора экспрессии может зависеть от таких факторов как выбор трансформируемой клетки-хозяина, уровень экспрессии требуемого белка и т.д. Векторы экспрессии изобретения могут быть введены в клетки-хозяева с целью продукции белков или пептидов, включающих слитые белки или пептиды, кодируемые нуклеиновыми кислотами, описанными в настоящем изобретении (например, белки PDX-1, Pax-4, MafA, NeuroD1 или Sox-9, или их мутантные формы или слитые белки и т.д.).

Например, вектор экспрессии включает одну нуклеиновую кислоту, кодирующую фактор транскрипции, функционально связанный с промотором. В векторах экспрессии, включающих 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 одним и тем же. В альтернативе указанные две нуклеиновые кислоты могут быть функционально связаны с одним промотором. Промоторы, пригодные для векторов экспрессии изобретения, могут быть любым промотором, известным в уровне техники. Специалист средней квалификации с легкостью сумеет определить подходящие промоторы для клетки-хозяина, в которой должна быть экспрессирована нуклеиновая кислота, нужный уровень экспрессии белка, или временной режим экспрессии и т.д. Промотор может быть конститутивным промотором, индуцируемым промотором или промотором, специфическим для клеток определенного типа.

Рекомбинантные векторы экспрессии изобретения могут быть разработаны 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 бакуловирусных векторов экспрессии), клетках дрожжей или клетках млекопитающих. Подходящие клетки-хозяева дополнительно описаны в Goeddel, GENE EXPRESSION TECHNOLOGY: METHODS IN ENZYMOLOGY 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990). В альтернативе рекомбинантный вектор экспрессии может быть транскрибирован и транслирован *in vitro*, например, при использовании промоторных регуляторных последовательностей T7 и полимеразы T7.

Экспрессию белков в прокариотах чаще всего проводят в *E.coli* с векторами, содержащими конститутивные или индуцируемые промоторы, направляющие экспрессию слитых или неслитых белков. Слитые векторы добавляют некоторое количество аминокислот к белку, кодируемому им, обычно на N-конец рекомбинантного белка. Такие слитые векторы обычно служат трем целям: (1) повысить экспрессию рекомбинантного белка; (2) повысить растворимость рекомбинантного белка; и (3) помочь при очистке рекомбинантного белка, действуя как лиганд при аффинной очистке. Часто в слитых векторах экспрессии сайт протеолитического расщепления вводят в соединение между слитым фрагментом и рекомбинантным белком, чтобы получить возможность отделения рекомбинантного белка от слитого фрагмента после очистки слитого белка. Такие ферменты и их когнатные распознающие последовательности включают фактор Ха, тромбин и энтерокиназу. Типичные слитые векторы экспрессии включают P_{gex} (Pharmacia Biotech Inc; Smith and Johnson (1988) *Gene* 67:31-40), pMAL (New England Biolabs, Beverly, Mass.) и pRIT5 (Pharmacia, Piscataway, N.J.), которые присоединяют слитые глутатион S-трансферазу (GST), мальтоза Е связывающий белок или белок А, соответственно, к целевому рекомбинантному белку.

Примеры подходящего индуцируемых неслитых векторов экспрессии *E.coli* включают pTrc (Amrann et al. (1988) *Gene* 69:301-3 15) и pET 11d (Studier et al., GENE EXPRESSION TECHNOLOGY: METHODS IN ENZYMOLOGY 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990) 60-89).

Одна из стратегий максимизации экспрессии рекомбинантного белка в *E.coli* заключается в экспрессии белка в бактериях-хозяевах 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 изменении нуклеотидной последовательности нуклеиновой кислоты, которая будет встроена в вектор экспрессии так, чтобы

отдельные кодоны для каждой аминокислоты были кодонами, предпочтительно используемыми в *E. coli* (Wada et al. (1992) *Nucleic Acids Res.* 20:21 11-2118). Такое изменение последовательностей нуклеиновой кислоты изобретения может быть выполнено стандартными методами синтеза ДНК.

В другом варианте осуществления вектор экспрессии PDX-1, Pax-4, MafA, NeuroD1 или Sox-9 является дрожжевым вектором экспрессии. Примеры векторов для экспрессии в дрожжах *S. cerevisiae* включают pYepSec1 (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).

В альтернативе PDX-1, Pax-4, MafA, NeuroD1 или Sox-9 могут быть экспрессированы в клетках насекомых при использовании бакуловирусных векторов экспрессии.

Бакуловирусные векторы, доступные для экспрессии белков в культивируемых клетках насекомых (например, клетках SF9), включают семейство pAc (Smith et al. (1983), *Mol Cell Biol* 3:2156-2165) и семейство pVL (Lucklow and Summers (1989) *Virology* 170:31-39).

В еще одном варианте осуществления нуклеиновую кислоту изобретения экспрессируют в клетках млекопитающих при использовании 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 регуляции вектора экспрессии часто представлены вирусными регуляторными элементами. Например, обычно используемые промоторы получены из вируса полиомы, аденовируса 2, цитомегаловируса и вируса обезьян 40. По поводу других подходящих систем экспрессии для прокариотических и эукариотических клеток см., например, главы 16 и 17 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.

В другом варианте осуществления рекомбинантный вектор экспрессии млекопитающих способен направлять экспрессию нуклеиновой кислоты предпочтительно в определенном типе клеток (например, для экспрессии нуклеиновой кислоты используются тканеспецифические регуляторные элементы). Тканеспецифические регуляторные элементы известны в уровне техники.

Неограничивающие примеры подходящих тканеспецифических промоторов включают альбуминовый промотор (специфический для печени; Pinkert et al. (1987), *Genes Dev* 1:268-277), лимфоид-специфические промоторы (Calame and Eaton (1988), *Adv Immunol* 43:235-275), в частности промоторы Т-клеточных рецепторов (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), нейрон-специфические промоторы (например, промотор нейрофиламентов; Byrne and Ruddle (1989) *PNAS* 86:5473-5477), панкреато-специфические промоторы (Edlund et al. (1985) *Science* 230:912-916) и промоторы, специфические для молочной железы (например, промотор молочной сыворотки; патент США 4,873,316 и европейская заявка на патент 264,166). Также включены регулируемые развитием промоторы, например, мышинные хо-промоторы (Kessel and Gruss (1990), *Science* 249:374-379) и промотор альфа-фетопротеина (Campes and Tilghman (1989), *Genes Dev* 3:537-546).

В изобретении также предложен рекомбинантный вектор экспрессии, включающий молекулу ДНК изобретения, клонированную в вектор экспрессии в антисмысловой ориентации. Таким образом, молекула ДНК функционально связана с регуляторной последовательностью таким способом, который обеспечивает экспрессию (при транскрипции молекулы ДНК) молекулы РНК, которая является антисмысловой по отношению к мРНК PDX. Регуляторные последовательности, функционально связанные с нуклеиновой кислотой, клонированной в антисмысловой ориентации, могут быть выбраны так, что они направляют непрерывную экспрессию антисмысловой молекулы РНК во множестве типов клеток, например, вирусные промоторы и/или энхансеры, или могут быть выбраны регуляторные последовательности, которые направляют конститутивную, тканеспецифическую или специфическую для клеток определенного типа экспрессию антисмысловой РНК. Антисмысловый вектор экспрессии может быть в форме рекомбинантной плазмиды, фагамиды или аттенуированного вируса, в котором антисмысловые нуклеиновые кислоты синтезируются под контролем высокоэффективной регуляторной области, активность которой может определяться типом клетки, в которую введен вектор. По поводу описания 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 аспект изобретения относится к клеткам-хозяевам, в которые был введен рекомбинантный вектор экспрессии изобретения. Термины "клетка-хозяин" и "рекомбинантная клетка-хозяин" используются в настоящем описании попеременно.

Подразумевается, что такие термины относятся не только к конкретной рассматриваемой клетке, но также и к потомству или потенциальному потомству такой клетки. Поскольку некоторые модификации могут происходить в последующих поколениях в результате мутации или влияний внешней среды, такое потомство, может быть, в сущности, не идентичным родительской клетке, но все еще включено в рамки данного термина при использовании в настоящем описании. Кроме того, клетки-хозяева могут быть изменены при экспрессии PDX-1, Pax-4, MafA, NeuroD1 или Sox-9 или их комбинации, и могут сохранять или терять свои исходные характеристики.

Клетка-хозяин может быть любой прокариотической или эукариотической клеткой. Например, белок PDX-1, Pax-4, MafA, NeuroD1 или Sox-9 может быть экспрессирован в бактериальных клетках, таких как *E. coli*, клетки насекомых, дрожжей или клетки млекопитающих (такие как клетки яичников китайского хомячка (CHO) или клетки COS). В альтернативе клетка-хозяин может быть незрелой клеткой млекопитающего, то есть, плюрипотентной стволовой клеткой. Клетка-хозяин также может быть получена из другой человеческой ткани. Другие подходящие клетки-хозяева известны специалистам.

Векторная ДНК может быть введена в прокариотические или эукариотические клетки путем стандартной методики трансформации, трансдукции, инфицирования или трансфекции. При использовании в настоящем описании, термины "трансформация", "трансдукция", "инфицирование" и "трансфекция", как предполагают, относятся к множеству известных в уровне техники методик введения чужеродной нуклеиновой кислоты (например, ДНК) в клетку-хозяина, включая осаждение с фосфоратом кальция или хлоридом кальция, трансфекцию с DEAE-декстраном, липофекцию или электропорацию. Кроме того, трансфекция может быть опосредована трансфекционным агентом. "Трансфекционный агент", как предполагают, включает любое соединение, которое опосредует включение ДНК в клетку-хозяина, например, липосому. Подходящие методы трансформации 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. интеграцией чужеродной ДНК в геном организма-хозяина) или "транзиентной" (т.е. ДНК эпизодно экспрессируется в клетках-хозяевах).

В случае стабильной трансфекции клеток млекопитающих известно, что в зависимости от вектора экспрессии и используемой методики трансфекции лишь малая часть клеток может интегрировать чужеродную ДНК в свой геном, остальная ДНК остается эпизодической. Для идентификации и отбора таких интегрантов в клетки-хозяева вместе с целевым геном обычно вводят ген, который кодирует селективный маркер (например, устойчивость к антибиотикам). Различные селективные маркеры включают маркеры, которые придают устойчивость к лекарственным средствам, таким как G418, гигромицин и метотрексат. Нуклеиновая кислота, кодирующая различные маркеры, может быть введена в клетку-хозяина на том же векторе, как и нуклеиновая кислота, кодирующая PDX, или может быть введена на отдельном векторе. Клетки, стабильно трансфицированные введенной нуклеиновой кислотой, могут быть идентифицированы путем селекции в присутствии лекарственного средства (например, клетки, которые включают селективный маркерный ген, выживут, тогда как другие клетки погибнут). В другом варианте осуществления клетки, модулируемые PDX, или трансфицированные клетки идентифицируют при индукции экспрессии эндогенного репортерного гена. В определенном варианте осуществления промотор является инсулиновым промотором, направляющим экспрессию зеленого флуоресцентного белка (GFP).

В одном варианте осуществления нуклеиновая кислота PDX-1, Pax-4, MafA, NeuroD1 или Sox-9 присутствует в вирусном векторе. В одном варианте осуществления нуклеиновые кислоты PDX-1 и NeuroD1 присутствуют в одном вирусном векторе. В другом варианте осуществления нуклеиновая кислота PDX-1, Pax-4, MafA, NeuroD1 или Sox-9 заключена в вирус. В другом варианте осуществления PDX-1 и NeuroD1 заключены в вирус (т.е. нуклеиновые кислоты, кодирующие PDX-1 и NeuroD1, заключены в одну вирусную частицу). В некоторых вариантах осуществления вирус предпочтительно инфицирует плюрипотентные клетки ткани различных типов, например, гематопозитические стволовые клетки, нейронные стволовые клетки, печеночные стволовые клетки или эмбриональные стволовые клетки, предпочтительно вирус является гепатотропным. Под "гепатотропным" понимается, что вирус обладает способностью предпочтительно воздействовать на клетки печени, специфично или неспецифично. В других вариантах осуществления вирус является модулированным вирусом гепатита, SV-40 или вируса Эпштейна-Барр. В еще одном варианте осуществления вирус является аденовирусом.

Генотерапия.

В одном аспекте изобретения нуклеиновая кислота или нуклеиновые кислоты, кодирующие полипептид PDX-1, Pax-4, MafA, NeuroD1 или Sox-9 или их комбинацию, или их функциональные производные, вводят посредством генотерапии. Генотерапия относится к терапии, которую выполняют путем введения определенной нуклеиновой кислоты субъекту. В этом аспекте изобретения нуклеиновая кислота дает соответствующий кодируемый пептид(ы), который затем оказывает терапевтическое воздействие, модулируя функцию вышеуказанного заболевания или нарушения, например, диабета. Любая из методик, относящихся к генотерапии, доступная из уровня техники, может использоваться при осуществлении настоящего изобретения. См. например, Goldspiel, et al., 1993. Clin Pharm 12: 488-505.

В предпочтительном варианте осуществления терапевтическое средство включает нуклеиновую кислоту, которая является частью вектора экспрессии, экспрессирующего один или более из вышеуказанных полипептидов PDX-1, Pax-4, MafA, NeuroD1 и/или Sox-9, или их фрагменты, производные или аналоги, в подходящем организме-хозяине. В определенном варианте осуществления такая нуклеиновая кислота обладает промотором, который функционально связан с кодирующей областью(ями) полипептида PDX-1, Pax-4, MafA, NeuroD1 и Sox-9. Промотор может быть индуцируемым или конститутивным и, необязательно, тканеспецифическим. Промотор может быть, например, вирусным промотором или про-

мотором млекопитающего по происхождению. В другом определенном варианте осуществления используется молекула нуклеиновой кислоты, в которой кодирующие последовательности (и любые другие желательные последовательности) фланкированы областями, которые активируют гомологическую рекомбинацию в требуемом сайте в геноме, обеспечивая таким образом внутривнутрихромосомную экспрессию нуклеиновых кислот. См. например, Roller and Smithies, 1989. Proc Natl Acad Sci USA 86: 8932-8935. В еще одном варианте осуществления вводимая нуклеиновая кислота остается эпизомной и индуцирует эндогенный и в иных условиях молчащий ген.

Доставка терапевтической нуклеиновой кислоты в организм пациента может быть либо прямой (т.е. пациента непосредственно подвергнут воздействию нуклеиновой кислоты или содержащего нуклеиновую кислоту вектора), либо не прямой (т.е. клетками сначала подвергают контакту с нуклеиновой кислотой *in vitro*, а затем трансплантируют пациенту). Эти два метода известны, соответственно, как генотерапия *in vivo* или *ex vivo*. В определенном варианте осуществления настоящего изобретения нуклеиновую кислоту непосредственно вводят *in vivo*, где она экспрессируется с получением кодируемого продукта. Это может быть выполнено любым из многочисленных методов, известных в уровне техники, включая, без ограничения, конструирование указанной нуклеиновой кислоты как часть подходящего нуклеотидного вектора экспрессии и введение его таким образом, чтобы он стал внутриклеточным (например, при инфицировании с использованием дефектного или аттенуированного ретровирусного или другого вирусного вектора; см. патент США 4,980,286); прямую инъекцию "голой" ДНК; использование бомбардировки микрочастицами (например, Gene Gun.RTM.; Biolistic, DuPont); покрытие указанных нуклеиновых кислот липидами; использование соответствующих поверхностных клеточных рецепторов/трансфицирующих агентов; инкапсулирование в липосомы, микрочастицы или микрокапсулы; введение ее в связанном виде с пептидом, который, как известно, поступает в ядро; или путем ее введения в связанном виде с лигандом, предрасположенным к рецептор-опосредованному эндоцитозу (см., например, Wu and Wu, 1987. J Biol Chem 262: 4429-4432), которая может использоваться в типах клеток "мишеней", которые специфично экспрессируют целевые рецепторы, и т.д.

Дополнительный подход к генотерапии при осуществлении настоящего изобретения включает перенос гена в клетки в культуре ткани *in vitro* такими методами как электропорация, липофекция, трансфекция с фосфатом кальция, инфицирование вирусом или подобное. Как правило, методика переноса включает сопутствующий перенос селективного маркера в клетки. Затем клетки помещают под селективный пресс (например, устойчивость к антибиотику), чтобы облегчить выделение тех клеток, которые захватили и экспрессируют перенесенный ген. Затем указанные клетки вводят пациенту. В определенном варианте осуществления перед введением *in vivo* полученной рекомбинантной клетки, нуклеиновую кислоту вводят в клетку любым методом, известным в уровне техники, включая, без ограничения перечисленными: трансфекцию, электропорацию, микроинъекцию, инфицирование вирусным вектором или фаговым вектором, содержащим целевые последовательности нуклеиновых кислот, слияние клеток, хромосомно-опосредованный перенос гена, опосредованный микроклетками перенос гена, слияние сферопластов и подобные методики, которые гарантируют, что необходимые функции развития и физиологические функции клеток реципиента не будут нарушены при переносе. См. например, Loeffler and Behr, 1993. Meth Enzymol 217: 599-618. Выбранная методика должна обеспечивать стабильный перенос нуклеиновой кислоты в клетку, в результате которого нуклеиновая кислота сможет экспрессироваться в клетке. Предпочтительно указанная перенесенная нуклеиновая кислота может наследоваться и экспрессироваться потомством клетки. В альтернативном варианте осуществления перенесенная нуклеиновая кислота остается эпизомной и индуцирует экспрессию в иных условиях молчащей эндогенной нуклеиновой кислоты.

В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения полученные рекомбинантные клетки могут быть введены пациенту различными методами, известными в уровне техники, включая, без ограничения, инъекцию эпителиальных клеток (например, подкожно), аппликацию рекомбинантных клеток кожи в виде кожного трансплантата на кожу пациента и внутривенную инъекцию рекомбинантных клеток крови (например, гематопозитических стволовых клеток или клеток-предшественников) или клеток печени. Общее количество клеток, которое предполагается использовать, зависит от требуемого эффекта, состояния пациента и т.п., и может быть определено специалистом в данной области.

Клетки, в которые нуклеиновая кислота может быть введена в целях генотерапии, охватывают любой требуемый, доступный тип клеток, и могут быть ксеногенными, гетерогенными, сингенными или аутогенными. Типы клеток включают, без ограничения перечисленными, дифференцированные клетки, такие как эпителиальные клетки, эндотелиальные клетки, кератиноциты, фибробласты, мышечные клетки, гепатоциты и клетки крови, или различные стовольные клетки или клетки-предшественники, в частности эмбриональные клетки сердечной мышцы, стовольные клетки печени (публикация международной заявки WO 94/08598), нервные стовольные клетки (Stemple and Anderson, 1992, Cell 71: 973-985), гематопозитические стовольные клетки или клетки-предшественники, например, полученные из костного мозга, пуповинной крови, периферической крови, фетальной печени и т.п. В предпочтительном варианте осуществления клетки, используемые для генотерапии, являются аутогенными для пациента.

ДНК для генотерапии может быть введена пациентам парентерально, например внутривенно, под-

кожно, внутримышечно и интраперитонеально. ДНК или индуцирующее средство вводят в фармацевтически приемлемом носителе, т.е. биологически совместимом разбавителе, который подходит для введения животному, например, в физиологическом растворе. Терапевтически эффективное количество является количеством, которое способно обеспечивать требуемый с медицинской точки зрения результат, например, увеличение панкреатического гена у обработанного животного. Такое количество может быть определено средним специалистом в данной области. Как известно в области медицины, дозировка для каждого конкретного пациента зависит от многих факторов, включая размер пациента, площадь поверхности тела, возраст, конкретное вводимое соединение, пол, время и путь введения, общее состояние здоровья и другие лекарственные средства, применяемые параллельно. Дозировки могут изменяться, но предпочтительная дозировка для внутривенного введения ДНК составляет приблизительно 10^6 - 10^{22} копий молекулы ДНК. Например, ДНК вводят в количестве приблизительно 2×10^{12} вирионов на 1 кг.

Фармацевтические композиции.

Соединения, например полипептиды PDX-1, Pax-4, MafA, NeuroD1 или Sox-9, нуклеиновые кислоты, кодирующие полипептиды PDX-1, Pax-4, MafA, NeuroD1 или Sox-9, или нуклеиновая кислота или соединение, которые увеличивают экспрессию нуклеиновой кислоты, которая кодирует полипептиды PDX-1, Pax-4, MafA, NeuroD1 или Sox-9 (также указанные в настоящем изобретении как "активные соединения") изобретения, а также их производные, фрагменты, аналоги и гомологи, могут быть включены в фармацевтические композиции, подходящие для введения. Такие композиции обычно включают молекулу нуклеиновой кислоты или белок и фармацевтически приемлемый носитель. При использовании в настоящем описании, "фармацевтически приемлемый носитель", как предполагается, включает любые возможные растворители, дисперсионные среды, покрытия, противобактериальные и противогрибковые средства, изотонические вещества и замедлители абсорбции и т.п., совместимые с фармацевтическим применением. Подходящие носители описаны в последнем издании справочника Remington's Pharmaceutical Sciences, стандартного в данной области, который включен в настоящее изобретение посредством отсылки. Предпочтительные примеры таких носителей или растворителей включают, без ограничения перечисленными, воду, солевой раствор, растворы Рингера, раствор декстрозы и 5% человеческий сывороточный альбумин. Также могут использоваться липосомы и неводные разбавители, такие как нелетучие масла. Использование такой среды и веществ для фармацевтически активных субстанций известно в уровне техники. За исключением тех случаев, когда любые стандартные среды или вещество несовместимы с активным соединением, предполагается их применение в композициях. Дополнительные активные соединения также могут быть включены в композиции.

Фармацевтическую композицию изобретения изготавливают так, чтобы она была совместима с ее предполагаемым путем введения. Примеры путей введения включают парентеральный, например внутривенное, кожное, подкожное, пероральное (например, ингаляцию), чрескожное (наружный), чресслизистое и ректальное введение. Растворы или суспензии, используемые для парентерального, кожного или подкожного применения, могут включать следующие компоненты: стерильный растворитель, такой как вода для инъекций, физиологический раствор, нелетучие масла, полиэтиленгликоли, глицерин, пропиленгликоль или другие синтетические растворители; противобактериальные добавки, такие как бензиловый спирт или метилпарабены; антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота или бисульфит натрия; хелатообразующие соединения, такие как этилендиаминтетрауксусная кислота; буферы, такие как ацетаты, цитраты или фосфаты, и вещества для регулирования тоничности, такие как хлорид натрия или декстроза. Значение pH может быть доведено кислотами или основаниями, такими как соляная кислота или гидроксид натрия. Парентеральный препарат может быть заключен в ампулы, одноразовые шприцы или многодозовые флаконы, изготовленные из стекла или пластмассы.

Фармацевтические композиции, подходящие для инъекций, включают стерильные водные растворы (в случае растворимости в воде) или дисперсии и стерильные порошки для экстенпорального приготовления стерильных инъекционных растворов или дисперсии. В случае внутривенного введения подходящие носители включают физиологический раствор, бактериостатическую воду, Cremophor EL.TM. (BASF, Parsippany, N.J.) или фосфатно-солевой буфер (PBS). Во всех случаях композиция должна быть стерильной и должна быть достаточной текучей, чтобы существовала возможность легкого забора шприцом. Она должна быть устойчива в условиях производства и хранения и должна быть предохранена от воздействия контаминирующих микроорганизмов, таких как бактерии и грибы. Носитель может быть растворителем или дисперсионной средой, содержащей, например, воду, этиловый спирт, многоатомный спирт (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль и т.п.), а также их подходящие смеси. Надлежащую текучесть можно поддерживать, например, при помощи покрытия, такого как лецитин, путем поддержания необходимой величины частиц в случае дисперсии и при использовании поверхностно-активных веществ. Предотвращение воздействия микроорганизмов может быть достигнуто при помощи различных противобактериальных и противогрибковых средств, например, парабенов, хлорбутанола, фенола, аскорбиновой кислоты, тимеросала и т.п. Во многих случаях в композицию будет предпочтительно включать изотонические вещества, например сахар, сахароспирты, такие как маннит, сорбит, хлорид натрия. Пролонгированная абсорбция инъекционных композиций может быть обеспечена включением в композицию вещества, которое задерживает абсорбцию, например, моностеарата алюми-

ния и желатина.

Стерильные инъекционные растворы могут быть изготовлены путем включения активного соединения в необходимом количестве в подходящий растворитель с одним или комбинацией компонентов, перечисленных выше, в случае необходимости, с последующей стерилизацией фильтрованием. Как правило, дисперсию изготавливают путем включения активного соединения в стерильный разбавитель, который содержит основную дисперсионную среду и другие необходимые компоненты из перечисленных выше. В случае стерильных порошков для приготовления стерильных инъекционных растворов используют такие методы изготовления, как вакуумная сушка и лиофильная сушка, которые дают порошок активного вещества плюс любой дополнительный требуемый компонент из соответствующего, предварительно простерилизованного фильтрованием раствора.

Композиции для приема внутрь обычно включают инертный разбавитель или пищевой носитель. Они могут быть заключены в желатиновые капсулы или спрессованы в таблетки. С целью терапевтического перорального введения активное соединение может быть включено с инертными наполнителями и может использоваться в форме таблеток, таблеток или капсул. Композиции для приема внутрь могут быть также изготовлены при использовании жидкого носителя для использования в качестве ополаскивателя для полости рта, где соединение в жидком носителе применяют в полости рта, полощат рот и сплевывают или глотают. Фармацевтически совместимые связующие вещества и/или вспомогательные материалы могут быть включены в качестве части композиции. Таблетки, пилюли, капсулы, пастилки и т.п. могут содержать любой из следующих компонентов или соединения подобной природы: связующее вещество, такое как микрокристаллическая целлюлоза, трагакантовая камедь или желатин; вспомогательное вещество, такое как крахмал или лактоза, разрыхлитель, такой как альгиновая кислота, Primogel или кукурузный крахмал; смазывающее вещество, такое как стеарат магния или Sterotes; скользящее вещество, такое как коллоидный диоксид кремния; подсластитель, такой как сахароза или сахарин; или вкусо-ароматическое вещество, такое как перечная мята, метилсалицилат или апельсиновый ароматизатор.

Системное введение может также осуществляться чресслизистым или чрескожным способом. При чресслизистом или чрескожном введении в композиции используются пенетранты, подходящие для преодоления барьера. Такие пенетранты общеизвестны в уровне техники и включают, например, в случае чресслизистого введения, детергенты, соли желчных кислот и производные фузидовой кислоты. Чресслизистое введение может быть выполнено с помощью назальных спреев или суппозитория. В случае чрескожного введения активные соединения включают в мази, бальзамы, гели или кремы, как общеизвестно в уровне техники.

В одном варианте осуществления активные соединения приготавливают с носителями, которые защищают соединение от быстрого выведения из организма, как в случае лекарственной формы с контролируемым высвобождением, включая имплантаты и микрокапсулированные системы доставки. Могут использоваться биоразлагаемые, биосовместимые полимеры, такие как этиленвинилацетат, полиангидриды, полигликолевая кислота, коллаген, полиортоэфир и полимолочная кислота. Способы получения таких лекарственных форм будут очевидны специалистам в данной области техники. Материалы могут быть также получены коммерчески от Alza Corporation и Nova Pharmaceuticals, Inc. Липосомные суспензии (включающие липосомы, направленные против инфицированных клеток, с моноклональными антителами к вирусным антигенам) также могут использоваться в качестве фармацевтически приемлемых носителей. Они могут быть получены согласно способам, известным специалистам в данной области, например, как описано в патенте США 4,522,811, полностью включенном в настоящее изобретение посредством отсылки.

Особенно выгодно изготавливать пероральные или парентеральные композиции в виде стандартной лекарственной формы для легкости применения и единообразия дозировки. Стандартная лекарственная форма, при использовании в настоящем изобретении, относится к физически дискретным единицам, которым пригодны в качестве единичных доз для субъекта, проходящего лечение; каждая единица содержит заданное количество активного соединения, вычисленное таким образом, чтобы обеспечивался требуемый терапевтический эффект в сочетании с необходимым фармацевтическим носителем. Требования к стандартным лекарственным формам изобретения продиктованы и непосредственно зависят от уникальных особенностей активного соединения и конкретного терапевтического эффекта, который требуется получить.

Молекулы нуклеиновой кислоты изобретения могут быть встроены в векторы и применены в качестве генотерапевтических векторов. Генотерапевтические векторы могут быть доставлены субъекту любым из множества путей, например, как описано в патенте США 5,703,055. Доставка, таким образом, может также включать, например, внутривенную инъекцию, местное введение (см. патент США 5,328,470) или стереотаксическую инъекцию (см. например, Chen et al. (1994) PNAS 91:3054-3057). Фармацевтический препарат генотерапевтического вектора может включать генотерапевтический вектор в приемлемом разбавителе или может включать матрицу замедленного высвобождения, в которую включен носитель для доставки гена. В альтернативе, в случае, когда полностью функциональный вектор для доставки гена может быть получен интактным из рекомбинантных клеток, например, ретровирусные

векторы, фармацевтический препарат может включать одну или более клеток, которые продуцируют систему доставки гена.

Фармацевтические композиции могут быть заключены в контейнер, упаковку или дозатор вместе с инструкциями по применению.

Следует понимать, что настоящее изобретение не ограничено конкретными методиками, протоколами и реагентами, а также примерами, описанными в настоящем изобретении. Терминология и примеры, используемые в настоящем изобретении с целью описания конкретных вариантов осуществления, служат лишь с намерением и целью предоставления руководства квалифицированному специалисту и не должны ограничивать объем настоящего изобретения.

Примеры

Пример 1. Общие методы.

Человеческие клетки печени.

Ткани зрелой человеческой печени были получены от лиц возрастом 3-23 года или старше. Ткани печени использовали с одобрения Комитета по клиническим исследованиям (экспертного совета). Выделение человеческих клеток печени проводили, как описано (Sapir et al., 2005; Meivar-Levy et al., 2007). Клетки культивировали в минимальной питательной среде по Дульбекко (1 г/л глюкозы) с добавкой 10% фетальной сыворотки теленка, 100 ед/мл пенициллина; 100 нг/мл стрептомицина; 250 нг/мл амфотерицина В (Biological Industries, Beit Haemek, Israel), и выдерживали при 37°C в увлажненной атмосфере, содержащей 5% CO₂ и 95% воздуха.

Инфицирование вирусом.

Аденовирусы, используемые в данном исследовании, являлись следующими: Ad-CMV-Pdx-1 (Sapir et al., 2005; Meivar-Levy et al., 2007), Ad-RIP-luciferase (Seijffers et al., 1999), Ad-CMV-β-Gal, Ad-CMV-MafA (великодушно предоставлен Newgard, CB., Duke University), Ad-CMV-Pax4-IRES-GFP (великодушно предоставлен St Onge, L. DeveloGen AG, G5ttingen, Germany), и Ad-CMV-Isl1 (великодушно предоставлен Kieffer, T. University of British Columbia, Vancouver, Canada). Вирусные частицы были получены стандартной методикой (He et al., 1998).

Клетки печени инфицировали рекомбинантными аденовирусами в течение 5-6 дней (табл. 1) в присутствии EGF (20 нг/мл; Cytolab, Ltd., Israel) и никотинамида (10 мМ; Sigma). Оптимальную множественность инфицирования (MOI) определяли по выживанию клеток (<75%) и индукции секреции С-пептида. MOI используемых вирусов были следующими; Ad-CMV-Pdx-1 (1000 MOI), Ad-CMV-Pax4-IRES-GFP (100 MOI), Ad-CMV-Maf-A (10 MOI) и Ad-CMV-Isl1 (100 MOI).

Выделение РНК, реакции ОТ и РВ-ПЦР.

Суммарную РНК выделяли, получали и амплифицировали кДНК, как описано ранее (Ber et al., 2003; Sapir et al., 2005). Количественную РВ-ПЦР в реальном времени выполняли при использовании системы определения последовательности ABI Step one plus (Applied Biosystems, CA, USA), как описано ранее (Sapir et al., 2005; Meivar-Levy et al., 2007; Aviv et al., 2009).

Обнаружение секреции С-пептида и инсулина.

Секрецию С-пептида и инсулина измеряли при статическом инкубировании первичных культур зрелых клеток печени через 6 дней после первоначального воздействия при вирусной обработке, как описано (Sapir et al., 2005; Meivar-Levy et al., 2007; Aviv et al., 2009). Глюкозорегулируемую секрецию С-пептида измеряли при концентрации 2 и 17,5 мМ глюкозы, которая, как было определено в дозозависимых анализах, максимально индуцировала секрецию инсулина из трансдифференцированных клеток печени, не оказывая при этом отрицательных воздействий на функцию обработанных клеток (Sapir et al., 2005; Meivar-Levy et al., 2007; Aviv et al., 2009). Секрецию С-пептида обнаруживали с помощью радиоиммуноанализа при использовании набора для радиоиммуноанализа человеческого С-пептида (Linco Research, St. Charles, MO; <4% перекрестной реактивности с человеческим проинсулином). Секрецию инсулина обнаруживали с помощью радиоиммуноанализом при использовании набора для радиоиммуноанализа человеческого инсулина (DPC, Angeles, CA; 32% перекрестной реактивности с человеческим проинсулином). Секрецию нормализовали по суммарному клеточному белку, измеренному при использовании набора для анализа белка Bio-Rad.

Люциферазный анализ.

Человеческие клетки печени совместно инфицировали Ad-RIF'-luciferase (200 moi) и различными аденовирусами (как описано ниже). Через шесть дней люциферазную активность измеряли при использовании Системы анализа люциферазы (Promega) и LKB 1250 Luminometer (LKB, Finland). Результаты нормализовали по суммарному клеточному белку, измеренному при использовании набора для анализа белка Bio-Rad (Bio-Rad).

Иммунофлуоресценция.

Человеческие клетки печени обрабатывали различными аденовирусами, сеяли на покровных стеклах в 12-луночные культуральные планшеты (2×10⁵ клеток/луночка). Через 3-4 дня клетки фиксировали и окрашивали, как описано (Sapir et al., 2005; Meivar-Levy et al., 2007; Aviv et al., 2009). В данном исследовании использовали следующие антитела: антитело против PDX-1 кролика, антитело против PDX-1 козы

(оба в разведении 1:1000, великодушно предоставлены С.V.E. Wright), антитело против человеческого инсулина, антитело против человеческого соматостатина (оба в разведении 1:100, Dako, Glostrup, Denmark), антитело против Pax4 (1:100; R&D Systems, Minneapolis, MN), антитело против MafA (1:160; Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA). Использовали следующие вторичные антитела: антитело против IgG кролика, конъюгированное с цианином (cy2), 1:250, антитело против IgG кролика, конъюгированное с индокарбоцианином (cy3), 1:250, антитело против IgG антикозы, конъюгированное с цианином (cy2), 1:200, антитело против IgG козы, конъюгированное с индокарбоцианином (cy3), 1:250, и антитело против IgG мыши, конъюгированное с индокарбоцианином (cy3), 1:250 (все антитела производства Jackson ImmunoResearch, PA). Наконец, клетки окрашивали 4',6-диамидино-2-фенил-индолом (DAPI, Sigma). Стекла визуализировали и анализировали при использовании флуоресцентного микроскопа (Provis, Olympus).

Статистический анализ.

Статистические анализы выполняли с использованием двухвыборочного t-критерия Стьюдента, приняв неравную дисперсию.

Пример 2. PDX-1-индуцированная трансдифференцировка.

Предыдущие исследования (Sapir et al., 2005; Meivar-Levy et al., 2007; Aviv et al., 2009; Gefen-Halevi et al., 2010; Meivar-Levy et al., 2011) указывали, что Pdx-1 в отдельности способен стимулировать β -клетка-подобный фенотип и функцию у человеческих клеток печени, возможно благодаря своей способности активировать многочисленные, в иных условиях молчащие эндогенные pTF в печени. Активация панкреатической линии была быстрой и продолжалась в течение 5 дней (Sapir et al., 2005, Ber et al., 2003).

В данном примере исследовали последовательность событий, которые опосредовали Pdx-1-индуцируемую трансдифференцировку печени в поджелудочную железу.

Аденовирусные векторы, кодирующие Pdx-1, были введены в зрелые человеческие клетки печени, и эффекты эктопической экспрессии Pdx-1 наблюдали в течение четырех последовательных дней после инфицирования (дни 2-5; фиг. 1). Экспрессию панкреатических гормонов и панкреато-специфических факторов транскрипции определяли с помощью количественного РВ-ПЦР анализа каждый день в течение 5 дней. Результаты нормализовали по экспрессии гена β -актина в том же образце кДНК и представлены как среднее \pm SE относительной экспрессии в сравнении с обработанными контрольным вирусом (Ad-CMV- β -gal, 1000 MOI) клетками в тот же день. Выполняли два независимых эксперимента, с $n \geq 4$, * $p < 0,05$ и ** $p < 0,01$.

Гены глюкагона и соматостатина сразу активировались, в течение одного дня после инфицирования Ad-Pdx-1 (фиг. 1C и 1D). Однако экспрессию инсулина обнаружили только в четвертый - пятый день после инфицирования (фиг. 1A). Чтобы получить объяснение механизма различной по времени активации трех основных панкреатических гормонов, уровни экспрессии эндогенно активированных факторов транскрипции анализировали во время процесса трансдифференцировки. Ранние панкреатические эндокринные факторы транскрипции, NGN3 и NEUROD1, были активированы сразу. Однако р-клеточные TF, такие как NKX6.1 и MafA, только постепенно и незначительно активировались в ответ на эктопическую экспрессию Pdx-1, достигая своего пикового уровня экспрессии в четвертый и пятый день соответственно. Активация экспрессии гена инсулина в пятый день была связана не только с увеличением экспрессии MafA, но также и с уменьшением экспрессии Isl1 (фиг. 1D). Эти данные указывают, что трансдифференцировка человеческих клеток печени по панкреатической линии, несмотря на свою быстроту, является постепенным и последовательным процессом. Различная по времени активация экспрессии генов панкреатических гормонов (таких как соматостатин и глюкагон) может быть частично связана с динамикой и относительными уровнями экспрессии эндогенно активированных pTF.

Пример 3. Комбинированная экспрессия Pdx-1, Pax4 и MafA увеличивает эффективность трансдифференцировки печени в поджелудочную железу.

Предыдущие исследования позволили предположить, что совместная экспрессия нескольких pTF увеличивает эффективность трансдифференцировки по β -клеточной линии по сравнению с индукцией отдельными pTF (Kaneto et al., 2005; Tang et al., 2006; Song et al., 2007; Wang et al., 2007; Gefen-Halevi et al., 2010), как и по другим клеточным линиям. Чтобы проанализировать эту идею в экспериментальной системе первичных культур зрелых человеческих клеток печени, описанных в настоящем изобретении, исследовали отдельный и общий вклад трех основных pTF на трансдифференцировку печени в поджелудочную железу. Pdx-1, Pax4 и MafA, которые опосредуют различные стадии в органогенезе поджелудочной железы, эктопически коэкспрессировали в первичных культурах зрелых человеческих клеток печени, используя рекомбинантные аденовирусы.

Культивируемые зрелые человеческие клетки печени инфицировали Ad-CMV-Pdx-1 (1000 MOI), Ad-CMV-Pax-4 (100 MOI) и Ad-CMV-MafA (10 MOI), отдельно или в сочетании с контрольным вирусом (Ad-CMV- β -gal, 1000 MOI), и через шесть дней исследовали маркеры панкреатической дифференцировки. Множественность инфицирования (MOI) каждого фактора титровали с получением максимальной эффективности репрограммирования, связанной с минимальными отрицательными воздействиями на

жизнеспособность инфицированных клеток. Pdx-1 экспрессировался в 70% клеток в культуре, а общая коэкспрессия всех 3 pTF была очевидной в 46,8% Pdx-1-положительных клеток (фиг. 2A). Очень мало клеток окрашивалось положительно только по Pax-4 или MafA. Клетки, положительно окрашенные по всем трем pTF, указаны стрелками (фиг. 2A, правильная панель). На фиг. 2B клетки печени были совместно инфицированы комбинированными pTF и Ad-RIP-LUC (200 moi), после чего измеряли люциферазную активность инсулинового промотора.

Комбинированная экспрессия трех pTF приводила к реальному увеличению активации инсулинового промотора (фиг. 2B), трехкратному увеличению количества (про)инсулин-продуцирующих клеток (фиг. 2C) и 30-60% увеличению глюкозорегулируемой секреции (про)инсулина (фиг. 2D) по сравнению с указанными показателями при индукции каждым pTF в отдельности. В совокупности представленные результаты указывают, что комбинация 3 pTF повышает эффективность трансдифференцировки, а также указывают, что каждый из факторов обладает ограниченной активностью или недостаточен, чтобы индивидуально активировать максимальную трансдифференцировку (Kaneto et al., 2005; Tang et al., 2006; Zhou et al., 2008).

Пример 4. Созревание и разделение трансдифференцированных клеток на различные гормон-продуцирующие клетки регулируется временем в иерархическом порядке.

В данном примере влияние временной регуляции эктопической экспрессии pTF исследовали с целью определения, регулируется ли увеличенная эффективность трансдифференцировки при комбинированной эктопической экспрессии трех pTF также временем, как предположено выше (фиг. 2). В поддержку утверждения, что временная регуляция играет роль в трансдифференцировке поджелудочной железы, известно, что три pTF: Pdx-1, Pax4 и MafA, имеют различную по времени экспрессию и функцию во время органогенеза поджелудочной железы.

Три pTF: Pdx-1, Pax4 и MafA, вводили последовательно или одновременно в первичные культуры зрелых человеческих клеток печени, используя рекомбинантные аденовирусы. Опосредованная аденовирусом эктопическая экспрессия гена достигает максимума через 17 ч после инфицирования (Varda-Bloom et al., 2001). Поэтому pTF последовательно вводили в течение трех последовательных дней (см. Инфицирование вирусом в примере 1), позволяя проявиться их отдельным эффектам. Клетки инфицировали согласно схеме, показанной в табл. 1.

Таблица 1

Порядок обработки	День 1	День 2	День 3	День 4	День 5	День 6
А	Ad-P-gal (контроль)					Сбор
В	Ad-Pdx-1 + Ad-Pax4 + Ad-MafA					Сбор
С	Ad-Pdx-1	Ad-Pax4	Ad-MafA			Сбор
Д	Ad-MafA	Ad-Pax4	Ad-Pdx-1			Сбор
Е	Ad-Pdx1	Ad-MafA	Ad-Pax4			Сбор

Клетки последовательно инфицировали одной pTF аденовирусной конструкцией в сутки в течение трех дней в трех различных последовательностях: прямой иерархический порядок (обработка С=Pdx-1→Pax4→MafA), в противоположном порядке (обработка D=MafA→Pax4→Pdx-1) и в случайном порядке (обработка E=Pdx-1→MafA→Pax4). Влияние последовательного введения pTF на эффективность трансдифференцировки и на подобное β-клеточному созреванию сравнивали с эффектом от совместного или одновременного введения всех трех pTF в первый день (обработка В = Pdx-1+Pax4+MafA) и с подобным MOI контрольного вируса (обработка А = β-gal) (табл. 1 и фиг. 3A). В частности, культивируемые зрелые человеческие клетки печени инфицировали Ad-CMV-Pdx-1 (1000 MOI), Ad-CMV-Pax-4 (100 MOI) и Ad-CMV-MafA (10 MOI) вместе или в последовательном порядке, как показано на фиг. 3A и в табл. 1 (обработки В-Е), или контрольным вирусом (Ad-CMV-β-gal, 1000 moi, обработка А), и через шесть дней анализировали их панкреатическую дифференцировку.

На активность промотора инсулина (фиг. 4A), процент инсулинпродуцирующих клеток (фиг. 3B) и глюкозорегулируемую секрецию (про)инсулина (фиг. 3C) порядок последовательно вводимых pTF не влиял. Примечательно, что последовательное введение pTF в случайном порядке (обработка E = Pdx-1→MafA→Pax4) приводило к увеличению активности промотора инсулина, но было связано с потерей регуляции секреции инсулина глюкозой и пониженной экспрессией переносчика глюкозы 2 (GLUT-2), (фиг. 3B, 3C и 4B). Потеря чувствительности к глюкозе после изменения порядка введения Pax4 и MafA дает основание предположить наличие потенциального влияния последовательности экспрессируемых

pTF на подобное β -клеточному созреванию, но не на эффективность процесса трансдифференцировки.

Пример 5. Иерархическое введение Pdx-1, Pax4 и MafA активирует созревание трансдифференцированных клеток к β -подобные клетки.

Предыдущие результаты подтолкнули к дальнейшему исследованию с целью определить, до какой степени и при каких условиях увеличенная эффективность трансдифференцировки связана с улучшением созревания по β -клеточной линии. Принципиальными особенностями зрелых β -клеток являются способность процессировать проинсулин и секретировать его в глюкозорегулируемом режиме (Eberhard et al., 2009; Wogowiak, 2010). С целью исследовать, четко ли влияют временные изменения в экспрессии pTF на созревание трансдифференцированных клеток по β -клеточной линии, был проанализирован эффект различных обработок А-Е (табл. 1 и фиг. 3А) на процессинг проинсулина и глюкозорегулируемую секрецию С-пептида.

Действительно, только прямое иерархическое введение (обработка С) pTF приводило к заметной продукции процессированного инсулина и его глюкозорегулируемой секреции, которая показала физиологические характеристики зависимости от дозы глюкозы (фиг. 3С и 5А). Недавно приобретенный фенотип и функция были стабильными, что подтверждалось наличием способности секретировать С-пептид в глюкозорегулируемом режиме в течение четырех недель *in vitro* (фиг. 5А и 5В).

Увеличенный процессинг прогормонов только при прямом иерархическом введении pTF (обработка С) был связан с заметным повышением экспрессии генов PCSK2 и GLUT2, которые играют роль в процессинге прогормонов и чувствительности к глюкозе, соответственно (фиг. 3 и 4). Эти данные указывают на обязательную роль последовательной и прямой иерархической экспрессии pTF в активации созревания и функции трансдифференцированных клеток печени по β -клеточной линии. Как совместное (обработка В), так и последовательное введение TF в непрямом иерархическом режиме (обработка D и E) не обеспечивали получение трансдифференцированных клеток, которые проявляли свойства зрелых β -подобных клеток.

Чтобы получить объяснение механизма изменений в β -клетка-подобном состоянии созревания, исследовали репертуар эндогенно активируемых pTF при различных по времени обработках (В-Е). Все обработки (В-Е) приводили к повышению экспрессии многочисленных эндогенных pTF (фиг. 3Е), таких как NEUROG3, NEUROD1, NKX6.1 и NKX2.2. Однако самое надежное отличие между "зрелым" (обработка С) и "незрелым" фенотипами (обработки В, Е и D) были показаны на уровнях экспрессии эндогенного гена Isl1. Таким образом, наиболее усиленное созревание по β -клеточной линии, вызванное прямым иерархическим введением pTF (обработка С), коррелирует с существенным снижением эндогенной экспрессии Isl1 (фиг. 3Е, стрелка). В совокупности представленные данные позволяют предположить, что на созревание трансдифференцированных клеток в β -клетки могут влиять относительные и временные уровни экспрессии определенных pTF.

Пример 6. Иерархическое введение Pdx-1, Pax4 и MafA активирует разделение трансдифференцированных клеток на β -подобные и 5-подобные клетки.

Исключение MafA из обработки С (таблица 1) индуцировало экспрессию гена Isl-1 (фиг. 6D) и гена соматостатина (фиг. 8D). С целью исследования, действительно ли повышенная экспрессия Isl-1 при исключении MafA вызывает повышение экспрессии гена соматостатина, Ad-CMV-Isl-1 добавляли вместе с MafA в 3-ий день (обработка С, в табл. 1). Действительно, Isl-1 повышал экспрессию гена соматостатина (фиг. 6Е). Эктопическая экспрессия Isl-1 (C+Isl-1) также вызывала повышение продукции белка соматостатина (фиг. 6F) и его совместную продукцию в клетках, продуцирующих инсулин (фиг. 9, нижняя панель), указывая на то, что высокая экспрессия MafA, связанная с низкой экспрессией Isl-1, является крайне важной для дифференцирования между клетками, продуцирующими инсулин и соматостатин.

Пример 7. Анализ отдельного вклада Pdx-1, Pax4 и MafA в трансдифференцировку печени в поджелудочную железу.

Последовательные характеристики процесса трансдифференцировки идентифицировали по улучшению функциональных исследований во времени. Последующий анализ отдельного вклада каждого фактора транскрипции, Pdx-1, Pax4 и MafA, в иерархическом процессе развития выполняли с помощью относительного и временного метода "пониженной функции". Зрелые человеческие клетки печени обрабатывали прямым временным и последовательным протоколом репрограммирования (обработка С), из которого был исключен один из эктопических pTF. Исключенный pTF был заменен контрольным аденовирусом, несущим экспрессию β -gal с аналогичной множественностью инфекции. В частности, зрелые человеческие клетки печени обрабатывали прямым "иерархическим" последовательным порядком инфицирования (обработка С, фиг. 3А и табл. 1). Один единственный фактор транскрипции (pTF) был исключен за один раз и заменяли идентичным moi Ad-CMV- β -gal. Исключение Pdx-1 указано как (С-Pdx-1), исключение Pax4 указано как (С-Pax4) и исключение MafA указано как (С-MafA).

Функциональные последствия отдельного исключения экспрессии каждого pTF были проанализированы на молекулярном и функциональном уровнях (фиг. 6). Отдельное исключение Pdx-1 и MafA (С-Pdx-1 и С-MafA соответственно) приводило к пониженной активации инсулинового промотора (фиг. 6А), нарушению чувствительности к глюкозе секреции процессированного инсулина (фиг. 6В) и снижению

экспрессии GLUT2 и GK (фиг. 6С). Исключение MafA также связано с пониженной экспрессией прогормон-конвертазы, PCSK2 (фиг. 6С). С другой стороны, исключение Pax4 (С-Pax4) не оказывало значительного воздействия на активацию промотора инсулина, и при этом оно не влияло на глюкозорегулируемую секрецию С-пептида. Исключение Pax-4 было связано со снижением экспрессии GLUT2 и PCSK2 (фиг. 6С), что вероятно указывает, что экспрессия GK достаточна для приобретения способности контроля гормональной секреции глюкозой.

Анализ последствий временного и отдельного исключения рTF в репертуаре эндогенно активируемой экспрессии рTF проводили с целью объяснить такие изменения развития. Исключение Pdx-1 и Pax4 вызвали заметное снижение экспрессии большинства других рTF (включая NeuroG3, NKX2.2, NKX6.2 и Pax6), что дает основание предположить, что их потенциальный вклад в увеличение эффективности трансдифференцировки связан с их способностью активировать эндогенные панкреатические TF (фиг. 6D). С другой стороны, исключение MafA не способствовало дальнейшей активации эндогенной экспрессии рTF, возможно отражая их позднюю и ограниченную экспрессию только в панкреатических β -клетках. Напротив, вклад MafA в увеличенную активность промотора инсулина, процессинг прогормонов и их глюкозорегулируемую секрецию был связан только с пониженной экспрессией Isl-1 (фиг. 6D). Эти данные могут указывать, что MafA не участвует в последующей стимуляции эффективности эндогенной экспрессии рTF и трансдифференцировки печени в поджелудочную железу, а скорее в стимуляции созревания трансдифференцированных клеток.

Пример 8. Isl-1 предотвращает созревание трансдифференцированных клеток по β -клеточной линии.

Влияние MafA на β -клеточное созревание может быть частично связано с его способностью подавлять экспрессию Isl1. Для проверки этой гипотезы, эктопический Isl1 был введен посредством аденовирусной инфекции (Ad-Isl1) в трансдифференцированные клетки. Коротко, зрелые человеческие клетки печени обрабатывали прямым "иерархическим" последовательным порядком инфицирования (обработка С) с добавлением Ad-Isl1 (1 или 100 MOI) в 3-ий день (С+Isl1).

Как указано выше, последовательное введение трех рTF в прямом иерархическом порядке (обработка С) приводило к увеличению эффективности трансдифференцировки и созреванию недавно полученных клеток по β -клеточной линии. Isl1 совместно вводили с MafA в третий день (С+Isl1). Действительно, избыточная экспрессия Isl1 в третий день, под контролем гетерологичного промотора, приводила к существенному уменьшению экспрессии гена инсулина и нарушению глюкозорегулируемой секреции (про)инсулина (фиг. 7). Потеря чувствительности к глюкозе была связана с уменьшением экспрессии GLUT2 (фиг. 7С). Эти результаты указывают, что нерегулируемая экспрессия Isl1 на заключительных этапах протокола трансдифференцировки потенциально препятствует созреванию по β -клеточной линии и может частично объяснять нарушение созревания при низкой экспрессии MafA.

В совокупности, эти данные предполагают важнейшую, необходимую роль прямой иерархической экспрессии рTF в активации созревания трансдифференцированных клеток печени по β -клеточной линии. Кроме того, последовательный процесс развития связан как с активацией, так и с репрессией рTF, что может активировать или препятствовать созреванию трансдифференцированных клеток по панкреатической β -клеточной линии.

Пример 9. Иерархическое введение Pdx-1, Pax4 и MafA вызывает экспрессию соматостатина и глюкагона.

Трансдифференцировка по эндокринной панкреатической клеточной линии приводит к активации экспрессии многочисленных панкреатических гормонов. Также исследовали степень, в которой на эти уровни экспрессии гормонов влияет временная манипуляция рTF. Экспрессию гена гормона поджелудочной железы глюкагона (GCG) (фиг. 8А и 8В), соматостатина (SST) (фиг. 8А, 8D и 8Е) или клеточных специфических факторов транскрипции (фиг. 8С) определяли с помощью количественного ПЦР анализа в реальном времени после указанных обработок.

Транскрипция генов глюкагона (GCG) и соматостатина (SST) была индуцирована каждым из отдельно экспрессируемых рTF, главным образом Pdx-1 и MafA, и, в более низкой степени, Pax4 (фиг. 8А). Дальнейшее увеличение транскрипции гена глюкагона наблюдалось только при прямом иерархическом введении рTF (фиг. 4А, см. обработку С). Pdx-1 и MafA воздействовали на экспрессию глюкагона в процессе, связанном с активацией клеточно-специфических факторов транскрипции ARX и BRAI4 или ARX в отдельности, соответственно (фиг. 8С). Экспрессия гена соматостатина, которая оставалась незатронутой большинством обработок (фиг. 8А и 8D), была увеличена, когда временной протокол был завершен эктопической экспрессией Pax4 (E=Pdx-1→Maf A→Pax4). Этот последовательный протокол также продемонстрировал негативный эффект на глюкозорегулируемую секрецию (про)инсулина и был связан с увеличением эндогенной экспрессии Isl1 (фиг. 3С и Е). Нарушение созревания по β -клеточной линии было связано с увеличением экспрессии гена соматостатина и увеличением количества соматостатин-положительных клеток (фиг. 8F). Многие из клеток показали колокализацию соматостатина и инсулина (данные не показаны).

Исключение каждого рTF из иерархического введения (обработка С), как обсуждается в примере 6,

также использовали для дополнительного исследования роли отдельных pTF в экспрессии глюкагона и соматостатина (фиг. 8B и 8D). Исключение Pax4 существенно снижало экспрессию гена соматостатина, указывая на его потенциальную роль в стимуляции транскрипции данного гена (фиг. 8D). Примечательно, что исключение MafA в конце процесса развития также существенно повышало экспрессию гена соматостатина, предполагая потенциальный ингибиторный эффект MafA в отношении экспрессии гена соматостатина. Этот эффект мог быть также связан со способностью MafA подавлять экспрессию Isl1. Чтобы рассмотреть данную гипотезу, было проанализировано влияние эктопического Isl1 на экспрессию гена соматостатина. Действительно, введение Ad-Isl1 в третий день вместе с MafA (C+Isl1) повышало экспрессию гена соматостатина (фиг. 8E), уменьшив экспрессию гена инсулина, гормональную продукцию и секрецию (фиг. 8A, 8B и 7). При таких условиях эксперимента, 40% инсулинпродуцирующих клеток положительно окрашивались на соматостатин, и очень мало клеток экспрессировали только один соматостатин.

Эти результаты дают возможность предположить, что часть созревания трансдифференцированных клеток в р-клетки объясняется экспрессией MafA на поздних стадиях процесса трансдифференцировки. На данном этапе MafA ограничивает экспрессию соматостатина в процессе, связанном с его способностью ингибировать экспрессию Isl1.

На фиг. 9 показан предположительный механизм индуцированной панкреатическими факторами транскрипции трансдифференцировки печени в поджелудочную железу. Каждый из pTF способен активировать средний β -клеточный фенотип в ограниченном количестве человеческих клеток печени. Совместная экспрессия pTF заметно усиливает трансдифференцировку печени в эндокринную поджелудочную железу. Однако недавно полученные клетки являются незрелыми и коэкспрессируют инсулин и соматостатин. Только последовательное введение тех же факторов в прямом иерархическом порядке увеличивает эффективность трансдифференцировки, а также созревание трансдифференцированных клеток по β -клеточной линии.

Пример 10. Идентификация популяций клеток со способностью к трансдифференцировке *in vivo*.

Популяции клеток со способностью к трансдифференцировке были идентифицированы *in vivo* у мышей. Эктопическая экспрессия гена Pdx-1 была достигнута в печени мышей. Несмотря на однородную экспрессию эктопического гена Pdx-1 приблизительно в 40-50% клеток печени (фиг. 10A) (Ferber et al., Nat Med. 2000, и Ver et al., JBC, 2003), инсулинпродуцирующие клетки (IPC) у обработанных Pdx-1 мышей *in vivo* были, прежде всего, расположены близко к центральным венам (фиг. 10B), что характеризуется активной сигнализацией Wnt и экспрессией глутаминсинтетазы (GS) (фиг. 1C). Колокализация экспрессии GS и активации инсулина Pdx-1 также указывала, что клетки, которые могут активировать GSRE, имеют предрасположенность к увеличенной способности к трансдифференцировке. Таким образом, популяции клеток, предрасположенные к трансдифференцировке, могут быть также идентифицированы по активации GSRE и активному пути сигнализации Wnt.

Пример 10. Применением аденовирусов для идентификации человеческих клеток печени, предрасположенных к трансдифференцировке.

Данный пример демонстрирует применение рекомбинантных аденовирусов для идентификации человеческих клеток печени, которые предрасположены к трансдифференцировке. Человеческие клетки печени в культуре являются гетерогенными отношении активации внутриклеточного сигнального пути Wnt и экспрессии GS. Поскольку GS уникально экспрессируется в периферических клетках печени, способность активировать GSRE (GS регуляторный элемент) может использоваться в качестве селективного параметра при выделении соответствующих клеток (Gebhardt et al., Prog Histochem Cytochem, 2007; Gebhardt et al., Methods Mol Biol, 998; и Gaunitz et al., Hepatology, 2005).

Кроме того, так как GSRE содержит также STAT3 связывающий элемент, предрасположенность клеток к трансдифференцировке может быть опосредована этим элементом. Путь STAT3 может быть также задействован при получении клеток с предрасположенностью к репрограммированию или трансдифференцировке (фиг. 10, 11, 14 и 19).

Пример 11. GSRE периодически воздействует на 13-15% человеческих клеток печени в культуре. GSRE включает TCF/LEF и STAT5 связывающие элементы (фиг. 11).

Были созданы два рекомбинантных аденовируса, которые несут экспрессию гена eGFP или генов Pdx-1 под контролем GSRE (фиг. 11), функционально связанного с минимальным промотором ТК (фиг. 11). Данные аденовирусы направляли экспрессию Pdx-1 (фиг. 12A) или eGFP (фиг. 12B). Оба белка были периодически экспрессировались приблизительно в 13-15% человеческих клеток печени в культуре, указывая на их воздействие на определенную популяцию клеток печени.

Пример 12. GSRE-направляемый PDX-1 более эффективен, чем CMV-направляемый PDX-1 при активации синтеза инсулина в клетках печени.

Несмотря на периодическую экспрессию GSRE-направляемого PDX-1, только приблизительно у 13±2% клеток в культуре способность к трансдифференцировке была аналогичной или более высокой, чем при индукции Ad-CMV-Pdx-1, который направляет экспрессию Pdx-1 в 60-80% клеток в культуре (фиг. 13). GSRE-активирующие клетки могли обеспечивать большую часть способности к трансдиффе-

ренцировке всех зрелых человеческих клеток печени в культуре. Продукцию инсулина обнаруживали в 25% Pdx-1 положительных клеток при обработке Ad-GSRE-Pdx-1 по сравнению с 1% клеток, обработанных Ad-CMV-Pdx-1.

Пример 13. Применение лентивирусов для постоянного мечения GSRE+ клеток eGFP.

Постоянную визуализацию линии дифференцировки производили при использовании лентивирусной конструкции. Визуализацию линии дифференцировки *in vitro* по активности GSRE выполняли с помощью модифицированной двойной лентивирусной системы, использованной недавно для обнаружения KRT5 в кератиноцитах (Mauda-Havakuk, et al., PLoS One, 2011) или экспрессии альбумина (Meivar-Levy et al., J Transplant, 2011) в клетках печени. Указанная лентивирусная система (в сотрудничестве с профессором P. Ravassard из Университета Пьера и Марии Кюри, Париж, Франция; фиг. 12A) включает CMV-loxP-DsRed2-loxP-eGFP(R/G) репортер (Meivar-Levy et al., J Transplan, 2011; Mauda-Havakuk et al., PLoS One, 2011; и Russ et al., Diabetes, 2008) и дополнительный лентивирусный вектор, несущий экспрессию рекомбиназы Cre под контролем GSRE и минимального промотора ТК (великодушно предоставленный профессором Gaunitz, (Gebhardt et al., Prog Histochem Cytochem, 2007 и Gaunitz et al., Hepatology, 2005), Германия, фиг. 3A). Таким образом, GSRE-активирующие клетки были необратимо помечены eGFP (eGFP+), тогда как остальная часть дважды инфицированных клеток была помечена DsRed2 (DsRed2+). Десять-четырнадцать процентов клеток стали eGFP+ за менее чем 10 дней (фиг. 14B). Клетки разделяли с помощью клеточного сортера (фиг. 14) и выращивали отдельно (фиг. 15A). Культуры eGFP- (GSRE активаторы) и DsRed2+ клеток были получены от 10 различных людей доноров (возрастом 3-60 лет).

Пример 14. EGFP+ клетки систематически демонстрировали превосходную способность к трансдифференцировке.

Человеческие клетки печени, разделенные при визуализации линий дифференцировки по активности GSRE, эффективно размножались (фиг. 15A) и были так же эффективно инфицированы рекомбинантными аденовирусами. eGFP+ клетки систематически демонстрировали превосходную способность к трансдифференцировке (фиг. 16), проявляющуюся в экспрессии генов инсулина и глюкагона, которая была сопоставима с экспрессией человеческих островков Лангерганса в культуре (фиг. 16A), глюкозорегулируемой секреции инсулина (фиг. 16B) и глюкозорегулируемой секреции С-пептида (фиг. 16C). Эти способности были постоянными и не уменьшались при масштабной пролиферации клеток (фиг. 17).

Пример 15. Исследование клеток с предрасположенностью к трансдифференцировке.

Для установления факторов, которые могли потенциально воздействовать на различную эффективность трансдифференцировки человеческих клеток печени, сравнивали глобальный профиль экспрессии генов двух разделенных популяций при использовании микроматричного анализа на чипах. Культуры человеческих клеток печени были получены от 3 различных доноров и разделены на eGFP+ и DsRed2+ клетки и размножены 4 пассажами. Выделенную РНК превращали в кДНК и подвергали микроматричному анализу на чипах при использовании General Human Array (GeneChip Human Genome U133A 2.0 Array, Affymetrix). Тогда как большинство генов в разделенных группах экспрессировалось на сопоставимых уровнях, экспрессия приблизительно 800 проб значительно отличалась (фиг. 18). Согласно микроматричному анализу на чипах, приблизительно 100 генов, кодирующих мембранные белки, экспрессировались дифференцированно у склонных к трансдифференцировке (eGFP+) и не реагирующих (DsRed2+) клеток. Несколько таких маркеров представлены в табл. 2.

Таблица 2

Мембранные антигены, которые дифференцированно экспрессируются в eGFP+ и DsRed2+ клетках

Антиген	Высокая экспрессия	iFold (Log 2)	p-значение	Коммерческое антитело
ABCB1	DsRed2	-6.363	1.52E-02	BD Biosciences (#557002)
ITGA4	DsRedz	-1.979	2.69E-02	iR&D system (FAB1 3 54G)
ABCB4	DsRedE	-4.42	4.62E-02	iAbcam (ab24108)
PRNP	DsRed2	-1.35	4.20E-02	ieBioscience (12-9230-73)
HOMER1	eGFP	1.41	3.25E-04	Biorbyt (orb37754)
LAMP 3	eGFP	1.285	1.81E-02	BD Biosciences (#558 126)
BXIPR2	eGFP	1.236	3.50E-02	iR&D system (AF8 11)

Данные микрочипов указывают на многочисленные мембранные белки, которые дифференциально экспрессируются между клетками eGFP+ и DsRed2+ (Кратность = eGFP+ дифференциальная экспрессия)

по сравнению с DsRed2+ (log 2)). Для всех представленных антигенов имеются коммерчески доступные антитела.

Пример 16. Сигнализация Wnt активна в клетках, предрасположенных к трансдифференцировке.

Зонирование печени предположительно регулируется градиентом уровней активированного β -катенина; тогда как большинство клеток в печени имеют очень низкую активность β -катенина, периферические клетки печени экспрессируют высокую активность β -катенина, связанную с активной сигнализацией Wnt (Gebhardt, et al., Prog Histochem Cytochem, 2007). Так как сигнализация Wnt обязательна для активности компетентных β -клеток (Liu et al., J Biol Chem, 2008; Liue et al., Adv Exp Med Biol, 2010; Loder et al., Biochem Soc Trans, 2008; и Shu et al., Diabetes, 2008), рTF-индуцированная активация панкреатической линии дифференцировки в печени ограничено клетками, которые изначально проявляют активную сигнализацию Wnt.

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

Эти данные в зрелых человеческих клетках печени предполагают, что растущие концентрации Wnt3a увеличивали Pdx-1-индуцированную глюкозорегулируемую секрецию инсулина, тогда как DKK3 (ингибитор сигнального пути Wnt) полностью устранял влияние Pdx-1 на процесс (фиг. 19). DKK3 также полностью устранял способность к трансдифференцировке у eGFP клеток, выделенных в соответствии с их способностью активировать GSRE (фиг. 20).

Было проведено исследование активности сигнального пути Wnt в популяциях eGFP+ и DsRed+ клеток. Экспрессия APC, который участвует в дестабилизации β -катенина, уменьшая таким образом сигнализацию Wnt, была на 700% выше в DsRed2+ клетках, чем в eGFP+ клетках (фиг. 21A, в относительном соответствии с зонированием, показанным *in vivo*). eGFP+ популяция имела повышенные уровни активированного β -катенина (40%) по сравнению с уровнями, проанализированными в DsRed2+ клетках (фиг. 21B и C). Эти данные демонстрируют, что сигнализация Wnt активна в клетках, которые компетентны для активации GSRE и имеют предрасположенность к трансдифференцировке.

Другие варианты осуществления

Хотя изобретение было описано в соответствии с подробным описанием, предшествующее описание предназначено для иллюстрации и не ограничивает объем изобретения, который определяется объемом прилагаемой формулы изобретения. Другие аспекты, преимущества и модификации включены в следующую формулу изобретения.

Список литературы

1. Ambasudhan, R., M. Talantova, et al. (2011). Direct reprogramming of adult human fibroblasts to functional neurons under defined conditions. *Cell* 9: 113-118.
2. Atala, A. (2008). Extending life using tissue and organ replacement. *Curr Aging Sci* 1: 73-83.
3. Aviv, V., I. Meivar-Levy, et al. (2009). Exendin-4 promotes liver cell proliferation and enhances PDX-1-induced liver to pancreas transdifferentiation. *J Biol Chem* 284:33509-33520.
4. Ber, I., K. Shternhall, et al. (2003). Functional, persistent, and extended liver to pancreas transdifferentiation. *J Biol Chem* 278: 31950-31957.
5. Bernardo, A. S., C. W. Hay, et al. (2008). Pancreatic transcription factors and their role in the birth, life and survival of the pancreatic beta cell. *Mol Cell Endocrinol* 294: 1-9.
6. Bonal, C. and P. L. Herrera (2008). Genes controlling pancreas ontogeny. *Int J Dev Biol* 52: 823-835.
7. Borowiak, M. (2010). The new generation of beta-cells: replication, stem cell differentiation, and the role of small molecules. *Rev Diabet Stud* 7: 93-104.
8. Brun, T. and B. R. Gauthier (2008). A focus on the role of Pax4 in mature pancreatic islet beta-cell expansion and survival in health and disease. *J Mol Endocrinol* 40: 37-45.
9. Chakrabarti, S. K. and R. G. Mirmira (2003). Transcription factors direct the development and function of pancreatic b-cells. *Trends Endocrinol Metab* 14: 78-84.
10. Collombat, P., J. Hecksher-Sorensen, et al. (2006). Specifying pancreatic endocrine cell fates. *Mech Dev* 123: 501-512.
11. Collombat, P., A. Mansouri, et al. (2003). Opposing actions of Arx and Pax4 in endocrine pancreas development. *Genes Dev* 17: 2591-2603.
12. D'Amour, K. A., A. D. Agulnick, et al. (2005). Efficient differentiation of human embryonic stem cells to

definitive endoderm. *Nat Biotechnol.* 23: 1534-1541.

13. Eberhard, D. and E. Lammert (2009). The pancreatic beta-cell in the islet and organ community. *Curr Opin Genet Dev* 19: 469-475.

14. Ferber, S., A. Halkin, et al. (2000). Pancreatic and duodenal homeobox gene 1 induces expression of insulin genes in liver and ameliorates streptozotocin-induced hyperglycemia. *Nat Med* 6 : 568-572.

15. Gefen-Halevi, S., I . H. Rachmut, et al. (2010). NKX6.1 promotes PDX-1-induced liver to pancreatic beta-cells reprogramming. *Cell Reprogram* 12: 655-664.

16. Gradwohl, G., A. Dierich, et al. (2000). neurogenic is required for the development of the four endocrine cell lineages of the pancreas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 1607-1611.

17. Hanna, J., S. Markoulaki, et al. (2008). Direct reprogramming of terminally differentiated mature B lymphocytes to pluripotency. *Cell* 133: 250-264.

18. He, T. C , S. Zhou, et al. (1998). A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 2509-2514.

19. Ieda, M., J. D. Fu, et al. (2010). Direct reprogramming of fibroblasts into functional cardiomyocytes by defined factors. *Cell.* 142: 375-386.

20. Iwasaki, FL, S. Mizuno, et al. (2006). The order of expression of transcription factors directs hierarchical specification of hematopoietic lineages. *Genes Dev* 20: 3010-3021.

21. Kaneto, FL, T. A. Matsuoka, et al. (2005). A crucial role of MafA as a novel therapeutic target for diabetes. *J Biol Chem* 280: 15047-15052.

22. Kaneto, FL, Y.Nakatani, et al. (2005). PDX-1 /VP 16 fusion protein, together with NeuroD orNgn3, markedly induces insulin gene transcription and ameliorates glucose tolerance. *Diabetes* 54: 1009-1022.

23. Kataoka, K., S.I. Han, et al. (2002). MafA is a

glucose-regulated and pancreatic beta-cell-specific transcriptional activator for the insulin gene. *J Biol Chem* 277: 49903-49910.

24. Koizumi, M., R. Doi, et al. (2004). Hepatic regeneration and enforced PDX-1 expression accelerate transdifferentiation in liver. *Surgery* 136: 449-457.

25. Kojima, H., M. Fujimiya, et al. (2003). NeuroD-beta-cellulin gene therapy induces islet neogenesis in the liver and reverses diabetes in mice. *Nat Med* 9:596-603.

26. Kroon, E., L. A. Martinson, et al. (2008). Pancreatic endoderm derived from human embryonic stem cells generates glucose-responsive insulin-secreting cells in vivo. *Nat Biotechnol* 26: 443-452.

27. Meivar-Levy, I. and S. Ferber (2003). New organs from our own tissues: liver-to-pancreas transdifferentiation. *Trends Endocrinol Metab* 14: 460-466.

28. Meivar-Levy, I. and S. Ferber (2006). Regenerative medicine: using liver to generate pancreas for treating diabetes. *Isr Med Assoc J.* 8:430-434.

29. Meivar-Levy, I. and S. Ferber (2010). Adult cell fate reprogramming: converting liver to pancreas. *Methods Mol. Biol.* 636: 251-283.

30. Meivar-Levy, I., T. Sapir, et al. (2011). Human liver cells expressing albumin and mesenchymal characteristics give rise to insulin-producing cells. *J Transplant* 2011: 252387.

31. Meivar-Levy, I., T. Sapir, et al. (2007). Pancreatic and duodenal homeobox gene 1 induces hepatic dedifferentiation by suppressing the expression of CCAAT/enhancer-binding protein beta. *Hepatology* 46: 898-905.

32. Murtaugh, L. C. and D. A. Melton (2003). Genes, signals, and lineages in pancreas development. *Annu Rev Cell Dev Biol* 19: 71-89.

33. Nishimura, W., S. Bonner-Weir, et al. (2009). Expression of MafA in pancreatic progenitors is detrimental for pancreatic development. *Dev Biol* 333: 108-120.

34. Offield, M. F., T. L. Jetton, et al. (1996). PDX-1 is

required for pancreatic outgrowth and differentiation of the rostral duodenum. *Development* 122: 983-995.

35. Olbrot, M., J. Rud, et al. (2002). Identification of beta-cell-specific insulin gene transcription factor RIPE3bl as mammalian MafA. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 6737-6742.

36. Pang, Z. P., N. Yang, et al. (2011). Induction of human neuronal cells by defined transcription factors. *Nature* 476: 220-223.

37. Russ, H. A. and S. Efrat (2011). Development of human insulin-producing cells for cell therapy of diabetes. *Pediatr Endocrinol Rev* 9:590-597.

38. Sapir, T., K. Shternhall, et al. (2005). From the Cover: Cell-replacement therapy for diabetes: Generating functional insulin-producing tissue from adult human liver cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 7964-7969.

39. Seijffers, R., O. Ben-David, et al. (1999). Increase in PDX-1 levels suppresses insulin gene expression in RTN 1046-38 cells. *Endocrinology* 140: 3311-3317.

40. Sheyn, D., O. Mizrahi, et al. (2010). Genetically modified cells in regenerative medicine and tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev* 62: 683-698.

41. Slack, J. M. and D. Tosh (2001). Transdifferentiation and metaplasia-switching cell types. *Curr Opin Genet Dev* 11: 581-586.

42. Song, Y. D., E. J. Lee, et al. (2007). Islet cell differentiation in liver by combinatorial expression of transcription factors neurogenin-3, BETA2, and RIPE3bl. *Biochem Biophys Res Commun.* 354: 334-339. .

43. Staffers, D. A., M. K. Thomas, et al. (1997). The homeodomain protein IDX-1. *Trends Endocrinol. & Metab.* 8: 145-151.

44. Szabo, E., S. Rampalli, et al. (2010). Direct conversion of human fibroblasts to multilineage blood progenitors. *Nature* 468: 521-526.

45. Takahashi, K. and S. Yamanaka (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult

fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126: 663-676.

46. Tang, D. Q., L. Z. Cao, et al. (2006). Role of Pax4 in Pdx1-VP16-mediated liver-to-endocrine pancreas transdifferentiation. *Lab Invest.* 86: 829-841.

47. Varda-Bloom, N., A. Shaish, et al. (2001). Tissue-specific gene therapy directed to tumor angiogenesis. *Gene Ther* 8: 819-827.

48. Vierbuchen, T., A. Ostermeier, et al. (2010). Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. *Nature* 463: 1035-1041.

49. Wang, A. Y., A. Ehrhardt, et al. (2007). Adenovirus Transduction is Required for the Correction of Diabetes Using Pdx-1 or Neurogenin-3 in the Liver. *Mol Ther* 15: 255-263.

50. Yamanaka, S. (2008). Induction of pluripotent stem cells from mouse fibroblasts by four transcription factors. *Cell Prolif.* 41: 51-56.

51. Yechoor, V. and L. Chan (2010). Minireview: beta-cell replacement therapy for diabetes in the 21st century: manipulation of cell fate by directed differentiation. *Mol Endocrinol* 24: 1501-1511.

52. Zhou, Q., J. Brown, et al. (2008). In vivo reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to beta-cells. *Nature* 455: 627-632.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения популяции трансдифференцированных первичных зрелых клеток печени млекопитающего, имеющих фенотип и функцию зрелых бета-клеток поджелудочной железы, где способ включает:

(a) получение популяции зрелых первичных клеток печени млекопитающего, обогащенной клетками, которые имеют предрасположенность к трансдифференцировке, где обогащенную популяцию получают путем получения популяции зрелых клеток печени млекопитающего и выделения субпопуляции клеток, включающих:

- i) активный сигнальный путь Wnt (wingless-type MMTV integration site family); или
- ii) повышенную экспрессию GSRE (глутаминсинтетаза-отвечающий элемент); или
- iii) повышенную экспрессию HOMER1 (homer scaffolding protein 1), LAMP3 (lysosomal associated membrane protein 3) или BMPR2 (bone morphogenetic protein receptor type 2) или их любой комбинации; или
- iv) пониженную 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 их любой комбинации; или

их любую комбинацию,

(b) введение в указанную обогащенную популяцию зрелых первичных клеток печени млекопитающего полипептида панкреатодуоденального гомеобокса (PDX-1) или нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид PDX-1;

(c) введение в популяцию клеток этапа b) полипептида Pax-4 или полипептида NeuroD1, или нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид Pax-4, или нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид NeuroD1; и

(d) введение в популяцию клеток этапа (c) полипептид MafA или нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид MafA;

где полипептид или нуклеиновую кислоту согласно (c) вводят по меньшей мере 24 ч после или в то же время, что полипептид или нуклеиновую кислоту согласно (b), и где полипептид или нуклеиновую кислоту согласно (d) вводят по меньшей мере 24 ч после введения полипептида или нуклеиновой кислоты согласно (c); с получением трансдифференцированной популяции клеток, имеющих фенотип и функцию зрелых бета-клеток поджелудочной железы.

2. Способ по п.1, где клетки, включающие активный сигнальный путь Wnt, включают повышенную экспрессию Wnt3a (Wnt Family Member 3A) или бета-катенина, или STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3) связывающие элементы, или их любую комбинацию, или пониженную экспрессию

DKK1 (Dickkopf WNT signaling pathway inhibitor 1), или DKK3 (Dickkopf WNT signaling pathway inhibitor 3), или APC (activated protein C), или их любую комбинацию.

3. Способ по п.1, где указанная стадия получения включает инкубацию популяции зрелых клеток печени млекопитающего с Wnt3a.

4. Способ по п.1, где полипептид или нуклеиновую кислоту согласно (с) вводят в то же время, что полипептид или нуклеиновую кислоту согласно (b), и полипептид или нуклеиновую кислоту согласно (d) вводят по меньшей мере 48 ч после введения полипептида или нуклеиновой кислоты согласно (с).

5. Способ по п.1, где полипептид или нуклеиновую кислоту согласно (с) вводят в то же время, что полипептид или нуклеиновую кислоту согласно (b), и нуклеиновая кислота, кодирующий полипептид PDX-1, дополнительно кодирует полипептид NeuroD1 или полипептид Pax-4.

6. Способ по п.1, где указанные предрасположенные клетки печени включают перицентральные клетки печени.

7. Способ по п.1, где указанная популяция трансдифференцированных клеток содержит увеличенный процент (%) трансдифференцированных клеток, имеющих указанный фенотип и функцию зрелых бета-клеток поджелудочной железы по сравнению с процентом зрелых трансдифференцированных клеток, полученных из необогащенной популяции клеток.

8. Способ по п.1, где указанный фенотип и функция зрелых бета-клеток поджелудочной железы включают повышенную продукцию инсулина или повышенную секрецию инсулина, регулируемую глюкозой, или повышенную секрецию С-пептида, регулируемую глюкозой, или любую их комбинацию по сравнению с контрольной популяцией нетрансдифференцированных первичных зрелых клеток печени млекопитающего.

9. Способ по п.8, где указанная повышенная продукция инсулина, повышенная секреция инсулина, регулируемая глюкозой, или повышенная секреция С-пептида, регулируемая глюкозой, совмещена с пониженной экспрессией гена Isl1 или сниженной продукцией соматостатина или любой их комбинацией.

10. Способ по п.1, где указанный фенотип зрелых бета-клеток поджелудочной железы включает повышенную экспрессию гена глюкогона по сравнению с контрольной популяцией нетрансдифференцированных зрелых клеток печени млекопитающего.

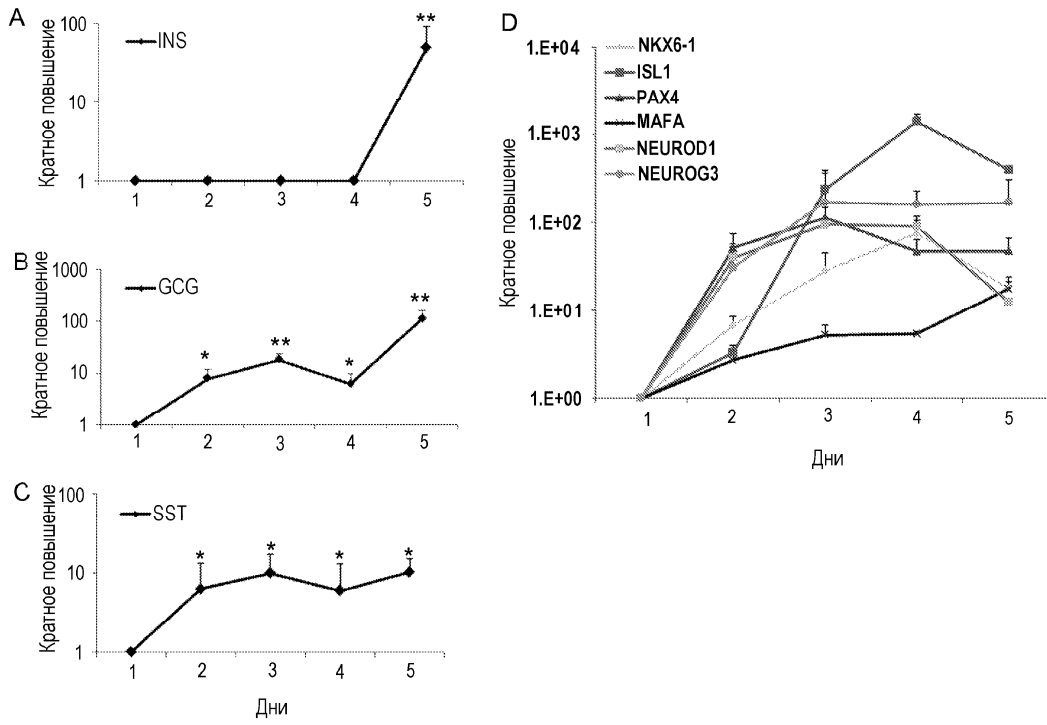
11. Популяция трансдифференцированных первичных зрелых клеток печени млекопитающего, имеющих фенотип и функцию зрелых бета-клеток поджелудочной железы, получаемые способом по п.1, где указанная популяция трансдифференцированных клеток печени включает по меньшей мере 20% перицентральных клеток печени и до 80% неперицентральных первичных зрелых клеток печени, и где указанный фенотип и функция зрелых бета-клеток поджелудочной железы включают повышенную продукцию инсулина или повышенную секрецию инсулина, регулируемую глюкозой, или повышенную секрецию С-пептида, регулируемую глюкозой, или любую их комбинацию по сравнению с контрольной популяцией нетрансдифференцированных первичных зрелых клеток печени млекопитающего.

12. Применение популяции трансдифференцированных первичных зрелых клеток печени млекопитающего по п.11 для изготовления лекарственного средства для лечения дегенеративного панкреатического нарушения.

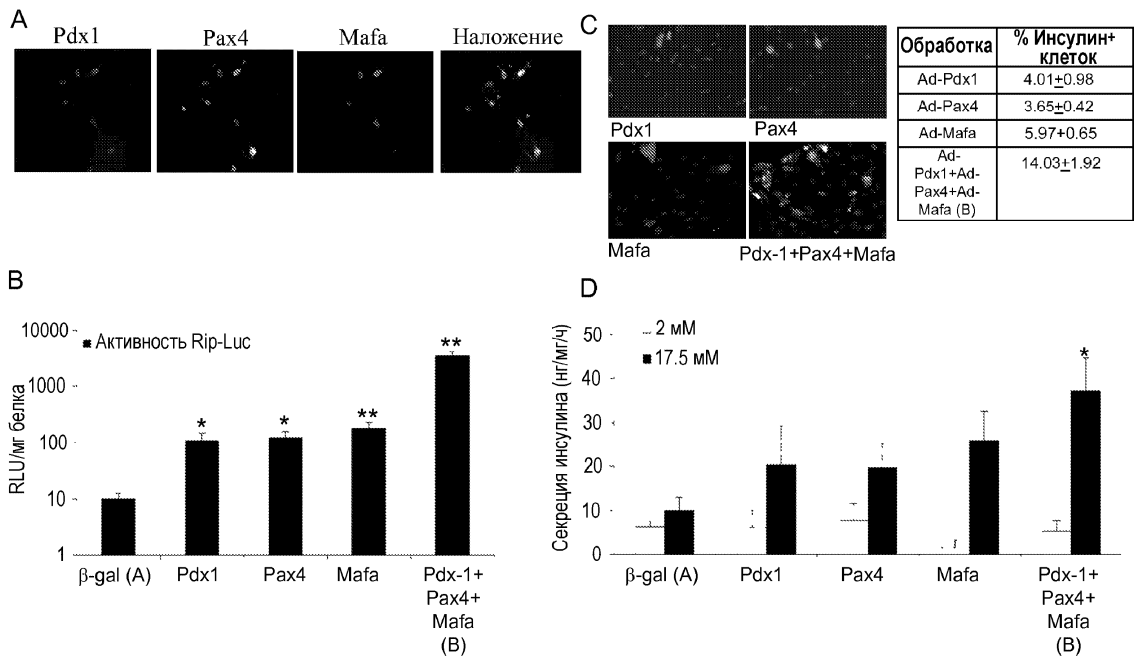
13. Применение по п.12, где дегенеративным панкреатическим нарушением является диабет.

14. Применение по п.13, где диабет является диабетом I типа или II типа.

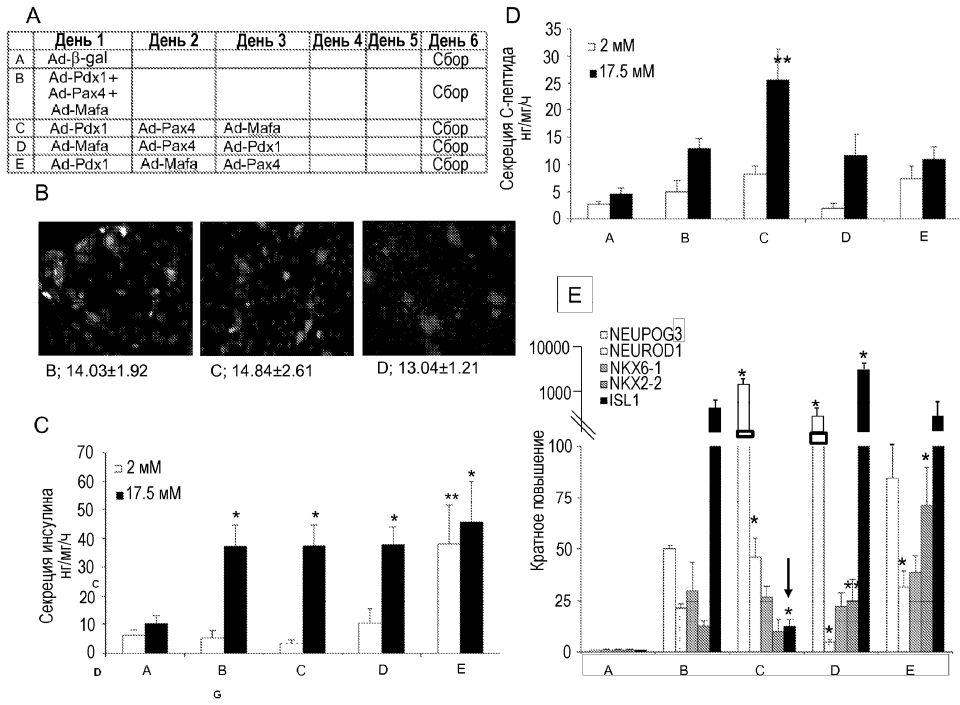
15. Применение по п.12, где дегенеративным панкреатическим нарушением является рак поджелудочной железы или панкреатит.



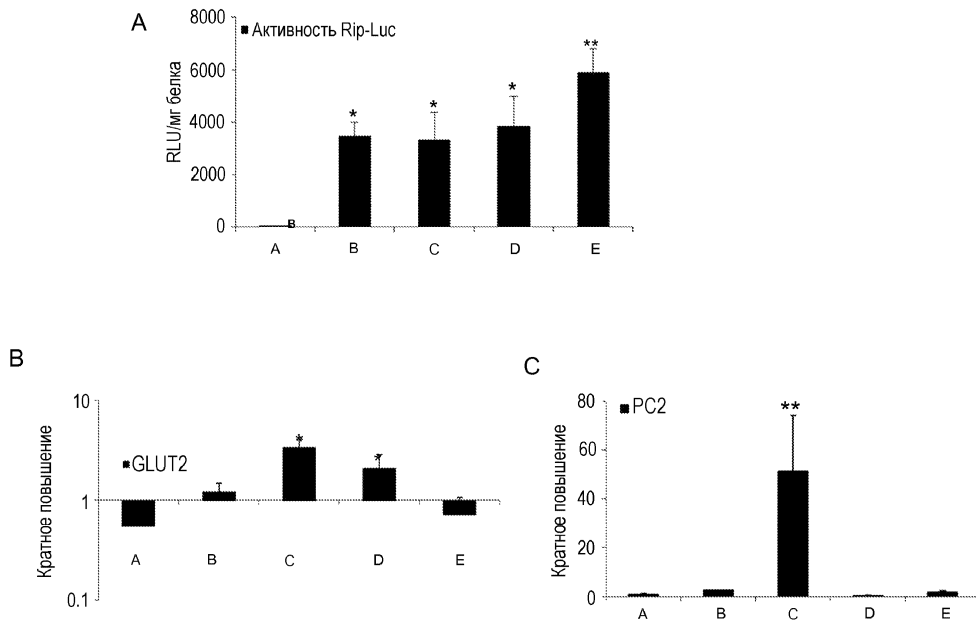
Фиг. 1



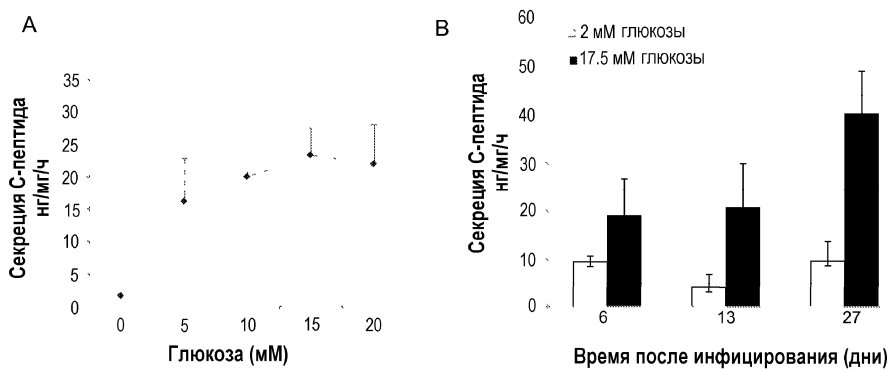
Фиг. 2



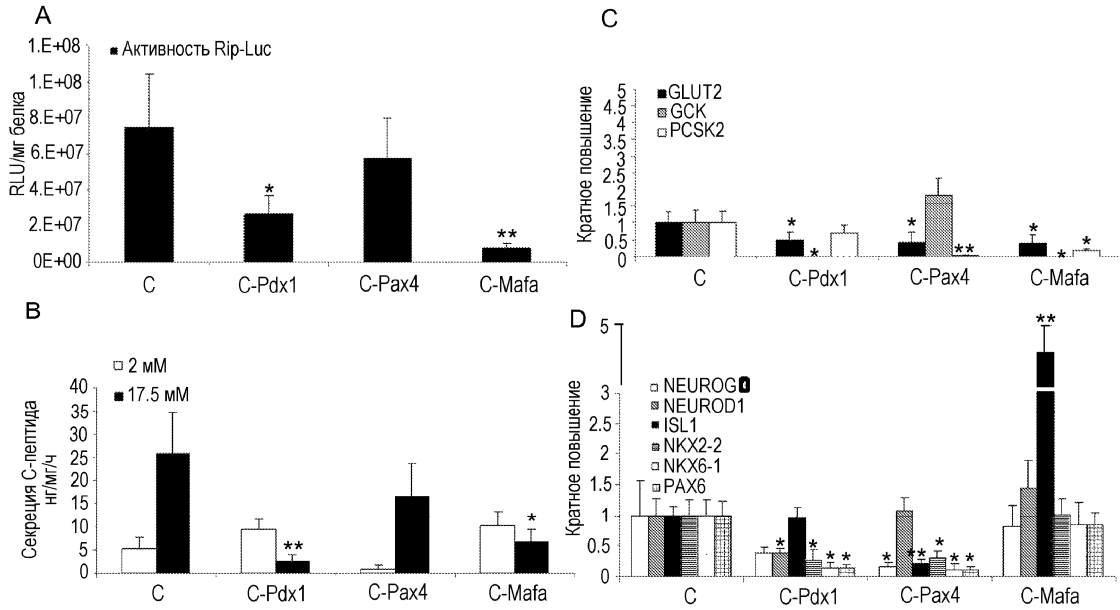
Фиг. 3



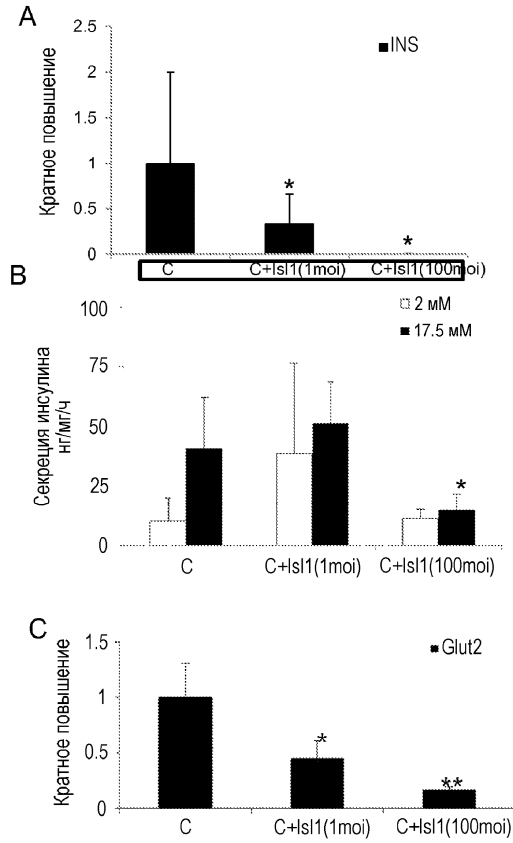
Фиг. 4



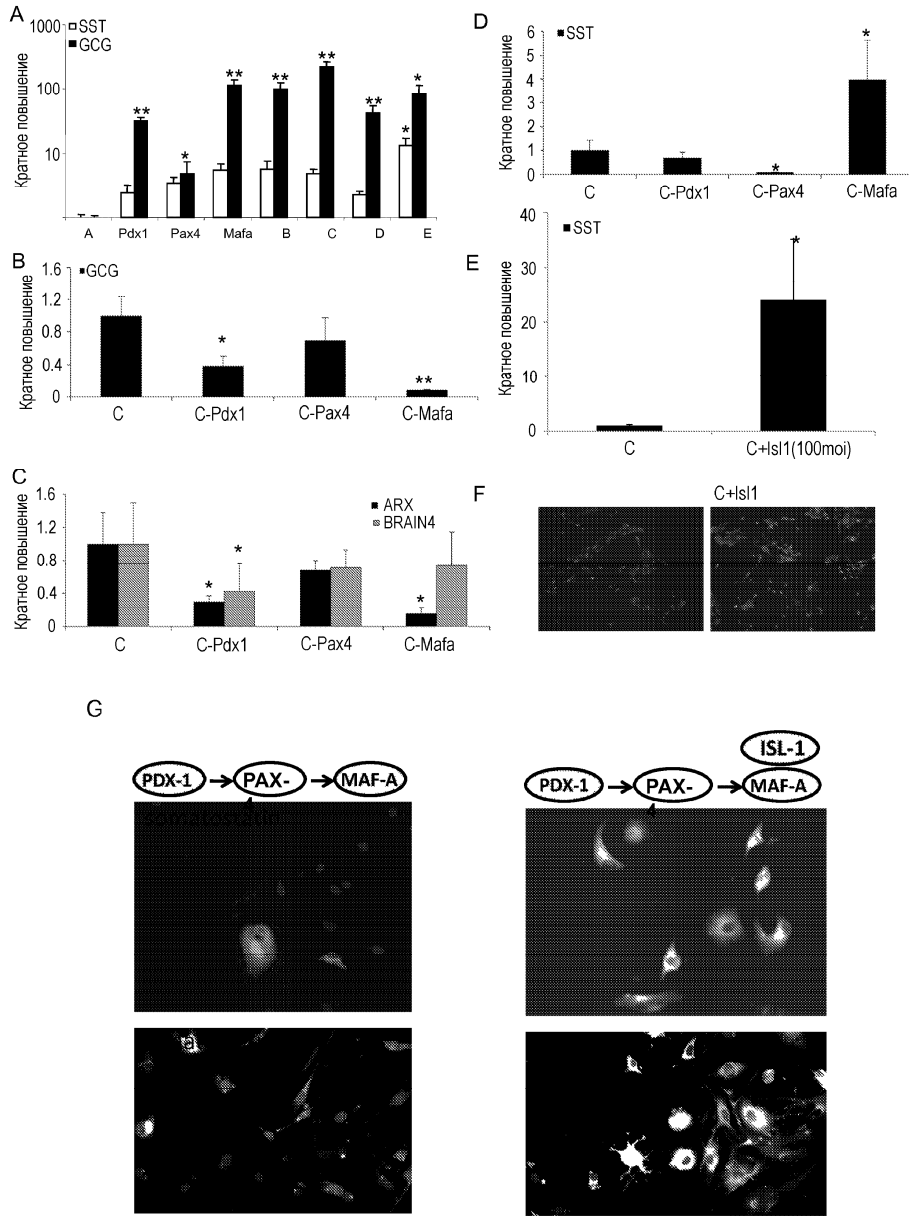
Фиг. 5



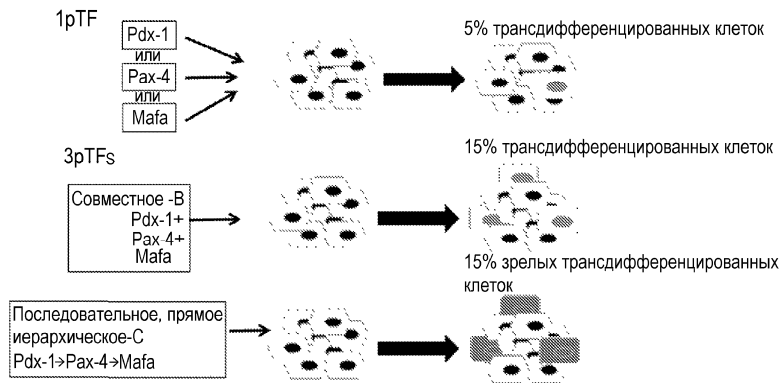
Фиг. 6



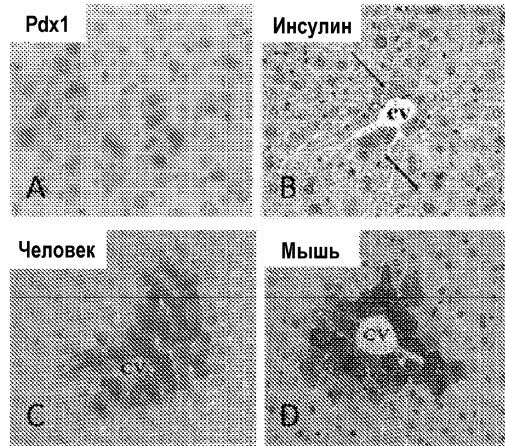
Фиг. 7



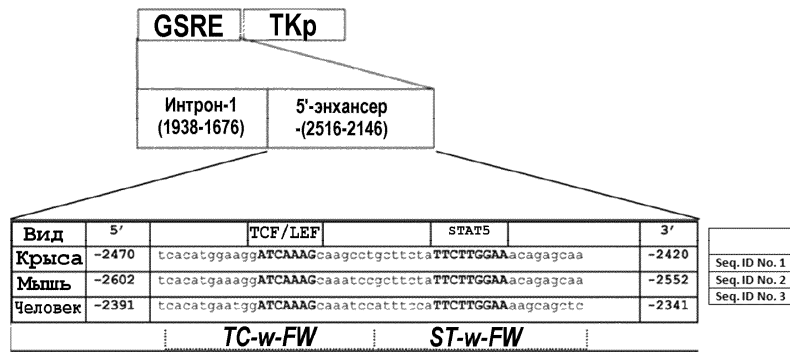
Фиг. 8



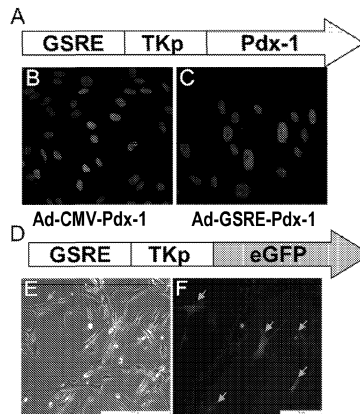
Фиг. 9



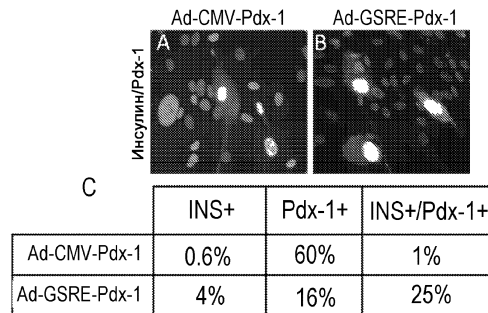
Фиг. 10



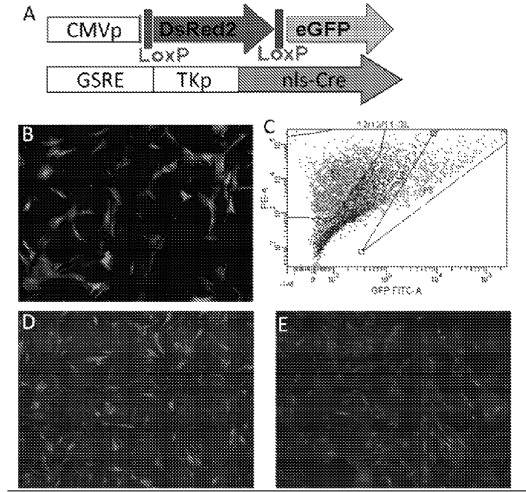
Фиг. 11



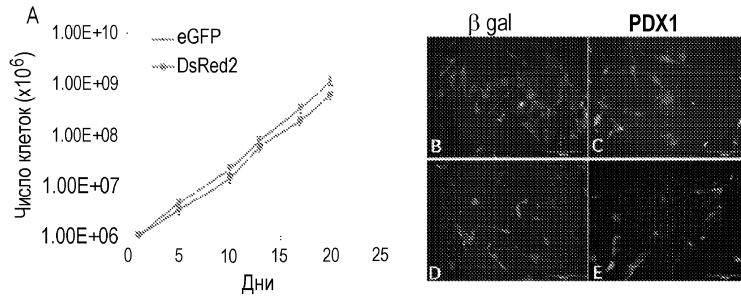
Фиг. 12



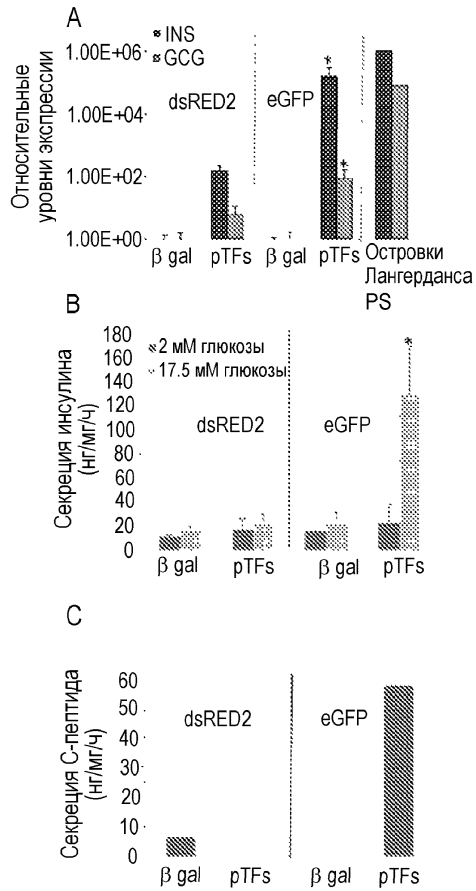
Фиг. 13



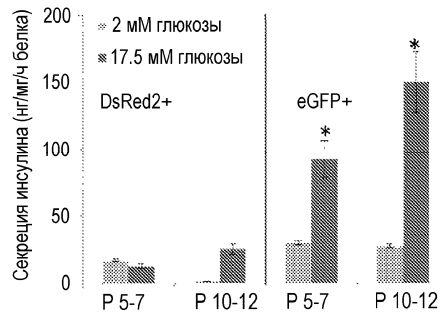
Фиг. 14



Фиг. 15



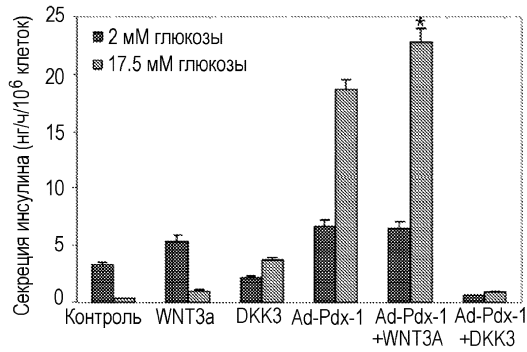
Фиг. 16



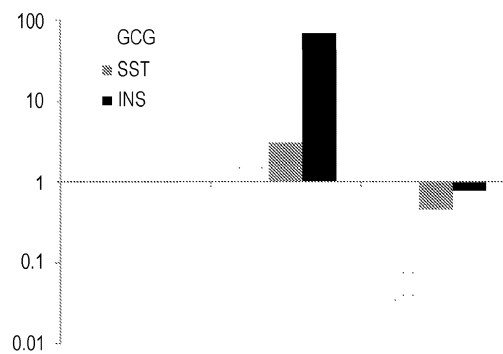
Фиг. 17



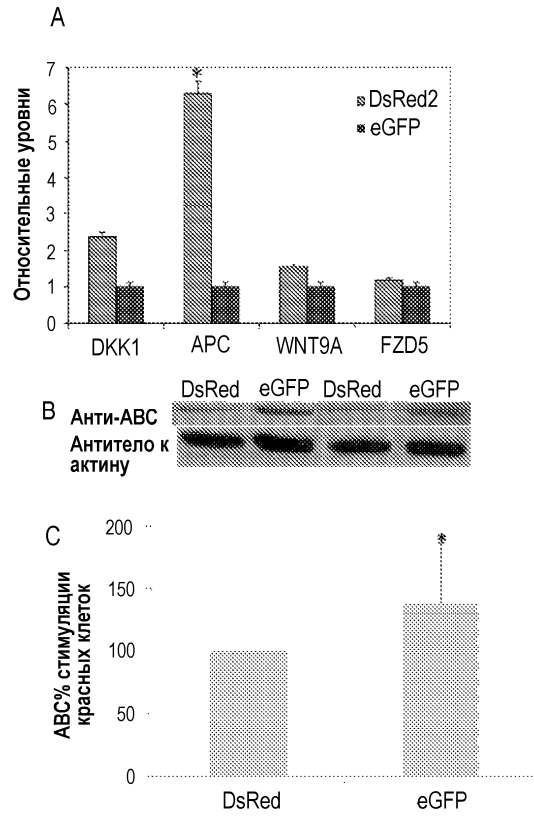
Фиг. 18



Фиг. 19



Фиг. 20



Фиг. 21

