

## Respuesta a Requerimientos

### 1 Datos del Solicitante

|                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                          |                                            |                                          |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------|--------------------------------------------|------------------------------------------|
| <b>Nombre:</b>                                                                                                                                                                                                                                                                          | CAROLINA<br>MERCEDES<br>DAZA<br>MONTALVO | <b>Dirección<br/>Electrónica:</b>          | notificaciones@clarkemodet.com.co        |
| <b>Dirección:</b>                                                                                                                                                                                                                                                                       | CARRERA 11<br>NO. 86-53, PISO 6          | <b>Domicilio/País de<br/>constitución:</b> | COLOMBIA - CUNDINAMARCA -<br>BOGOTA D.C. |
| <b>Identificación:</b><br><br><input checked="" type="checkbox"/> CEDULA DE CIUDADANIA <input type="checkbox"/> CEDULA DE EXTRANJERIA<br><input type="checkbox"/> EMPRESA EXTRANJERA <input type="checkbox"/> NIT<br><input type="checkbox"/> PASAPORTE<br><br><b>Número:</b> 66783790- |                                          |                                            |                                          |

### 2 Dato de la Creación

| Identificación de la Creación                                                         | No. de Certificado | Vigencia | No. de Expediente | Tipo Trámite                              |
|---------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|----------|-------------------|-------------------------------------------|
| POBLACIONES DE CÉLULAS, MÉTODOS DE TRANSDIFERENCIACIÓN Y MÉTODOS DE USO DE LAS MISMAS | 000000             |          | 16002017          | PCT-PATENTE DE INVENCION CAPITULOS I Y II |

|                                            |                          |                                                                                                                                                                                                                              |
|--------------------------------------------|--------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 3                                          | Texto de la Comunicación | Se presenta memorial de respuesta a oficio No. 832, junto con nuevo capítulo reivindicatorio conformado por veintisiete (27) reivindicaciones, lista de secuencias de aminoácidos y nucleótidos y nuevo capítulo descriptivo |
| 4                                          | Anexos                   |                                                                                                                                                                                                                              |
| <input checked="" type="checkbox"/> Anexos |                          |                                                                                                                                                                                                                              |

**P-11055**

**SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO**  
**DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES**

E. S. D.

Re: Expediente No. **16-002.017**

Solicitud de patente a nombre de **ORGENESIS LTD., TEL HASHOMER-MEDICAL RESEARCH, INFRASTRUCTURE AND SERVICES LTD.**

Yo, CAROLINA DAZA MONTALVO identificada como aparece al pie de mi firma, domiciliada en la Carrera 11 No. 86-53, piso 6, obrando como apoderada de la sociedad **ORGENESIS LTD., TEL HASHOMER-MEDICAL RESEARCH, INFRASTRUCTURE AND SERVICES LTD.**, domiciliadas en Tel Aviv y Ramat Gan, Israel, respectivamente, solicitante de la patente de la referencia, en respuesta al oficio No. **832** notificado por fijación en lista el 9 de febrero de 2016, relacionado con los requerimientos formales de la solicitud, y teniendo en cuenta la solicitud de prórroga presentada el 18 de marzo de 2016, mediante la cual se solicitó una prórroga de dos meses para dar respuesta al referido oficio, atentamente me permito informar que, con fundamento en la facultad que confiere el artículo 34 de la Decisión 486 al solicitante para modificar la solicitud de patente en cualquier momento del trámite, se realizan las siguientes modificaciones:

**1. Reivindicaciones**

En relación con las objeciones sobre la falta de claridad de las reivindicaciones, presento junto con este memorial nuevo capítulo reivindicatorio, el cual consta de veintisiete (27) reivindicaciones, y que reemplaza completamente el presentado anteriormente. Específicamente, se realizaron las siguientes modificaciones:

- 1.1 Como primera medida, se aclara que se modificó el capítulo reivindicatorio con el fin de mejorar la claridad de la materia reclamada. Además, no se incluyen las antiguas reivindicaciones 2 a 9, 11, 13 a 35, 39, 43 a 63.

- 1.2 Se incluyeron las secuencias que definen las entidades necesarias para llevar a cabo el método reclamado en la antigua reivindicación 1.
- 1.3 Se eliminaron los términos considerados como imprecisos.

En cuanto a estas modificaciones, me permito decir que las mismas no amplían de ninguna manera la materia objeto de la presente solicitud y se realizaron con el ánimo de superar las objeciones de claridad planteadas por el examinador en su concepto técnico.

En relación con el número de reivindicaciones, atentamente nos permitimos decir que no se adjunta tasa por reivindicaciones adicionales, toda vez que el nuevo capítulo reivindicatorio tiene menor número de cláusulas que el originalmente presentado y en esencia es el mismo objeto pero definido con mayor claridad.

## **2. Claridad del Capítulo Reivindicatorio**

Respecto a las objeciones de claridad, el solicitante manifiesta que mediante las modificaciones realizadas en el capítulo reivindicatorio quedan subsanadas la totalidad de las objeciones, de modo tal que las nuevas reivindicaciones proporcionan claridad y concisión a la invención descrita, siguiendo las recomendaciones realizadas por el examinador en su concepto técnico.

- 2.1 Como primera medida, se aclara que no se incluyen las antiguas reivindicaciones 2 a 9, 11, 13 a 35, 39, 43 a 63. De esta forma, las objeciones realizadas por el examinador a las antiguas reivindicaciones 11, 15 a 19, 22 a 26, 29 a 35 y 44 a 47 relativas a materia no patentable, a las antiguas reivindicaciones 2 a 4, 39, 43 y 48 a 56 las cuales carecían de claridad al no incluir las secuencias de las entidades para llevar a cabo el método reclamado, y a las antiguas reivindicaciones 27, 28 y 57 a 63 que no definían la secuencia ni el tipo de vector que se reclamaba, han sido subsanadas.
- 2.2 Asimismo, se informa que se incluyeron las secuencias de aminoácidos y las secuencias de nucleótidos que definen los polipéptidos y ácidos nucleicos PDX-1, Pax-4, NeuroD1 y MafA, incluidas en la antigua reivindicación 1, las

cuales son necesarias para desarrollar el método reclamado. Es así como la nueva reivindicación 1 es clara y permite que una persona versada en la técnica pueda reproducir el método reclamado en dicha reivindicación, asimismo podrá producir la población de células reclamada en la nueva reivindicación 13. Cabe mencionar que la lista de dichas secuencias se adjunta al presente memorial en el archivo “P-11055 SECUENCIAS.pdf”.

Además, es deseo de mi mandante rechazar la objeción de claridad a la reivindicación 1, para lo cual menciona que el orden secuencial jerárquico único de poner en contacto la población de células es claro, en donde entre otras cosas, la reivindicación modificada 1 recita: “... (a) *poner en contacto una población de células beta aisladas no pancreáticas de mamífero adulto... en un primer período de tiempo*; (B) *poner en contacto la población de células aisladas de la etapa (a)... en un segundo período de tiempo*; (C) *poner en contacto la población de células aisladas de la etapa (b)... en un tercer período de tiempo...*”(énfasis añadido). De esta manera, concluye que la reivindicación 1 es clara.

- 2.3 Adicionalmente, se aclara que se ha eliminado el término “*por lo menos*” considerado como impreciso. De esta forma, la invención queda definida únicamente por sus características técnicas esenciales permitiendo su comparación con el estado de la técnica.

Finalmente, mi mandante desea manifestar que el nuevo capítulo reivindicatorio se encuentra soportado en la nueva descripción adjunta al presente memorial, la cual no agrega materia nueva a la inicialmente reclamada; es así como las nuevas reivindicaciones 1 y 13 están soportadas en los párrafos [0068], [0069] y [0071] a [0073] y [0075], así como en los ejemplos 4 a 7. Por su parte, las nuevas reivindicaciones 4, 10 a 17 y 23 a 27 están soportadas en los párrafos [0063], [0084], [0086] y [00155] y en los ejemplos 1, 4, 7 y 10.

En consecuencia, nos permitimos informar que las nuevas reivindicaciones 1 a 27 se ajustan a las disposiciones del artículo 30 de la Decisión 486/00.

### 3. Unidad de Invención “a priori”

El examinador establece en su concepto técnico que la presente solicitud no cumple con el requisito de unidad de invención ya que define dos grupos inventivos diferentes.

En este sentido, se informa que no se incluyen las antiguas reivindicaciones 27, 28 y 57 a 63 las cuales hacían referencia a vectores y constructos para expresar proteínas, siendo ahora reclamados únicamente poblaciones de células y métodos de transdiferenciación de las mismas.

En consecuencia, es claro que las nuevas reivindicaciones 1 a 27 poseen un único concepto común inventivo y se ajustan por tanto a las disposiciones del artículo 25 de la Decisión 486.

### 4. Petitorio

Aunque no fue requerida la modificación del título de la presente aplicación en el oficio que se contesta, se informa que éste fue modificado con el propósito de describir la materia ahora reclamada en la presente solicitud. De esta manera, el título ha sido modificado a: “*POBLACIONES DE CÉLULAS Y MÉTODOS DE TRANSDIFERENCIACIÓN DE LAS MISMAS*”.

Es así como nos permitimos informar que la solicitud se ajusta a las disposiciones del artículo 27 de la Decisión 486/00.

### 5. Descripción

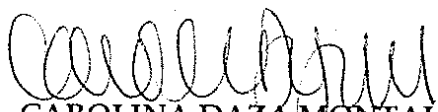
Adicionalmente, se informa al examinador que aunque no fue requerida la modificación de la descripción, se presenta un nuevo capítulo descriptivo en el cual han sido modificados los párrafos [0071] a [0073] y [0075], específicamente se efectuaron modificaciones de forma al incluir las referencias correspondientes a las secuencias de aminoácidos y las secuencias de nucleótidos que definen los polipéptidos y ácidos nucleicos PDX-1, Pax-4, NeuroD1 y MafA. Además, se aclara

que la lista de secuencias actualizada no añade materia nueva a la información reclamada originalmente en la presente solicitud.

Como fue mencionado anteriormente, la lista de secuencias se adjunta al presente memorial en el archivo "*P-11055 SECUENCIAS.pdf*".

Habiendo atendido cabalmente las objeciones presentadas por ese Despacho en el oficio No. 832 notificado por fijación en lista el 9 de febrero de 2016, solicito atentamente sea tenida en cuenta la información aquí presentada y continuar con el trámite de la presente solicitud.

Señor Director,



CAROLINA DAZA MONTALVO

C.C. 66.783.790 de Palmira Valle

TP-141563 CSJ

[notificaciones@clarkemodet.com.co](mailto:notificaciones@clarkemodet.com.co)

## ANEXOS

- Nuevo capítulo reivindicatorio conformado por veintisiete (27) reivindicaciones.
- Lista de secuencias de aminoácidos y secuencias de nucleótidos que definen los polipéptidos y ácidos nucleicos PDX-1, Pax-4, NeuroD1 y MafA.
- Nuevo capítulo descriptivo.

**P-11055**

**REIVINDICACIONES MODIFICADAS**

**27 DE MAYO DE 2016**

**REIVINDICACIONES**

Lo que se reivindica es:

1. Un método para producir una población de células transdiferenciadas que tienen una función y fenotipo de célula beta pancreática madura que comprende:
  - a. poner en contacto una población de células beta aisladas no pancreáticas de mamífero adulto con un polipéptido de homeosecuencia (PDX-1) pancreático y duodenal o un ácido nucleico que codifica un polipéptido de homeosecuencia (PDX1) pancreático y duodenal bajo condiciones que permiten la absorción de dichos polipéptidos o ácidos nucleicos en un primer periodo de tiempo, en donde dicho polipéptido PDX-1 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 4 y en donde dicho ácido nucleico PDX-1 comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 5 o el mRNA equivalente de la misma;
  - b. poner en contacto la población de células aisladas de la etapa (a) con un polipéptido Pax-4, o un polipéptido NeuroD1, o un ácido nucleico que codifica un polipéptido Pax-4, o un ácido nucleico que codifica un polipéptido NeuroD1 bajo condiciones que permiten la absorción de dichos polipéptidos o ácidos nucleicos en un segundo periodo de tiempo, en donde dicho polipéptido Pax-4 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 6, dicho polipéptido NeuroD1 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 8, dicho ácido nucleico Pax-4 comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 7 o el mRNA equivalente de la misma, y en donde dicho ácido nucleico NeuroD1 comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 9 o el mRNA equivalente de la misma; y
  - c. poner en contacto la población de células aisladas de la etapa (b) con un polipéptido MafA o un ácido nucleico que codifica un polipéptido MafA bajo condiciones que permiten la absorción del polipéptido o del ácido nucleico en un tercer periodo de tiempo; en donde dicho polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 10 y en donde dicho ácido nucleico comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 11 o el mRNA equivalente de la misma;produciendo por lo tanto una población aislada de células transdiferenciadas que tiene una función y fenotipo de célula beta pancreática madura.

2. El método de la reivindicación 1, en donde dicha población de células beta no pancreáticas es enriquecida por células predispuestas a transdiferenciación.
3. El método de la reivindicación 2, en donde dichas células predispuestas adquieren una función y fenotipo de célula beta pancreática luego de la administración ectópica de factores de transcripción pancreáticos.
4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1–3, en donde el segundo periodo de tiempo es 24 horas después del primer periodo de tiempo o es al mismo tiempo que el primer periodo de tiempo, y en donde el tercer periodo de tiempo es 24–72 horas después del periodo de tiempo anterior.
5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1–4, en donde la población de células de mamífero adulto se selecciona del grupo que consiste de: células de médula ósea, músculo, bazo, riñón, sangre, piel e hígado.
6. El método de la reivindicación 5, en donde dichas células hepáticas comprenden una enriquecida población de células hepáticas predispuestas a transdiferenciación.
7. El método de la reivindicación 6, en donde dichas células hepáticas predispuestas comprenden células hepáticas pericentrales.
8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1–7, en donde la población de células se ponen en contacto *in vitro*.
9. El método de la reivindicación 2, en donde dicha población de células predispuestas a transdiferenciación comprende células que comprenden:
  - a. una ruta de señalización Wnt activa;
  - b. una capacidad de activar el elemento de respuesta de sintetasa de glutamina (GSRE);
  - c. aumento en los niveles de HOMER1, LAMP3, o BMPR2, o cualquier combinación de los mismos;
  - d. reducción de los niveles de ABCB1, ITGA4, ABCB4, o PRNP, o cualquier combinación de los mismos; ocualquier combinación de los mismos.
10. Una población aislada de células transdiferenciadas que tiene una función y fenotipo de célula beta pancreática madura producida a partir de una población de células beta no pancreáticas de mamífero adulto.

11. La población aislada de células transdiferenciadas de la reivindicación 10, en donde dicha población de células beta no pancreáticas es predispuesta a transdiferenciación.
12. La población aislada de células transdiferenciadas de una cualquiera de las reivindicaciones 10–11, en donde dicha función y fenotipo de célula beta pancreática madura comprende aumento de la secreción regulada de glucosa de la insulina procesada.
13. La población aislada de células transdiferenciadas de una cualquiera de las reivindicaciones 10–12 producida por un método que comprende:
  - a. poner en contacto la población de células beta aisladas no pancreáticas de mamífero adulto con un polipéptido de homeosecuencia (PDX-1) pancreático y duodenal o un ácido nucleico que codifica un polipéptido de homeosecuencia (PDX1) pancreático y duodenal bajo condiciones que permiten la absorción de dichos polipéptidos o ácidos nucleicos en un primer periodo de tiempo, en donde dicho polipéptido PDX-1 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 4 y en donde dicho ácido nucleico PDX-1 comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 5 o el mRNA equivalente de la misma;
  - b. poner en contacto la población de células aisladas de la etapa (a) con un polipéptido Pax-4, o un polipéptido NeuroD1, o un ácido nucleico que codifica un polipéptido Pax-4, o un ácido nucleico que codifica un polipéptido NeuroD1 bajo condiciones que permiten la absorción de dichos polipéptidos o ácidos nucleicos en un segundo periodo de tiempo, en donde dicho polipéptido Pax-4 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 6, dicho polipéptido NeuroD1 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 8, dicho ácido nucleico Pax-4 comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 7 o el mRNA equivalente de la misma, y en donde dicho ácido nucleico NeuroD1 comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 9 o el mRNA equivalente de la misma; y
  - c. poner en contacto la población de células aisladas de la etapa (b) con un polipéptido MafA o un ácido nucleico que codifica un polipéptido MafA bajo condiciones que permiten la absorción del polipéptido o del ácido nucleico en un tercer periodo de tiempo; en donde dicho polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 10 y en donde dicho ácido nucleico comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 11 o el mRNA equivalente de la misma.

14. La población aislada de células transdiferenciadas de la reivindicación 13, en donde el segundo periodo de tiempo es 24 horas después del primer periodo de tiempo o es al mismo tiempo que el primer periodo de tiempo, y en donde el tercer periodo de tiempo es 24–72 horas después del periodo de tiempo anterior.
15. La población aislada de células transdiferenciadas de una cualquiera de las reivindicaciones 10–14, en donde dicha población de células no pancreáticas de mamífero adulto se selecciona del grupo que consiste de: células de médula ósea, células de músculo, células de bazo, células de riñón, células de sangre, células de piel y células hepáticas.
16. La población aislada de células transdiferenciadas de la reivindicación 15, en donde la población de células hepáticas comprende una enriquecida población de células hepáticas pericentrales.
17. La población aislada de células transdiferenciadas de la reivindicación 16, en donde dicha población de células predispuestas comprende células que comprenden:
- una ruta de señalización Wnt activa;
  - una capacidad de activar el elemento de respuesta de sintetasa de glutamina (GSRE);
  - aumento en los niveles de HOMER1, LAMP3, o BMPR2, o cualquier combinación de los mismos;
  - reducción de los niveles de ABCB1, ITGA4, ABCB4, o PRNP, o cualquier combinación de los mismos; o cualquier combinación de los mismos.
18. Un método para aislar una población de células que tienen una capacidad enriquecida para transdiferenciación inducida del factor de transcripción, dicho método comprende las etapas de:
- proporcionar una población heterogénea de células humanas;
  - introducir dentro de dichas células una construcción de ácido nucleico que comprende un elemento de respuesta de sintetasa de glutamina (GSRE), o fragmento del mismo capaz de activar la transcripción de sintetasa de glutamina, ligado operativamente a una proteína indicadora;
  - aislar las células que expresan la proteína indicadora;
- aislando por lo tanto una población de células con capacidad de transdiferenciación enriquecida.

19. El método de la reivindicación 18, en donde en la construcción de ácido nucleico comprende adicionalmente un promotor / mejorador.
20. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 18–19, en donde la proteína indicadora proporciona resistencia a presión de selección.
21. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 18-20, en donde las células son células endoteliales, fibroblastos, células hepáticas o mesenquimales.
22. El método de la reivindicación 21, en donde las células hepáticas son células hepáticas pericentrales.
23. Una población aislada de células que tiene capacidad de transdiferenciación enriquecida, aislada por el método de:
- a. proporcionar una población aislada heterogénea de células humanas;
  - b. introducir dentro de dichas células aisladas una construcción de ácido nucleico que comprende un elemento de respuesta de sintetasa de glutamina (GSRE), o fragmento del mismo capaz de activar la transcripción de sintetasa de glutamina, ligado operativamente a una proteína indicadora;
  - c. aislar las células que expresan la proteína indicadora;
- en donde la población de células aisladas comprende una capacidad de transdiferenciación enriquecida.
24. Un método de aumento de la eficiencia de transdiferenciación en una población aislada de células que comprende transdiferenciar la población de células aisladas de la reivindicación 23.
25. Una población aislada de células hepáticas enriquecidas por células predispuestas a transdiferenciación, dichas células comprenden:
- a. una ruta de señalización Wnt activa;
  - b. una capacidad de activar el elemento de respuesta de sintetasa de glutamina (GSRE);
  - c. aumento en los niveles de HOMER1, LAMP3, o BMPR2, o cualquier combinación de los mismos;
  - d. reducción de los niveles de ABCB1, ITGA4, ABCB4, o PRNP, o cualquier combinación de los mismos; o cualquier combinación de los mismos.

26. La población aislada de células hepáticas de la reivindicación 25, en donde la expresión ectópica de un factor de transcripción pancreático en dichas células, activa el linaje de células beta, y activa la producción de insulina y la secreción de dichas células.
27. La población aislada de células hepáticas de una cualquiera de las reivindicaciones 25-26, en donde dichas células comprenden una ruta de señalización Wnt activa y un otro elemento seleccionado de (b), (c) y (d).

| SEQ ID NO: | Tipo | Fuente          | SECUENCIA                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|------------|------|-----------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 4          | aa   | Humano<br>PDX-1 | MNGEEQYYAATQLYKDPCAFQRGPAPEFSASPPACLYMGRQPPPPPPHPFPGALGALEQGSPPDISPYEV<br>PPLADDDPAVAHLHHHLPAQLALPHPPAGPFPEGAEPGVLEENRVRQLPFPWMKSTKAHAWKQWAGGAYA<br>AEPEENKRTRTAYTRAQLLELEKEFLFNKYISRPRRVELAVMLNLTERHIKIWFQNRMRKWKKEEDKKRG<br>GGTAVGGGGVAEPEQDCAVTSGEELLALPPPPPPGGAVPPAAPVAAREGRLPPGLSASPQPSSVAPRRPQ<br>EPR                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| 5          | nt   | Humano<br>PDX-1 | CCCGGGCCGCAGCCATGAACGGCGAGGAGCAGTACTACGCGGCCACGCAGCTTTACAAGGACCCATGCGC<br>GTTCCAGCGAGGCCCCGGCGCCGGAGTTCAGCGCCAGCCCCCTGCGTGCCTGTACATGGGCGCCAGCCC<br>CCGCCGCCGCCGCCGACCCGTTCCCTGGCGCCCTGGGCGCGCTGGAGCAGGGCAGCCCCCGGACATCT<br>CCCCGTACGAGGTGCCCCCCTCGCCGACGACCCCGCGGTGGCGCACCTTACCACCACCTCCCGGCTCA<br>GCTCGCGCTCCCCACCCGCCGCCGGGCCCTTCCCGAGGGAGCCGAGCCGGGCGTCCTGGAGGAGCCC<br>AACC GCGTCCAGCTGCCTTTCCCATGGATGAAGTCTACCAAAGCTCACGCGTGGAAGGCCAGTGGGCAG<br>GCGGCGCCTACGCTGCGGAGCCGGAGGAGAACAAAGCGGACGCGCACGGCCTACACGCGCGCACAGCTGCT<br>AGAGCTGGAGAAGGAGTTCCTATTCAACAAGTACATCTCACGGCCGCGCCGGGTGGAGCTGGCTGTCATG<br>TTGAACTTGACCGAGAGACACATCAAGATCTGGTTCACAAACCGCCGCATGAAGTGGAAGGAGGAGG<br>ACAAGAAGCGCGGCGGGGACAGCTGTCGGGGGTGGCGGGGTGCGGAGCCTGAGCAGGACTGCGCCGT<br>GACCTCCGGCGAGGAGCTTCTGGCGCTGCCGCCGCCGCCCGGAGGTGCTGTGCCGCCGCTGCC<br>CCCGTTGCCGCCGAGAGGGCCGCTGCCGCTGGCCTTAGCGCGTCGCCACAGCCCTCCAGCGTCGCGC<br>CTCGGCGGCCGAGGAACCACGATGAGAGGCAGGAGCTGCTCCTGGCTGAGGGGCTTCAACCACTCGCCG<br>AGGAGGAGCAGAGGGCCTAGGAGGACCCGGG |
| 6          | aa   | Humano<br>Pax-4 | MNQLGGLFVNGRPLPLDTRQQIVRLAVSGMRPCDISRILKVSNGCVSKILGRYYRTGVLEPKGIGGSKPR<br>LATPPVVARIAQLKGECPALFAWEIQRQLCAEGLCTQDKTPSVSSINRVLRALQEDQGLPCTRLRSPAVL<br>APAVLTPHSGSETPRGTHPGTGHRNRTIFSPSQAEALEKEFQRGQYPDSVARGKLATATSLPEDTVRVWF<br>SNRRAKWRRQEKLKWEMQLPGASQGLTVPRVAPGIISAQQSPGSVPTAALPALEPLGPSCYQLCWATAPE<br>RCLSDTPPKACLKPCWGHLPQPNSLDSGLLCLPCSSHCPASLSGSQALLWPGCPPLYGLE                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| 7          | nt   | Humano<br>Pax-4 | CAAAGACTCACCCGTGAGCCAGCTCTCAAAGAAAGCAGCTTGCGTTGACAGCCTGGGGGCAGCAAGGATG<br>CAGTCTCCAGGAGAGGATGCACTCGGTGGTGGGAAGCCAGGCTGGAGGGGCTGAGTGACCTCTCCAC<br>AGGCGGGCAGGGCAGTGGGAGAGGTGGTGTGTGGATACCTCTGTCTACGCCCAGGGATCAGCAGCATGA<br>ACCAGCTTGGGGGGCTCTTTGTGAATGGCCGGCCCCCTGCCTCTGGATACCCGGCAGCAGATTGTGCGGCT<br>AGCAGTCAGTGGAATGCGGCCCTGTGACATCTCACGGATCCTTAAGGTATCTAATGGCTGTGTGAGCAAG<br>ATCCTAGGGCGTTACTACCGCACAGGTGCTTTGGAGCCAAAGGGCATTGGGGGAAGCAAGCCACGGCTGG<br>CTACACCCCTGTGGTGGCTCGAATTGCCAGCTGAAGGGTGAGTGTCCAGCCCTCTTTCCTGGGAAAT<br>CCAACGCCAGCTTTGTGCTGAAGGGCTTGCACCCAGGACAAGACTCCCAGTGTCTCCTCCATCAACCGA<br>GTCCTGCGGGCATTACAGGAGGACCAGGGACTACCGTGACACGGCTCAGGTCACCAGCTGTTTTGGCTC                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |

|   |    |                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
|---|----|-------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|   |    |                   | CAGCTGTCCTCACTCCCATAGTGGCTCTGAGACTCCCCGGGGTACCCACCCAGGGACCGGCCACCGGAA<br>TCGGACTATCTTCTCCCAAGCCAAGCAGAGGCACTGGAGAAAGAGTTCCAGCGTGGGCAGTATCCTGAT<br>TCAGTGGCCCGTGGAAAGCTGGCTACTGCCACCTCTCTGCCTGAGGACACGGTGAGGGTCTGGTTTTCCA<br>ACAGAAGAGCCAAATGGCGTCGGCAAGAGAAGCTCAAGTGGGAAATGCAGCTGCCAGGTGCTTCCCAGGG<br>GCTGACTGTACCAAGGGTTGCCCCAGGAATCATCTCTGCACAGCAGTCCCCTGGCAGTGTGCCACAGCA<br>GCCCTGCCTGCCCTGGAACCACTGGGTCCCTCCTGCTATCAGCTGTGCTGGGCAACAGCACCAGAAAGGT<br>GTCTGAGTGACACCCACCTAAAGCCTGTCTCAAGCCCTGCTGGGGCCACTTGCCCCACAGCCGAATTC<br>CCTGGACTCAGGACTGCTTTGCCTTCCTTGCCTTCTCCCACTGTCACCTGGCCAGTCTTAGTGGCTCT<br>CAGGCCCTGCTCTGGCCTGGCTGCCCACTACTGTATGGCTTGGAATGAGGCAGGAGTGGGAAGGAGATGG<br>CATAGAGAAGATCTAATACCATCCTGCCATTGCTCTTACCGTCTGCCATACAGACTGTGGCTCCTTC<br>CTCCTTCTGTGATTGCTCCCTCCTGTGTGGACGTTGCCCTGGCCCTGCCTCGATGCCTCTCTGGCGCATC<br>ACCTGATTGGAGGGGCTGGTAAAGCAACACCCACCCACTTCTCACACTAGCCTTAAGAGGCCTCCACTCA<br>GCAGTAATAAAAGCTGTTTTATTAGCAGTAGTTCTGTTGTCCATCATGTTTTCCCTATGAGCACCCCTA<br>TGCCCACTCTAATATTCAACAATTATAGACAATTTGCCCTATCATTTATTTACATCTATGTATCTACCAT<br>CTAATCTATGCATGTATGTAGGCAATACATGTATCTAAACAATGTATTTGTCAATGCATCAATTTACCTA<br>CTCTATGTATGCATCTATATGTATTATGTATGCGTGCATGCGTGCGCGCACACACACACACACACACA<br>CACACTGACATTATATCATGGCATTATTCCTAAATCTTCCAGCATGCATCCCCAAAAACAAGAACT<br>TGTCTTACATAATCACAATAATATCCACATCTAAGAAAATTTACTGTAACCTCTTAATCTAAGAAAAT<br>TATGTATTTTGTATATGTATTTTGTATATGTATTTTGTATTTGCATATGTATTTGTATTTGCATAT<br>GTATTTTGTATATAGCAGCAAACAGAGTGAAATGCCATTTTTCATATTCT |
| 8 | aa | Humano<br>NeuroD1 | MTKSYSESLMGEPQPQPPSWTDECLSSQDEEHEADKKEDDLEAMNAEEDSLRNGGEEDEDEDELEEEE<br>EEEEEDDDQPKRRGPKKKKMTKARLERFKLRRMKANARERNRMHGLNAALDNLRKVVPCYSKTQKLSKI<br>ETLRLAKNYIWALSEILRSGKSPDLVSFVQTLCKGLSQPTTNLVAGCLQLNPRTFLPEQNQDMPPHLPTA<br>SASFPVHPYSYQSPGLPSPPYGTMDSHVHVKPPPHAYSAALEPFFESPLTDCTSPSFDGPLSPPLSIN<br>GNFSFKHEPSAEFEKNYAFTMHYPAATLAGAQSHGSIFSGTAAPRCEIPIDNIMSFDSHSHHERVMSAQL<br>NAIFHD                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| 9 | nt | Humano<br>NeuroD1 | GGGGAGGAGGGGAGAACGGGGAGCGCACAGCCTGGACGCGTGCGCAGGCGTCAGGCGCATAGACCTGCTA<br>GCCCCCTAGCTAGCGGCCCCGCGCGCTTAGCATCACTAACTGGGCTATATAACCTGAGCGCCCCGCGCG<br>GCCACGACACGAGGAATTCGCCACGCAGGAGGCGCGGCGTCCGGAGGCCCCAGGGTTATGAGACTATCA<br>CTGCTCAGGACCTACTAACAACAAAGGAAATCGAAACATGACCAAATCGTACAGCGAGAGTGGGCTGATG<br>GGCGAGCCTCAGCCCCAAGTCCCTCAAGCTGGACAGACGAGTGTCTCAGTTCTCAGGACGAGGAGCACG<br>AGGCAGACAAGAAGGAGGACGACCTCGAAGCCATGAACGCAGAGGAGGACTCACTGAGGAACGGGGGAGA<br>GGAGGAGGACGAAGATGAGGACCTGGAAGAGGAGGAAGAAGAGGAAGAGGAGGATGACGATCAAAAGCCC<br>AAGAGACGCGGCCCCAAAAAGAAGAAGATGACTAAGGCTCGCCTGGAGCGTTTTAAATTGAGACGCATGA                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |

|  |  |  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
|--|--|--|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  |  |  | <p>AGGCTAACGCCCGGGAGCGGAACCGCATGCACGGACTGAACGCGGCGCTAGACAACCTGCGCAAGGTGGT<br/>GCCTTGCTATTCTAAGACGCAGAAGCTGTCCAAAATCGAGACTCTGCGCTTGGCCAAGAACTACATCTGG<br/>GCTCTGTCGGAGATCCTGCGCTCAGGCAAAAGCCCAGACCTGGTCTCCTTCGTTTCAGACGCTTTGCAAGG<br/>GCTTATCCCAACCCACCACCAACCTGGTTGCGGGCTGCCTGCAACTCAATCCTCGGACTTTTCTGCCTGA<br/>GCAGAACCAGGACATGCCCCCCCACCTGCCGACGGCCAGCGCTTCCTTCCCTGTACACCCCTACTCCTAC<br/>CAGTCGCCTGGGCTGCCCAGTCCGCCTTACGGTACCATGGACAGCTCCCATGTCTTCCACGTTAAGCCTC<br/>CGCCGCACGCCTACAGCGCAGCGCTGGAGCCCTTCTTTGAAAGCCCTCTGACTGATTGCACCAGCCCTTC<br/>CTTTGATGGACCCCTCAGCCCGCGCTCAGCATCAATGGCAACTTCTCTTTCAAACACGAACCGTCCGCC<br/>GAGTTTGAGAAAAATTATGCCTTTACCATGCACTATCCTGCAGCGACACTGGCAGGGGGCCAAAGCCACG<br/>GATCAATCTTCTCAGGCACCGCTGCCCTCGCTGCGAGATCCCCATAGACAATATTATGTCCTTCGATAG<br/>CCATTACATCATGAGCGAGTCATGAGTGGCCAGCTCAATGCCATATTTTCATGATTAGAGGCACGCCAGT<br/>TTCACCATTTCCGGGAAACGAACCCACTGTGCTTACAGTGACTGTCGTGTTTACAAAAGGCAGCCCTTTG<br/>GGTACTACTGCTGCAAAGTGCAAATACTCCAAGCTTCAAGTGATATATGTATTTATTGTCATTACTGCCT<br/>TTGGAAGAAACAGGGGATCAAAGTTCCTGTTACCTTATGTATTATTTTCTATAGCTCTTCTATTTAAAA<br/>AATAAAAAAATACAGTAAAGTTTAAAAAATACACCACGAATTTGGTGTGGCTGTATTCAGATCGTATTAA<br/>TTATCTGATCGGGATAACAAAATCACAAGCAATAATTAGGATCTATGCAATTTTTAACTAGTAATGGGC<br/>CAATTAAAATATATATAAATATATATTTTTCAACCAGCATTTTACTACTTGTTACCTTTCCCATGCTGAA<br/>TTATTTTGTTGTGATTTTGTACAGAATTTTAAATGACTTTTTATAATGTGGATTCCTATTTTAAACCA<br/>TGCAGCTTCATCAATTTTTATACATATCAGAAAAGTAGAATTATCTAATTTATACAAAATAATTTAAC<br/>TAATTTAAACCAGCAGAAAAGTGCTTAGAAAAGTTATTGTGTTGCCTTAGCACTTCTTTCCTCTCCAATTG<br/>TAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAATTGCACAATTTGAGCAATTCATTTCACTTTAAAGT<br/>CTTTCCGTCTCCCTAAAATAAAAAACCAGAATCATAATTTTCAAGAGAAGAAAAAATTAAGAGATACATTC<br/>CCTATCAAAACATATCAATTCAACACATTACTTGCACAAGCTTGTATATACATATTATAAAATAAATGCCA<br/>ACATACCCTTCTTTAAATCAAAAAGCTGCTTGACTATCACATACAATTTGCACTGTTACTTTTTAGTCTTT<br/>TACTCCTTTGCATTCCATGATTTTACAGAGAATCTGAAGCTATTGATGTTTCCAGAAAATATAAATGCAT<br/>GATTTTATACATAGTCACAAAAATGGTGGTTTGTATATATTCATGTAATAAATCTGAGCCTAAATCTAA<br/>TCAGGTTGTTAATGTTGGGATTTATATCTATAGTAGTCAATTAGTACAGTAGCTTAAATAAATTCAAACC<br/>ATTTAATTCATAATTAGAACAATAGCTATTGCATGTAAAATGCAGTCCAGAATAAGTGCTGTTTGAGATG<br/>TGATGCTGGTACCACTGGAATCGATCTGTAATTTTGTGTTGTAATCCTGTATATTATGGTGTAAATG<br/>CACAATTTAGAAAACATTCATCCAGTTGCAATAAAATAGTATTGAAAGTGAGAGCAATTGTTGCATTTCT<br/>TCTTAAAGGGATTCTGTTTTATTTTTGGGGAAAGTAGTTGCTTTTTTGCTGAGTTAAAAAATACTAAAC<br/>ACTATATGTAGAATAAAAGAAAAAGAAAAAGTTTACCTTGGCATATGCTCTTGTCTGTTTATCTTGCACA<br/>GGGAGTCACCAGTTCTATGTAGATAATGAAAAGACCTAACTGATATTTTATTATTTGGAATATGGGACTG<br/>GACGGCAGTACAAACAGTGTGTTTTTTCTTTGTTTTAAGTGGCTTAGCCTTAGGTTTTTTATTTCCAT</p> |
|--|--|--|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

|    |    |                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|----|----|-----------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|    |    |                 | TTTTAAAAATGATTGTTACATGTTTTCTTCTATTTCTTTTTTTAAAAGGTGGATTTTAATAA                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| 10 | aa | Humano<br>Maf-A | MAAEELAMGAELPSSPLAIEYVNDFDLMKFEVKKEPPEAERFCHRLPPGSLSTPLSTPCSSVPSSPSFCA<br>PSPGTGGGGGAGGGGSSQAGGAPGPPSGGPGAVGGTSGKPALEDLYWMSGYQHHLNPEALNLTPEDAVE<br>ALIGSGHHGAHHGAHHHPAAAAAYEAFRPGFAGGGGADDMGAGHHHGAHHAAHHHHAHHHHHHHHHHHGG<br>AGHGGGAGHHVRLEERFSDDQLVSMVRELNRLRGFSKEEVIRLKQKRRTLKNRGYAQSCRFKRVQQRH<br>ILESEKCQLQSQVEQLKLEVGRLLAKERDLYKEYEKLAGRGGPGSAGGAGFPREPSPPQAGPGGAKGTAD<br>FFL                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| 11 | nt | Humano<br>Maf-A | GCGCGGCCGGGCGCGGGCCCCGGGCGATGGCCGCGGAGCTGGCGATGGGCGCCGAGCTGCCCAGCAGCCC<br>GCTGGCCATCGAGTACGTCAACGACTTCGACCTGATGAAGTTCGAGGTGAAGAAGGAGCCTCCCAGAGCC<br>GAGCGCTTCTGCCACCGCTGCCGCCAGGCTCGCTGTCTCGACGCCGCTCAGCACGCCCTGCTCCTCCG<br>TGCCCTCCTCGCCCAGCTTCTGCGCGCCCAGCCCCGGGCACCGCGCGGCGGCGGCGGCGGGGGGGCGGCGG<br>CGGCTCGTCTCAGGCCGGGGGCGCCCCGGGCGCCGAGCGGGGGCCCCGGCGCCGTCTGGGGGACCTCG<br>GGGAAGCCGGCGCTGGAGGATCTGTACTGGATGAGCGGCTACCAGCATCACCTCAACCCCGAGGCGCTCA<br>ACCTGACGCCCCGAGGACGCGGTGGAGGCGCTCATCGGCAGCGGCCACCACGGCGCGCACCACGGCGCGCA<br>CCACCCGGCGGCCGCCGAGCCTACGAGGCTTCCGCGGCCCGGGCTTCGCGGGCGGCGGCGGAGCGGAC<br>GACATGGGCGCCGCCACCACCACGGCGCGCACCCAGCCGCCACCATCACACGCCGCCACCACCACC<br>ACCACCACCACCACCACCATGGCGGCGCGGGACACGGCGGTGGCGCGGGCCACCACGTGCGCCTGGAGGA<br>GCGCTTCTCCGACGACCAGCTGGTGTCCATGTCTGGTGCAGGCTGAACCGGCAGCTCCGCGGCTTCAGC<br>AAGGAGGAGGTATCCGGCTCAAGCAGAAGCGGCGCACGCTCAAGAACCGGGCTACGCGCAGTCCTGCC<br>GCTTCAAGCGGGTGCAGCAGCGGCACATTCTGGAGAGCGAGAAGTGCCAACTCCAGAGCCAGGTGGAGCA<br>GCTGAAGCTGGAGGTGGGGCGCCTGGCCAAAGAGCGGGACCTGTACAAGGAGAAATACGAGAAGCTGGCG<br>GGCCGGGGCGGCCCGGGAGCGCGGGCGGGGCCGTTTCCGCGGGAGCCTTCGCCGCCGAGGCCCGGT<br>CCGGCGGGGCCAAGGGCACGGCCGACTTCTTCTGTAGGCGCCGGACCCCGAGCCCCGCGCCGCCGTGCC<br>GGGGACAAGTTCGCGCAGGCCTCTCGGGGCCCTCGGCTCGGACTCCGCGGTACAGGACGTGGACACCAGGC<br>CCGGCCCGGCCGTGCTGGCCCCGGTGCCAAGTCTGCGGGCGCGGGGCTGGAGGCCCTTCGCTCCCGGT<br>CCCGTTCGCGCGCTCGGCCGGGTCGCCGTCTGAGGTTGAGCGGAGAACGGTGATTTCTAAGGAACT<br>TGAGCCAGGTCTAATTCTTTCCAAGCGTCCGCTGTACATACGTTGAACGTGGTTCTCCGTTCCACCT<br>TCGCCCTGCCAGCCTAGAGGGACCGCGCTGCCGTCCCTTCCCGGGTGGCCCCCTGCCTGCCCCCGCCCTCC<br>TTCGTTCTTCTCAGCCTCCCTTTCCTTGCTTTTTTAACCTCCCTCCCGTTTTTAAATCGGTCTTA<br>TTTTCGAAGTATTATAATTATTATGCTTGGTGATTAGAAAAGAAAACCTTGAGGAAGCCCCCTTTTC<br>CCCAGCCGGGGTCCGCCCTCAGTCGCGAGTCACAGCATGAGTCGCTCGCCAGGAGGGGGCCCGGCCCTGC<br>CTGCCCCCTCCCCGCTTGCCCCGACCCTGCTACCGGCGTTCCTTGAGGTGGAAGCCAGGGACGTCACC<br>CGTGCTGTGTCCAGGCCTGCTGTCTACTATGCTCAACCGGGGTGGGGGGAGGGGGGTGAGTCCTGTGC<br>TCAGTCGGGTGGGGGCTGGCCCGATCCCAGCTGCTGTCTCTATGCACCAGAACATATCTGTAACCTC |

|  |  |  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
|--|--|--|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  |  |  | CTGGGGAAATACATCTTGTTTTAACCTTCAAGAGAAGTGAAAGAAAAAGTAATGCACAGTATTTCTAGC<br>AGAAAATTTTTTTTTTAAGAGGAGGCTTGGGCCAGAGCCTTCTGGCATGGGGCGGGTGGAGAAAGTGTT<br>TTTATTTTAATTTAAATTGTGTTTCGTTTTGTTTGTGGAATCTTCTTTAATGCTTCGTCGCTCTTTGGA<br>CTAGCCGGGAGAGAGGGCGAGGAGGCGGGTGCTCCAGGCCCTGTAGGCTGGGCCAGGCGCCTGGGGGATC<br>TGCCCGTTTTCGGAGGCCCTCAGGGGCCATCAGTGGGATTCCAGCCGCTCCACCCCCTCCCCTGAGCAC<br>TCGGAGTGGAAGGCGCGCCGACTCGTTGAAAGTTTTGTTGTGTAGTTGGTTTTCGTTGAGTTCTTTTTTC<br>ATTGCTACGAAACTGAGAAAAAGAAAAAATACACAAAATAAATCTGTTTCAGATCCAAGTCA |
|--|--|--|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

P-11055

DESCRIPCIÓN MODIFICADA

MAYO 27 DE 2016

5      **POBLACIONES DE CÉLULAS Y MÉTODOS DE TRANSDIFERENCIACIÓN DE LAS  
MISMAS**

**SOLICITUDES RELACIONADAS**

10    [0001] Esta solicitud reivindica la prioridad de y beneficio de la solicitud provisional USSN 61/ 834,759 presentada en junio 13 2013 y USSN 61/ 834,767 presentada en junio 13 2013, cuyos contenidos se incorporan aquí mediante referencia en su totalidad.

15

**CAMPO DE LA INVENCION**

[0002] La invención de manera general se relaciona con poblaciones de células que se predisponen a transdiferenciación y  
20    método para la producción de células que tienen una función y fenotipo de célula beta pancreática madura.

**ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

25    [0003] Las células beta de los islotes de Langerhans en el páncreas secretan insulina en respuesta a factores tales como aminoácidos, gliceraldehídos, ácidos grasos libres, y, más prominentemente, glucosa. La capacidad de células beta de islote normales para detectar un aumento en la concentración de glucosa

en sangre y para responder a niveles elevados de glucosa al secretar insulina es crítica para el control de los niveles de glucosa en sangre. El aumento de secreción de insulina en respuesta a una carga de glucosa evita la hiperglucemia en  
5 individuos normales al estimular la absorción de glucosa en tejidos periféricos, particularmente músculo y tejido adiposo.

[0004] Los individuos en los que se deteriora la función de células beta de islote sufren de diabetes. La diabetes mellitus  
10 dependiente de insulina, o IDDM (por sus siglas en inglés) (también conocida como diabetes del tipo I o de inicio en la juventud), representa aproximadamente 10% de toda la diabetes en humanos. El IDDM es distinto de la diabetes no dependiente de insulina (NIDDM, por sus siglas en inglés) ya que solo el IDDM  
15 implica la destrucción específica de las células beta que producen insulina de los islotes de Langerhans. La destrucción de las células beta en IDDM parece ser un resultado de ataque autoinmunitario específico, en el que el sistema inmunitario propio del paciente reconoce y destruye las células beta, pero no  
20 las células alfa circundantes (que producen glucagón) o células delta (que producen somatostatina) que comprenden el islote.

[0005] Las opciones de tratamiento para IDDM se centran en auto inyección de insulina, una solución inconveniente e imprecisa y  
25 de esta manera es altamente deseable el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas. La posibilidad del trasplante de fragmento de páncreas o islote se ha investigado como un medio para reemplazo permanente de insulina (Lacy, 1995; Vajkoczy et al, 1995). Las metodologías actuales utilizan material de

cadáveres o islotes de porcino como sustratos de trasplante (Korbutt et al, 1997). Sin embargo, los problemas significativos por superar son la baja disponibilidad del tejido donante, la variabilidad y bajo rendimiento de islotes obtenidos por medio de disociación, y el daño físico y enzimático que puede ocurrir como un resultado del proceso de aislamiento (revisado por Secchi et al, 1997; Sutherland et al., 1998). Adicionalmente son problemas de rechazo inmunitario y problemas actuales con xenotrasplante utilizando islotes de porcino.

10

[0006] Es claro que subsiste una necesidad crítica de establecer alternativas al tratamiento de diabetes mediante auto inyección de insulina. Si bien la investigación de blastocitos ha mostrado ser prometedora a este respecto, no ha habido gran éxito.

15

Subsiste una necesidad de procedimientos mejorados para aislar, cultivar, y transdiferenciar células no pancreáticas que se van a utilizar en el tratamiento de diabetes.

### **RESUMEN DE LA INVENCION**

20

[0007] La presente invención proporciona un método para producir una población de células que tienen una función y fenotipo de célula beta pancreática madura al poner en contacto células no pancreáticas de mamífero adulto con un polipéptido de homeosecuencia (PDX-1) pancreático y duodenal, o un ácido nucleico que codifica un polipéptido de homeosecuencia (PDX-1) pancreático y duodenal bajo condiciones que permiten la absorción del polipéptido, o ácido nucleico en un primer periodo; adicionalmente poner en contacto las células con un polipéptido

25

Pax-4, un polipéptido euroD1, o ácido nucleico que codifica un polipéptido Pax-4, o ácido nucleico que codifica un polipéptido NeuroD1 bajo condiciones que permiten la absorción del polipéptido o ácido nucleico en un segundo periodo; y  
5 adicionalmente poner en contacto las células de la etapa con un polipéptido MafA o un ácido nucleico que codifica un polipéptido MafA bajo condiciones que permiten la absorción del ácido nucleico en un tercer periodo. El segundo periodo es por lo menos 24 horas después del primer periodo. El tercer periodo es por lo  
10 menos 24 horas después del segundo periodo. En algunas realizaciones el primer, segundo y tercer periodo son el mismo periodo.

[0008] Alternativamente la invención proporciona un método para  
15 producir una población de células que tiene una función y fenotipo de célula beta pancreática madura al poner en contacto células no pancreáticas de mamífero adulto con un polipéptido de homeosecuencia (PDX-1) pancreático y duodenal o un ácido nucleico que codifica un polipéptido de homeosecuencia (PDX-1) pancreático  
20 y duodenal y un segundo factor de transcripción pancreático, bajo condiciones que permiten la absorción del polipéptido PDX-1, o ácido nucleico y el segundo factor de transcripción pancreático en un primer periodo; y adicionalmente poner en contacto las células con un polipéptido MafA, o un ácido nucleico que codifica  
25 un polipéptido MafA bajo condiciones que permiten la absorción del ácido nucleico en un segundo periodo. En algunas realizaciones el segundo periodo es por lo menos 2, 3, 4, 5, 6 o 7 días después del primer periodo. El segundo factor de transcripción pancreático es por ejemplo, NeuroD1, Pax-4, o Ngn3.

[0009] El ácido nucleico es un ácido ribonucleico o un ácido desoxiribonucleico.

[0010] Opcionalmente, las células se ponen en contacto  
5 adicionalmente con un ácido nucleico que codifica el polipéptido Sox-9 o polipéptido Sox-9 bajo condiciones que permiten la absorción del ácido nucleico o polipéptido.

[0011] Las células son de médula ósea, músculo, bazo, riñón,  
10 sangre, piel, páncreas, y células hepáticas. Las células se ponen en contacto in vivo. Las células se ponen en contacto in vitro. La población de células producidas por los métodos de la presente invención incluyen por lo menos 0,5 miles de millones de células. En algunas realizaciones, las células se expanden en el cultivo  
15 antes de poner en contacto con los polipéptidos o ácido nucleicos.

[0012] También se incluyen en la invención métodos para tratar un trastorno pancreático degenerativo al administrar a un sujeto en  
20 necesidad del mismo: una composición que comprende un polipéptido PDX-1 o un ácido nucleico que codifica un polipéptido PDX-1 en un primer periodo; una composición que comprende un polipéptido Pax-4, un polipéptido NeuroD1, un ácido nucleico que codifica un polipéptido Pax-4 o un ácido nucleico que codifica un polipéptido  
25 NeuroD1 en un segundo periodo; y una composición que comprende el polipéptido MafA o un ácido nucleico que codifica un polipéptido MafA en un tercer periodo. El segundo periodo es por lo menos 24 horas después del primer periodo. El tercer periodo es por lo menos 24 horas después del segundo periodo. En algunas

realizaciones el primer, segundo y tercer periodo son el mismo periodo.

[0013] Adicionalmente se proporcionan mediante la invención  
5 métodos de tratar un trastorno pancreático degenerativo al  
administrar a un sujeto en necesidad del mismo una composición  
que comprende un polipéptido PDX-1 un ácido nucleico que codifica  
un polipéptido PDX-1 y un segundo factor de transcripción  
pancreático en un primer periodo; y una composición que comprende  
10 un polipéptido MafA o un ácido nucleico que codifica un  
polipéptido MafA en un segundo periodo. En algunas realizaciones  
el segundo periodo es por lo menos 2, 3, 4, 5, 6 o 7 días después  
del primer periodo. El segundo factor de transcripción  
pancreático es por ejemplo, NeuroD1, Pax-4, o Ngn3.

15

[0014] El ácido nucleico es un ácido ribonucleico o un ácido  
desoxiribonucleico.

[0015] Opcionalmente, al sujeto se le administra adicionalmente  
20 un ácido nucleico que codifica el polipéptido Sox-9 o polipéptido  
Sox-9 bajo condiciones que permiten la absorción del ácido  
nucleico o polipéptido.

[0016] También se incluyen en la invención métodos para tratar un  
25 trastorno pancreático degenerativo al administrar a un sujeto en  
necesidad del mismo la población de células producidas por los  
métodos de la invención.

[0017] El trastorno pancreático degenerativo es diabetes tal como diabetes del tipo I, Tipo II o gestacional. Alternativamente, el trastorno pancreático degenerativo es cáncer pancreático o pancreatitis.

5

[0018] La presente invención proporciona adicionalmente un vector de expresión que incluye un ácido nucleico que codifica el polipéptido PDX-1 y un ácido nucleico que codifica un segundo factor de transcripción o uso en cualquiera de los métodos para  
10 producir una población de células que tiene un fenotipo de célula beta pancreática madura o métodos para tratar un trastorno pancreático degenerativo. La segunda transcripción es, por ejemplo, NeuroD1, Pax-4, Ngn3, o Sox-9.

15 [0019] Se incluye adicionalmente en la invención una población enriquecida de células humanas capaces de activar el elemento de respuesta de sintetasa de glutamina (GSRE). Por lo menos 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30% o más de las células en la población son capaces de activar el elemento de respuesta de sintetasa de  
20 glutamina (GSRE). Las células son células endoteliales, células epiteliales, células mesenquimales, fibroblastos, o células hepáticas. En algunos aspectos las células hepáticas se derivan del hígado pericentral. Preferiblemente, las células tienen señalización Wnt activa. Por lo menos 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%  
25 o más de las células en la población producen insulina o secretan el péptido c cuando las células se tratan para expresar ectópicamente un factor de transcripción pancreático, tal como Pdx-1, Pax-4, MafA, NeuroD1, o una combinación de los mismos. Opcionalmente, la población de células expresan por lo menos uno

de Wnt3a; niveles reducidos de DKK1 o DKK3; niveles reducidos de APC; aumento de los niveles de beta-catenina activada; o elementos de unión STAT3 (factores de acción cis). En algunos aspectos la población de células hepáticas aisladas de la población de células las células expresan aumento en los niveles de HOMER1, LAMP3, o BMP2; o niveles reducidos de ABCB 1, ITGA4, ABCB4, o PRNP.

[0020] También se proporcionan mediante la invención métodos para aislar una población de células que tienen una capacidad enriquecida para transdiferenciación inducida del factor de transcripción al proporcionar una población heterogénea de células humanas; introducir una construcción de ácido nucleico que comprende un elemento de respuesta de sintetasa de glutamina (GSRE), o fragmento del mismo capaz de activar la transcripción de sintetasa de glutamina, ligado operativamente a una proteína indicadora y aislar las células que expresan la proteína indicadora. Opcionalmente, la construcción de ácido nucleico comprende adicionalmente un promotor/mejorador. La proteína indicadora es una proteína fluorescente. La proteína indicadora proporciona resistencia a presión de selección. Las células son células endoteliales, fibroblastos, células hepáticas o mesenquimales. Las células hepáticas se derivan del hígado pericentral.

[0021] Opcionalmente, el método comprende adicionalmente cultivar las células aisladas.

[0022] También se incluye en la invención la población de células aisladas mediante los métodos de acuerdo con la invención.

[0023] En otros aspectos la invención incluye un método de tratar  
5 o aliviar un síntoma de un trastorno pancreático al introducir un factor de transcripción pancreático a la población de células aisladas de acuerdo con los métodos de la invención, administrar la población de células a un sujeto en necesidad del mismo. El trastorno pancreático es diabetes o pancreatitis. El factor de  
10 transcripción pancreático es Pdx-1, Pax-4, MafA, NeuroD1, o una combinación de los mismos.

[0024] Adicionalmente se incluyen en la invención método para producir una población de células que tiene un fenotipo de célula  
15 beta pancreática madura y la función al poner en contacto la población de células aisladas de acuerdo con la invención con un polipéptido de homeosecuencia (PDX-1) pancreático y duodenal, o un ácido nucleico que codifica un polipéptido de homeosecuencia (PDX-1) pancreático y duodenal bajo condiciones que permiten la  
20 absorción del polipéptido, o ácido nucleico en un primer periodo; adicionalmente poner en contacto las células con un polipéptido Pax-4, un polipéptido NeuroD1, o ácido nucleico que codifica un polipéptido Pax-4, o ácido nucleico que codifica un polipéptido NeuroD1 bajo condiciones que permiten la absorción del  
25 polipéptido o ácido nucleico en un segundo periodo; y adicionalmente poner en contacto las células de la etapa con un polipéptido MafA o un ácido nucleico que codifica un polipéptido MafA bajo condiciones que permiten la absorción del ácido nucleico en un tercer periodo. El segundo periodo es por lo menos

24 horas después del primer periodo. El tercer periodo es por lo menos 24 horas después del segundo periodo. En algunas realizaciones el primer, segundo y tercer periodo son el mismo periodo.

5

[0025] Alternativamente la invención proporciona un método para producir una población de células que tiene un fenotipo de célula beta pancreática madura y la función al poner en contacto la población de células aisladas de acuerdo con la invención con un polipéptido de homeosecuencia (PDX-1) pancreático y duodenal o un ácido nucleico que codifica un polipéptido de homeosecuencia (PDX-1) pancreático y duodenal y un segundo factor de transcripción pancreático, bajo condiciones que permiten la absorción del polipéptido PDX-1, o ácido nucleico y el segundo factor de transcripción pancreático en un primer periodo; y adicionalmente poner en contacto las células con un polipéptido MafA, o un ácido nucleico que codifica un polipéptido MafA bajo condiciones que permiten la absorción del ácido nucleico en un segundo periodo. En algunas realizaciones el segundo periodo es por lo menos 2, 3, 4, 5, 6 o 7 días después del primer periodo. El segundo factor de transcripción pancreático es por ejemplo, NeuroD1, Pax-4, o Ngn3.

10  
15  
20

[0026] El ácido nucleico es un ácido ribonucleico o un ácido desoxiribonucleico.

25

[0027] Opcionalmente, las células se ponen en contacto adicionalmente con un ácido nucleico que codifica polipéptido

Sox-9 o polipéptido Sox-9 bajo condiciones que permiten la absorción del ácido nucleico o polipéptido.

[0028] La invención proporciona una construcción de ácido nucleico que comprende uno o más elementos de respuesta de sintetasa de glutamina (GSRE), ligados operablemente a un promotor y una proteína indicadora. El promotor es un promotor débil. La construcción de ácido nucleico adicionalmente contiene un factor de transcripción. El factor de transcripción es un factor de transcripción pancreático tal como, Pdx-1, Pax-4, MafA, o NeuroD1. También se incluyen en la invención un vector que hace contacto con la construcción de ácido nucleico de la invención. El vector es un vector adenovírico.

[0029] A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos utilizados aquí tienen el mismo significado que lo entiende comúnmente el experto común en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque los métodos y materiales similares o equivalentes a aquellos descritos aquí se pueden utilizar en la práctica o prueba de la presente invención, los métodos y materiales adecuados se describen adelante. Todas las publicaciones, solicitudes de patente, patentes, y otras referencias mencionadas aquí se incorporan mediante referencia en su totalidad. En caso de conflicto, regirá la presente especificación, que incluye definiciones. Adicionalmente, los materiales, métodos, y ejemplos son solo de ilustración y no pretenden ser limitantes.

[0030] Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada, y de las reivindicaciones.

5

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0031] La **Figura 1** muestra que la expresión de Pdx-1 en células hepáticas humanas in vitro induce la activación gradual de expresión de hormona pancreática. (A) Insulina (INS); (B) glucagón (GCG); (C) somatostatina (SST); y (D) otros factores de transcripción específicos de páncreas (NKX6.1, ISL1, PAX4, MAFA, NeuroD1, NeuroG3). Los resultados se normalizan para expresión génica de  $\beta$ -actina dentro de la misma muestra de cADN y se presentan como la media  $\pm$  EE de la expresión relativa versus células tratadas con el virus de control el mismo día.  $n > 4$  en dos experimentos independientes (\* $p < 0,05$ , \*\*  $< 0,01$ ).

[0032] La **Figura 2** muestra que la coexpresión ectópica de los factores de transcripción pancreáticos (pTF) Pdx- 1, Pax4, y MafA en células hepáticas humanas in vitro promueve la secreción de (pro)insulina, comparado con aquella inducida por cada uno de los pTF solos. (A) Inmunofluorescencia (IF) expresión de tinción de muestra de pTF: Pdx-1 (panel izquierdo), Pax4 (panel izquierdo intermedio), MafA (panel derecho intermedio) y una combinación de los 3 pTF (panel derecho), con flechas que indican células que expresan todos los tres pTF. (B) Activación del promotor de insulina de ensayo de luciferasa mediante los pTF indicados; se utiliza  $\beta$ -gal como un control. Los resultados se expresan como proteína de Unidad de Luz Relativa (RLU)/mg. Cada uno de los

puntos de datos representa la media  $\pm$  EE de por lo menos dos experimentos independientes, \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  en comparación con células tratadas con el virus de control, ( $n > 4$ ). (C) Células positivas de insulina que muestran tinción de inmunofluorescencia después de la expresión ectópica de los pTF indicados. Magnificación original x20. Cuantificación de tinción IF en la tabla (derecha). El porcentaje de células positivas de insulina se calcula al contar por lo menos 500 células positivas de por lo menos dos experimentos independientes. (D) Se detecta secreción de insulina después de incubación con las concentraciones indicadas de glucosa mediante radioinmunoensayo. \* $p < 0,05$ ,  $n \geq 12$  en cinco experimentos independientes. La significancia representa las diferencias entre infección triple y todos los otros tratamientos.

[0033] La **Figura 3** muestra los efectos de la expresión secuencial y concertada de los pTF Pdx- 1, Pax4, y MafA en maduración de célula  $\beta$  pancreática. (A) un esquema que demuestra el orden de infección de los pTF (tratamientos B-E) o virus de control (Ad-CMV- -gal, tratamiento A). (B) Tinción de inmunofluorescencia para insulina: tratamiento B (panel izquierdo), tratamiento C (panel intermedio), tratamiento D (panel derecho). La magnificación original es x20. La cuantificación de tinción (porcentaje) se indica adelante en cada imagen. El porcentaje de células positivas de insulina se calcula al contar por lo menos 1000 células positivas de por lo menos dos experimentos independientes. (C) Insulina y (D) Secreción del péptido C después de incubación con la concentración indicada de glucosa se mide mediante radioinmunoensayo. Los tratamientos de infección se

indican en el eje X y se explican en la Tabla 3A. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , comparado con células tratadas con el virus de control;  $n \geq 12$  en 5 experimentos independientes. (E) Niveles de expresión de los factores de transcripción endógenos indicados específicos de páncreas después de los tratamientos indicados (eje X) se miden mediante RT-PCR. Los valores CT se normalizan para expresión génica de  $\beta$ -actina dentro de la misma muestra de cADN. Los resultados se presentan como niveles relativos de la media  $\pm$  EE de la expresión relativa versus células tratadas con el virus de control, \* $p < 0,05$   $n \geq 8$  en 4 experimentos independientes. La flecha señala la reducción específica en el nivel de expresión Isl-1 bajo tratamiento C.

[0034] La **Figura 4** muestra tres gráficas que demuestran la eficiencia de transdiferenciación, que indican que el orden secuencial jerárquico de infección (tratamiento C) es más eficiente. (A) La activación del promotor de insulina se mide mediante ensayo de luciferasa después de los tratamientos de infección indicados. Los resultados se expresan como la proteína de Unidad de Luz Relativa (RLU)/mg. Cada punto de datos representa la media  $\pm$  EE de por lo menos dos experimentos independientes, \*  $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , comparado con células tratadas con el virus de control, ( $n > 4$ ). (B) El análisis del nivel de expresión del transportador de glucosa 2 (GLUT2) mediante RT-PCR se realiza después de los tratamientos de infección indicados. Los valores CT se normalizan para expresión génica de  $\beta$ -actina dentro de la misma muestra de cADN. Los resultados se presentan como niveles relativos de la media  $\pm$  DE comparado con células tratadas con el virus de control. \* $P < 0,05$ , comparado con

células tratadas con el virus de control  $n \geq 8$  en 4 experimentos independientes. (C) Niveles de expresión de convertasa 2 prohormona (PC2; PCSK2) se determinan mediante RT-PCR después de los tratamientos de infección indicados. Los valores CT se normalizan para expresión génica de  $\beta$ -actina dentro de la misma muestra de cADN. Los resultados se presentan como niveles relativos de la media  $\pm$  DE comparado con células tratadas con el virus de control  $**P < 0,01$ ,  $n \geq 8$  en 4 experimentos independientes.

10 [0035] La **Figura 5** muestra dos gráficas que demuestran la secreción del péptido C después de orden secuencial jerárquico de infección (tratamiento C). (A) La secreción del péptido C se mide mediante incubación estática de radioinmunoensayo durante 15min a 0, 5, 10, 15, 20 mM de glucosa en células tratadas mediante el  
15 orden secuencial directo "jerárquico" (tratamiento C)  $*P < 0,05$ ,  $n \geq 7$  en 3 experimentos independientes. (B) La secreción del péptido C se mide mediante radioinmunoensayo durante 13 o 28 días en medio libre de suero complementado con insulina, transferrina y selenio (ITS), antes de ser analizado para la secreción del  
20 péptido C.  $*P < 0,05$ ,  $**P < 0,01$ ,  $n \geq 5$  en 2 experimentos independientes. La significancia representa las diferencias comparado con el protocolo estándar (tratamiento C en el día 6).

[0036] La **Figura 6** es cuatro gráficas que muestran la función  
25 individual de lo pTF en el proceso de transdiferenciación, utilizando infección del orden de tratamiento C y exclusión de cada pTF (C-Pdx1, exclusión de Pdx1; C-Pax4, exclusión de Pax4; y C-Mafa, exclusión de Mafa). (A) La activación del promotor de insulina se mide mediante ensayo de luciferasa. Los resultados se

presentan media  $\pm$  EE, \* $p < 0,1$ , \*\* $p < 0,05$  comparado con el orden de infección secuencial directa "jerárquica" (tratamiento C),  $n \geq 6$  en tres experimentos independientes. (B) La secreción del péptido C después de incubación durante 15 minutos con las concentraciones indicadas de glucosa y medidas mediante radioinmunoensayo. 5 \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  comparado con el orden de infección secuencial "jerárquico" directo (C),  $n \geq 6$  en tres experimentos independientes. (C) Niveles de expresión de enzimas pancreáticas se miden mediante RT-PCR: transportador de glucosa 2 (GLUT2); 10 glucoquinasa (GCK); y convertasa prohormona (PCSK2). (D) Niveles de expresión de los factores de transcripción pancreáticos endógenos indicados se miden mediante RT-PCR. Los valores CT se normalizan para expresión génica de  $\beta$ -actina dentro de la misma muestra de cADN. Los resultados se presentan como niveles 15 relativos de la media  $\pm$  DE comparado con "infección secuencial jerárquica" células hepáticas tratadas. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ ,  $N \geq 6$  en tres experimentos independientes.

[0037] La **Figura 7** muestra tres gráficas que muestran los efectos 20 de la expresión *Isl1* en maduración de células  $\beta$  de células transdiferenciadas hepáticas después de infección por el orden secuencial "jerárquico" (tratamiento C). (A) Los niveles de expresión de insulina se miden mediante RT-PCR. Los valores CT normalizan una expresión génica de  $\beta$ -actina dentro de la misma 25 muestra de cADN. Los resultados se presentan como niveles relativos de la media  $\pm$  EE comparado con células tratadas con el virus de control. \* $P < 0,05$ ,  $n \geq 6$  en 3 experimentos independientes. (B) La secreción de insulina se mide mediante radioinmunoensayo. \*\* $P < 0,01$ ,  $n \geq 6$  y se compara con el orden de infección secuencial

"jerárquico" directo (C),  $n \geq 6$  en 3 experimentos independientes.

(C) El nivel de expresión de transportador de glucosa 2 (Glut2) se mide mediante RT-PCR.

5 [0038] La **Figura 8** muestra la función individual de los pTF en promover la diferenciación de las células para producir glucagón ( $\alpha$ ) y somatostatina ( $\delta$ ) utilizando orden jerárquico de infección (tratamiento C) y exclusión de cada pTF. Los niveles de expresión de hormonas pancreáticas glucagón (GCG) (A y B) y somatostatina  
 10 (SST) (A y D) se determina mediante RT-PCR después de los tratamientos de infección indicados. (C) Los niveles de expresión de los factores de transcripción específicos de célula ARX y BRATN4 también se miden mediante RT-PCR para los tratamientos de infección indicados. (E) Se determinan los niveles de expresión  
 15 de somatostatina (SST) mediante RT-PCR después de infección adicional con Isl1 (100 MOI). Los valores CT (para A, B, C, y D) se normalizan para expresión génica de  $\beta$ -actina dentro de la misma muestra de cADN. Los resultados se presentan como niveles relativos de la media  $\pm$  EE comparado con células tratadas con el  
 20 virus de control (a) o para "infección secuencial jerárquica" tratada con células hepáticas (b-e). \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,1$ ,  $n \geq 6$  en 3 experimentos independientes. (F) Tinción de inmunofluorescencia para somatostatina después de tratamiento C infección (panel izquierdo), y después de tratamiento C infección con infección  
 25 Isl1 adicional (panel derecho). Magnificación original X20. (G) Tinción de inmunofluorescencia para somatostatina ans de insulina que muestra que la administración secuencial de los factores de transcripción en forma jerárquica directa que resulta en aumento

de la maduración de las células transdiferenciadas a lo largo del linaje pancreático similar a beta.

[0039] La **Figura 9** muestra una representación esquemática del mecanismo propuesto de la diferenciación trans inducida por el factor de transcripción pancreático desde el hígado hasta el páncreas. La expresión concertada de los tres pTF resulta en aumento en el número de células transdiferenciadas hepáticas comparado con cada uno de los efectos individuales del factor (B). La administración secuencial de los factores de transcripción en una forma jerárquica directa resulta en aumento en la maduración de las células transdiferenciadas a lo largo del linaje pancreático similar a beta.

15 [0040] **Figura 10. Activación de IPC inducida por Pdx-1 en ratones in vivo se restringe a células adyacentes a las venas centrales que se caracterizan por expresión GS.**

Análisis inmunohistoquímico de Pdx-1 (A) e insulina (B) 14 días después de administración de Ad-CMV-PDX-1. Las flechas indican células positivas, en su mayoría ubicadas en la proximidad de las venas centrales (cv). (C&D) Análisis de la expresión GS en hígados de humanos (C) y de ratones (D) que indican la expresión de GS en 1-2 capas celulares adyacentes a las venas centrales. Magnificación original X.400

25

[0041] **Figura 11. GSRE contiene señalización Wnt que responde al sitio de unión TCF-LEF del elemento.** Una representación esquemática de GSRE que indica la presencia de los sitios de unión TCF-LEF y STAT 5.

[0042]

[0043] **Figura 12. El GSRE dirige la subpoblación de células hepáticas humanas in vitro.**

5 (A&D) Representaciones esquemáticas de Ad- GSRE-TK-Pdx-1 o adenovirus recombinante GFP. Las células hepáticas se infectan con Ad-GSRE-TK-Pdx-1(C) o con Ad-CMV-Pdx- 1 (B). Análisis inmunofluorescente de la expresión de Pdx-1 indica que  $13 \pm 2\%$  de las células hepáticas humanas se infectan por Ad-GSRETK-Pdx-1(C) mientras que  $70 \pm 12\%$  de células tratadas con Ad-CMV-Pdx- 1 (B) expresan el factor nuclear ectópico (anti-Pdx-1 de conejo, un gentil obsequio de C. Wderecha, pink; B&C, respectivamente). Los resultados similares se obtienen utilizando Ad- GSRE-TK-eGFP; ~15% de las células son positivas para eGFP (E&F). La infección de Ad- CMV-eGFP resulta en aproximadamente 75-80% de células positivas eGFP dentro de 3-4 días (datos no presentados)

[0044] **Figura 13. GSRE dirige las células propensas a diferenciación.**

20 Las células hepáticas se infectan con Ad-GSRE-TK-Pdx-1 (B) o con Ad-CMV-Pdx-1 (A) durante 5 días. (A&B), Análisis inmunofluorescente de cotinción de insulina (anti-insulina de conejillo de indias, Dako, verde) y (anti-Pdx-1 de conejo Pdx-1, un gentil obsequio de C. Wrigth, rosado). (C) Análisis estadístico o activación de insulina en células tratadas; Ad-GSRE-TK-Pdx-1 activa la producción de insulina en 50%), mientras que Ad-CMV-Pdx- 1 solo en 5%> de las células positivas Pdx-1. Tinción nuclear DAPI azul; magnificación original X20.

[0045] **Figura 14. Seguimiento de linaje In vitro para células humanas que activan el GSRE.** (A) Una representación esquemática de los vectores de lentivirus. (B) Las células hepáticas humanas adultas en los pasajes 3-10 se infectan con el sistema de lentivirus dual. Se forman imágenes de células hepáticas 10 días después de infección para fluorescencia DsRed2 (rojo) o eGFP (verde). (C) Las células se clasifican mediante un clasificador de células activadas por fluorescencia (FACS; clasificador de células Aria; Becton Dickinson, San José, CA) con un filtro de isotiocianato fluoresceína (530/30 nm) para eGFP y un filtro Rojo Pe-Texas Red (610/20 nm) para DsRed2. (D&E). Las células separadas se cultivan en forma separada para diversos pasajes (magnificación original X 10).

[0046] **Figura 15. Las células eGFP+ y DsRed2+ proliferan eficientemente in vitro con una tasa de proliferación similar y capacidad de infección similar.**

Se cultivan poblaciones separadas de células en forma separada durante ~1 mes. Se analiza la tasa de proliferación de cada grupo (A). Las células eGFP+ (B&C) y DsRed2+ (D&E) se infectan con Ad-CMV-P-gal (B&D) o con Ad-CMV-Pdx-1 (C&E) durante 3 días. El análisis inmunofluorescente utilizando anti-Pdx-1 (azul) indica que casi 80% de las células eGFP y DsRed2 se infectan por el adenovirus.

[0047] **Figura 16. Las células eGFP+ responden más eficientemente que las células DsRed2+ a transdiferenciación inducida por pTF.** Los dos grupos se tratan de forma similar con factores solubles y pTF: Ad-Pdx-1+Ad-Pax-4+ad-MafA o un virus de control (Ad-  $\beta$ -gal)

durante 6 días, características similares a célula  $\beta$  y la función se compara en los grupos separados: (A) a nivel molecular, se estudia la expresión génica de insulina y glucagón mediante Estudio Cuantitativo en tiempo real comparado con las células tratadas con control. Las células de islote humano pancreáticas cultivadas (Pasaje 3) utilizadas como un control positivo. (B&C) A nivel funcional, se analiza la secreción de insulina regulada con glucosa mediante incubaciones estáticas bajas seguido por altas concentraciones de glucosa (2mM y 17,5mM de glucosa en KRB, respectivamente). Se miden la secreción de insulina (B) y péptido C (C) utilizando el equipo de radioinmunoensayo de insulina humana (DPC;  $n \geq 8$  de 3 experimentos diferentes) o equipo de radioinmunoensayo de péptido c humano (Linco  $n \geq 8$  de 3 experimentos diferentes.  $*P < 0,01$  comparado con las células DsRed2+, utilizando análisis de la prueba t de Student.

[0048] **Figura 17. La mayor eficiencia de transdiferenciación en población eGFP+ es estable con aumento de los pasajes en el cultivo.** Los dos grupos proliferados en forma separada después de clasificación y se tratan en forma similar con pTF (Ad-Pdx-1+Ad-Pax-4+ad-MafA y factores solubles) después de unos pocos pasajes (5-7 pasajes post clasificación) o un número mayor de pasajes (10-12 pasajes post clasificación). Se analiza secreción de insulina regulada mediante incubaciones estáticas bajas seguido por altas concentraciones de glucosa (2mM y 17.5mM de glucosa en KRB, respectivamente). Se mide la secreción de insulina utilizando el equipo de radioinmunoensayo de insulina humana (DPC;  $n \geq 6$  de 2 experimentos diferentes). No se detectan diferencias estadísticas significativas entre el bajo y alto

número de pasajes en ambas poblaciones de células, lo que sugiere una tendencia persistente de células etiquetadas eGFP para experimentar los pTF que inducen transdiferenciación a lo largo del linaje de célula  $\beta$  y función.

5

[0049] **Figura 18. Perfiles de expresión génica diferencial de células eGFP+ y DsRed2+** realizados mediante análisis de micromatriz y analizados de acuerdo con DAVID Bioinformatics Resources 6.7. Cuatro por ciento de los genes diferenciales  
10 pertenecen a la ruta de señalización Wnt.

[0050] **Figura 19. La señalización Wnt activa promueve la transdiferenciación de hígado a páncreas.** Se tratan células hepáticas humanas adultas con Ad-CMV-Pdx- 1 y factores solubles,  
15 como se reportó previamente, complementado con Wnt3A (50ng/ml de R&D o DKK3 (g/ml R&D). Después de 5 días, se analiza la secreción de insulina mediante incubaciones estáticas bajas seguido por altas concentraciones de glucosa (2mM y 17.5mM de glucosa en KRB, respectivamente). Se mide la secreción de insulina utilizando el  
20 equipo de radioinmunoensayo de insulina humana (DPC;  $n \geq 8$  de 3 experimentos diferentes) y comparado con células no tratadas (Cont). \* $p < 0,01$  comparado con Ad-CMV-Pdx- 1 solo, utilizando análisis de la prueba t de Student.

25 [0051] **Figura 20. El bloqueo de la ruta de señalización Wnt anula la transdiferenciación de células eGFP+.** Las células eGFP son Ad-CMV-Pdx- 1 o un virus de control (Ad-CMV- -gal) durante 5 días complementado con DKK3 (0,5 $\mu$ g/ml de R&D). La expresión génica de

las hormonas pancreáticas se estudia mediante RT-PCR Cuantitativo en tiempo real comparado con las células tratadas con control.

[0052] **Figura 21. Células eGFP + expresan niveles menores de APC**

5 **y niveles mayores de  $\beta$ -catenina activa que las células DsRed2 +.**

(A) La expresión APC y DKK1 se aumenta marcadamente en células DsRed2+. Esto puede sugerir adicionalmente que estas células expresan niveles mayores de los represores de la ruta de señalización Wnt comparado con las células eGFP+  $n \geq 6$  de 2  
10 experimentos diferentes \* $p < 0,01$  en DsRed2+ comparado con células eGFP+, utilizando análisis de la prueba t de Student. (B) análisis Western blot utilizando un anticuerpo específico para  $\beta$ -catenina activada (clon anti-ABC 8E7, Millipore, 1 :2000) en extractos celulares positivos eGFP y DsRed2, se utiliza  $\beta$ -actina  
15 (SC-1616, Santa Cruz, 1 : 1000) como una proteína normalizante. (C) La cuantificación de los niveles de proteína  $\beta$ -catenina se realiza utilizando el software ImageJ 1.29x.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

20

[0053] Se ha mostrado que los factores de transcripción (TF) inducen transdiferenciación en numerosos linajes de células. Como se denomina aquí, "transdiferenciación" se refiere al proceso mediante el cual un primer tipo de célula pierde las  
25 características de identificación y cambia su fenotipo a aquel de un segundo tipo de célula. En algunas realizaciones, la primera y segunda células son de diferentes tejidos o linajes de células. Preferiblemente, la transdiferenciación implica convertir una célula madura o diferenciada en una célula madura o diferenciada

diferente. Específicamente, los factores de transcripción específicos de linaje (TF) han sugerido detectar funciones instructivas en la conversión de células adultas a células pancreáticas endocrinas (Meivar-Levy et al, 2006; Meivar-Levy et al, 2010; Yechoor et al, 2010; Russ et al, 2011), neuronas (Vierbuchen et al, 2010; Ambasudhan et al, 2011; Pang et al, 2011), células hematopoyéticas (Szabo et al, 2010) y linajes de cardiomiocitos (Ieda et al, 2010), lo que sugiere que ocurren procesos de transdiferenciación en un amplio espectro de ambientes. En todos los protocolos de transdiferenciación, los TF ectópicos sirven como un activador a corto plazo para un proceso de desarrollo irreversible y funcional, amplio potencial (Ber et al, 2003; Meivar-Levy et al, 2003; Meivar-Levy et al, 2006). Numerosos estudios sugieren que la expresión ectópica de los TF individuales activa una función y repertorio alternos deseados, en un proceso involucrado con la activación de TF inactivos de otra forma relevantes adicionales. Sin embargo, el curso de tiempo, los niveles relativos y la jerarquía, u orden, de los TF inducidos, permanecen desconocidos.

20

[0054] Al explorar la insuficiencia relativa de la inducción del factor de transcripción endógeno (TF) al introducir los TF ectópicos individuales, la presente invención se relaciona con la transdiferenciación como un proceso temporalmente controlado y secuencial que está afectado por una red jerárquica de los TF.

25

[0055] La presente invención se basa en el hallazgo de que la transdiferenciación de hígado a páncreas inducida por TF es un proceso gradual y consecutivo. De forma importante, solo la

administración secuencial de los TF pancreáticos pero no su expresión relacionada dirige selectivamente los programas de especificación de linaje dentro del páncreas endocrino. La expresión secuencial de los TF pancreáticos en un modo jerárquico directo se ha mostrado que es obligatoria para la maduración de células transdiferenciadas a lo largo del linaje de células  $\beta$ . Específicamente, una función para el factor de transcripción MafA específico de células  $\beta$  pancreáticas se ha identificado en la etapa final del proceso de transdiferenciación. En esta etapa, el MafA promueve la maduración de las células transdiferenciadas hepáticas a lo largo del linaje de células  $\beta$ , en un proceso asociado con Isl1 y represión de somatostatina.

[0056] Los hallazgos descritos aquí sugieren características fundamentales temporales de la transdiferenciación mediada por el factor de transcripción que puede contribuir al aumento del mérito terapéutico de utilizar reprogramación de células adultas inducidas por TF para tratar enfermedades degenerativas que incluyen diabetes.

20

[0057] El factor de transcripción pancreático (pTF), tales como Pdx-1, NeuroD1, Ngn-3 y Pax4, activan la transdiferenciación de hígado a páncreas e inducen individualmente alivio de hiperglucemia en ratones diabéticos (Ferber et al, 2000; Ber et al, 2003; Kojima et al, 2003; Koizumi et al, 2004; Kaneto et al, 2005; Kaneto et al, 2005). Más aún, utilizando un sistema experimental in vitro de células hepáticas humanas de adulto, demostramos previamente que el Pdx-1 activa la expresión de numerosos marcadores específicos de células  $\beta$  e inducen la

secreción regulada de glucosa de la insulina procesada (Sapir et al, 2005; Meivar-Levy et al, 2007; Aviv et al, 2009; Gefen-Halevi et al, 2010; Meivar-Levy et al, 2011). El proceso inducido se asocia con la expresión de numerosos pTF endógenos clave y se demuestra el alivio de hiperglucemia luego de trasplante de las células hepáticas humanas de adulto transdiferenciadas en ratones diabéticos (Sapir et al, 2005). Sin embargo, numerosos otros estudios han indicado que utilizar combinaciones de diversos TF clave aumenta marcadamente la eficiencia de reprogramación comparado con aquella inducida por la expresión ectópica de los TF individuales (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). Esto sugiere una capacidad restringida potencial de los factores ectópicos individuales para activar los TF de complemento endógenos a suficientes niveles necesarios para un proceso de transdiferenciación eficiente (Kaneto et al, 2005; Zhou et al, 2008; Ambasudhan et al, 2011; Pang et al, 2011). La interrupción objetivo o la expresión temporal de los factores de transcripción pancreáticos durante desarrollo de páncreas dificulta la organogenia del páncreas así como también función y diferenciación de células islote (Nishimura et al, 2009). Al explotar la insuficiencia relativa de la inducción de los TF endógenos mediante TF ectópicos individuales, la presente invención se relaciona con transdiferenciación como un proceso temporalmente controlado y secuencial que está afectado por una red jerárquica de TF.

[0058] La especificación pancreática se inicia por el factor de transcripción de homeosecuencia Pdx1, que también se requiere para la función de células  $\beta$  en adultos (Offield et al, 1996; Staffers et al, 1997). La diferenciación endocrina luego está  
5 mediada por el factor hélice-bucle-hélice básico Ngn3 (Gradwohl et al, 2000). Los factores de homeosecuencia deteriorados Pax4 y Arx, han estado implicados como factores clave en la segregación de los diferentes tipos de células endocrinas (Collombat et al, 2003; Brun et al, 2008). La maduración final a lo largo del  
10 linaje de células  $\beta$  y la función se atribuye a la expresión selectiva de MafA en células  $\beta$  en el páncreas de adultos (Kataoka et al, 2002).

[0059] La presente invención se basa en parte en el hallazgo  
15 sorprendente de que las células hepáticas humanas se pueden transdiferenciar directamente para producir un tipo de célula completamente diferente, las células que producen hormonas pancreáticas que incluyen células beta. La aplicación del factor de transcripción seleccionado en una secuencia temporalmente  
20 regulada induce la transdiferenciación de células hepáticas de adulto en células beta maduras funcionales. La invención resuelve el problema de producir grandes poblaciones de células que producen insulina, o células beta pancreáticas, al proporcionar métodos para expandir y transdiferenciar las células adultas. Las  
25 composiciones que comprenden los factores de transcripción seleccionados o la población generada de células pancreáticas transdiferenciadas se puede utilizar para tratar un trastorno pancreático utilizando los métodos descritos aquí.

[0060] Los esfuerzos previos para transdiferenciar células no pancreáticas a células pancreáticas, tal como células beta, utilizan solo un factor de transcripción o la administración concertada o simultánea de más de un factor de transcripción pancreático. La invención descrita aquí proporciona métodos para una administración secuencial, ordenada de los factores de transcripción específicos en puntos de tiempo definidos. Adicionalmente, los métodos descritos aquí aumentan sustancialmente la eficiencia de transdiferenciación comparado con aquella inducida por cada uno de los factores de transcripción individuales solos.

[0061] La presente invención proporciona adicionalmente una población de células que poseen aumento de la capacidad de transdiferenciación. Estas células se caracterizan por (1) marcadores de membrana celular potenciales, (2) poseer la capacidad de activar el elemento regulador de sintetasa de glutamina (GSRE), y (3) al estar únicamente equipado con señalización Wnt activa. Por lo menos 30% de las células en la población son capaces de activar GSRE. Por ejemplo las células son células endoteliales, células epiteliales, células mesenquimales, fibroblastos, o células hepáticas. Preferiblemente, las células son células humanas. En algunas realizaciones, las células se pueden transdiferenciar a lo largo del linaje pancreático para madurar las células pancreáticas con la función pancreática. En otras realizaciones, las células se pueden transdiferenciar a lo largo del linaje neural a células neurales.

[0062] De esta forma, la presente invención también resuelve el problema de transdiferenciación previa o protocolos de reprogramación que han restringido frecuentemente la eficiencia. Por ejemplo, aunque la expresión ectópica de los factores de transcripción pancreáticos clave resulta en la expresión en cada célula anfitriona, solo hasta 15% de las células se transdiferencian exitosamente para exhibir la función pancreática.

[0063] La presente invención también proporciona métodos para aislar la población de células con capacidad de transdiferenciación aumentada o enriquecida. Por ejemplo, un método para aislar estas células es mediante clasificación de las células que activan la expresión GFP ligada operativamente al elemento regulador de sintetasa glutamina, o un fragmento del mismo, aislando por lo tanto aquellas células que pueden activar GSRE. Las células se pueden clasificar mediante FACS y se pueden propagar en el cultivo, en forma separada del resto de las células, para expansión rápida de las células con capacidad de transdiferenciación enriquecida. La población de células con capacidad enriquecida para transdiferenciación es solo una pequeña proporción de las células que constituyen el tejido in vivo. Por ejemplo, en una población o tejido dado de células, la población de células con capacidad enriquecida para transdiferenciación es solo aproximadamente menor de 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, aproximadamente 10%, aproximadamente 15%, de la población completa de células en un tejido dado. Por lo tanto, la presente invención también proporciona métodos para el aislamiento de dichas células con aumento de la capacidad de transdiferenciación

de células que no han aumentado la capacidad de transdiferenciación. De acuerdo con lo anterior, la presente invención proporciona la ventaja de una población de células con una proporción mayor de células que tienen aumento de la capacidad de transdiferenciación para aumentar la eficiencia de transdiferenciación para proporcionar células transdiferenciadas para el tratamiento de diversas enfermedades o trastornos.

[0064] Será obvio para aquellos expertos en la técnica que se pueden hacer diversos cambios y modificaciones a los métodos descritos aquí dentro del espíritu y alcance de la invención.

[0065] *Métodos para producir Células Beta Pancreáticas*

[0066] La presente invención proporciona métodos para producir células que exhiben un fenotipo de célula beta pancreática madura al poner en contacto células no pancreáticas de mamífero adulto con factores de transcripción pancreáticos, tales como PDX-1, Pax-4, NeuroD1, y MafA, en puntos de tiempo específicos. En algunas realizaciones, los métodos comprenden poner en contacto una célula no pancreática de mamífero adulto con PDX-1 en un primer periodo; poner en contacto las células de la primera etapa con Pax-4 en un segundo periodo; y poner en contacto las células de la segunda etapa con MafA en un tercer periodo. En una realización, los métodos comprenden poner en contacto una célula no pancreática de mamífero adulto con PDX- 1 en un primer periodo; poner en contacto las células de la primera etapa con NeuroD1 en un segundo periodo; y poner en contacto las células de la segunda etapa con MafA en un tercer periodo. En otra

realización, los métodos comprenden poner en contacto una célula no pancreática de mamífero adulto con PDX-1 y un segundo factor de transcripción en un primer periodo y poner en contacto las células de la primera etapa con MafA en un segundo periodo. Los factores de transcripción pueden ser polipéptidos, ácidos ribonucleicos o ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos del factor de transcripción. Por ejemplo, los factores de transcripción que se proporcionan juntos con PDX-1 son Pax-4, NeuroD1, Ngn3, o Sox-9. Preferiblemente, el factor de transcripción es NeuroD 1.

[0067] En un aspecto, los métodos descritos aquí adicionalmente comprenden poner en contacto las células en, antes, o después de cualquiera de las etapas anteriores con el factor de transcripción Sox-9.

[0068] En un aspecto, el segundo periodo es por lo menos 24 horas después del primer periodo. En un aspecto, el tercer periodo es por lo menos 24 horas después del segundo periodo. En algunas realizaciones, el segundo y tercer periodo pueden ser por lo menos 24 horas, por lo menos 48 horas, por lo menos 72 horas, y por lo menos 1 semana o más después del primero o segundo periodos, respectivamente.

[0069] Los factores de transcripción para uso en la presente invención pueden ser un polipéptido, ácido ribonucleico o un ácido nucleico. Como se utiliza aquí, el término "ácido nucleico" pretende incluir moléculas de ADN (por ejemplo, cADN o ADN genómico), moléculas de ARN (por ejemplo, mARN, microARN u otros

derivados de ARN), análogos del ADN o ARN generados utilizando análogos de nucleótidos, y derivados, fragmentos y homólogos de los mismos. La molécula de ácido nucleico puede ser de hebra sencilla o de hebra doble. Preferiblemente, el ácido nucleico es un ADN.

[0070] Los factores de transcripción preferidos para uso en los métodos descritos aquí son PDX-1, Pax-4, NeuroD1, y MafA. Otros factores de transcripción que se pueden utilizar son Ngn3, y Sox9.

[0071] La proteína PDX-1 de homeodominio (gen 1 de homeosecuencia pancreática y duodenal), también conocido como IDX-1, IPF-1, STF-1, o IUF-1, cumple una función central en la regulación del desarrollo de islote pancreático y función. El PDX- 1 está implicado directa o indirectamente en la expresión específica de células islote de diversos genes tales como, por ejemplo insulina, glucagón, somatostatina, proinsulina convertasa 1/3 (PC 1/3), GLUT -2 y glucoquinasa. Adicionalmente, el PDX-1 media la transcripción génica de insulina en respuesta a glucosa. Las fuentes adecuadas de ácidos nucleicos que codifican PDX-1 incluyen por ejemplo el ácido nucleico PDX-1 humano (y las secuencias de proteínas codificadas) disponible como Nos. de Acceso GenBank U35632 (SEQ ID NO: 5) y AAA88820 (SEQ ID NO: 4), respectivamente. Otras fuentes incluyen ácido nucleico PDX de rata y las secuencias de proteínas se muestran en el No. de Acceso GenBank U35632 y AAA18355, respectivamente, y se incorporan aquí mediante referencia en su totalidad. Una fuente adicional incluye el ácido nucleico de PDX- 1 de pez cebra y las

secuencias de proteínas se muestran en el No. de Acceso GenBank AF036325 y AAC41260, respectivamente, y se incorporan aquí mediante referencia en su totalidad.

5 [0072] El Pax-4, también conocido como caja 4 emparejada, la proteína 4 de caja emparejada, el gen 4 de caja emparejada 4, MODY9 y KPD, es un factor de transcripción específico pancreático que se une a los elementos dentro de los promotores glucagón, insulina y somatostatina, y cumple una función importante en la  
10 diferenciación y desarrollo de células beta de islote pancreático. En algunos contextos celulares, el Pax-4 exhibe actividad represora. Las fuentes adecuadas de ácido nucleicos que codifican el Pax-4 incluyen por ejemplo el ácido nucleico Pax-4 humano (y las secuencias de proteínas codificadas) disponible  
15 como Nos. de Acceso GenBank NM\_006193.2 (SEQ ID NO: 7) y AAD02289.1 (SEQ ID NO: 6), respectivamente.

[0073] MafA, también compuesto homólogo A de oncogen de fibrosarcoma musculoaponeurótico V-maf o RIPE3B1, es un activador  
20 transcripcional regulado con glucosa y específico de células beta para la expresión génica de insulina. MafA puede estar implicado en la función y desarrollo de células beta así como también en la patogenia de diabetes. Las fuentes adecuadas de ácidos nucleicos que codifican MafA incluyen por ejemplo el ácido nucleico MafA  
25 humano (y las secuencias de proteínas codificadas) disponible como Nos. de Acceso GenBank NM\_201589.3 (SEQ ID NO: 11) y P\_963883.2 (SEQ ID NO: 10), respectivamente.

[0074] Neurog3, también conocido como neurogenina 3 o Ngn3, es un factor de transcripción de hélice-bucle-hélice básico (bHLH) requerido para desarrollo endocrino en el páncreas y el intestino. Las fuentes adecuadas de ácidos nucleicos que codifican Neurog3 incluyen por ejemplo el ácido nucleico Neurog3 humano (y las secuencias de proteínas codificadas) disponible como Nos. de Acceso GenBank NM\_020999.3 y NP\_066279.2, respectivamente.

[0075] NeuroD1, también conocido como Neuro Diferenciación 1, y beta-2 ( $\beta 2$ ) es un factor de transcripción del tipo Neuro D. Es un factor de transcripción de hélice-bucle-hélice básico que forma los heterodímeros con otras proteínas bHLH y activa la transcripción génica que contiene una secuencia de ADN específica conocida como caja E. Regula la expresión del gen de insulina, y las mutaciones en este gen resultan en diabetes mellitus tipo II. Las fuentes adecuadas de ácidos nucleicos que codifican NeuroD 1 incluyen por ejemplo el ácido nucleico NeuroD 1 humano (y las secuencias de proteínas codificadas) disponible como Nos. de Acceso GenBank NM\_002500.4 (SEQ ID NO: 9) y NP\_002491.2 (SEQ ID NO: 8), respectivamente.

[0076] Sox9 es un factor de transcripción que está involucrado en el desarrollo embrionario. El Sox9 ha sido particularmente investigado por su importancia en el desarrollo dl hueso y esqueleto. El SOX-9 reconoce la secuencia CCTTGAG a lo largo de otros miembros de las proteínas de unión ADN clase caja HMG. En el contexto de la presente invención, el uso de Sox9 puede estar implicado en mantener la masa de célula progenitora pancreática,

ya sea antes o después de inducción de transdiferenciación. Las fuentes adecuadas de ácidos nucleicos que codifican NeuroD1 incluyen por ejemplo el ácido nucleico NeuroD 1 humano (y las secuencias de proteínas codificadas) disponible como Nos. de  
 5 Acceso GenBank NM\_000346.3 y NP\_000337.1, respectivamente.

[0077] La célula puede ser cualquier célula que es capaz para producir hormonas pancreáticas, por ejemplo, médula ósea músculo, bazo, riñón, sangre, piel, páncreas, o hígado. En una  
 10 realización, la célula es una célula no pancreática. En una realización, la célula es capaz de funcionar como una célula islote completa, es decir, almacenar, procesar y secretar hormonas pancreáticas, preferiblemente insulina, luego de activación extracelular. En otra realización la célula es una  
 15 célula hepática. En realizaciones adicionales la célula es totipotente o pluripotente. En realizaciones alternativas la célula es un blastocito hematopoyético, blastocito embrionario o preferiblemente un blastocito hepático.

[0078] La población de células que se expone a, es decir, se pone en contacto con, los compuestos (es decir PDX-1, Pax-4, MafA, NeuroD1 y/o polipéptido Sox-9 o ácido nucleico que codifica PDX-1, Pax-4, MafA, NeuroD1 y/o polipéptidos Sox-9) puede ser cualquier número de células, es decir, una o más células, y se  
 25 puede proporcionar in vitro, in vivo, o ex vivo. La población de células que se pone en contacto con los factores de transcripción se puede expandir in vitro antes de ser contactado con los factores de transcripción. La población de células producidas exhibe un fenotipo de célula beta pancreática madura. Estas

células se pueden expandir in vitro mediante métodos conocidos en la técnica antes de transdiferenciación y maduración a lo largo del linaje de células  $\beta$ , y antes de la administración o suministro a un paciente o sujeto en necesidad del mismo.

5

[0079] El sujeto es preferiblemente un mamífero. El mamífero puede ser, por ejemplo, un humano, primate diferente a humano, ratón, rata, perro, gato, caballo, o vaca.

10 [0080] En algunas realizaciones, el factor de transcripción es un polipéptido, tal como PDX- 1, Pax-4, MafA, NeuroD1 o Sox-9, o combinación de los mismos y se suministra a una célula mediante los métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, el polipéptido del factor de transcripción se proporciona directamente a las  
15 células o se suministra por medio de una micropartícula o nanopartícula, por ejemplo, un portador liposómico.

[0081] En algunas realizaciones, el factor de transcripción es un ácido nucleico. Por ejemplo, el ácido nucleico codifica un PDX-1,  
20 Pax-4, MafA, NeuroD1 o polipéptido Sox-9. El ácido nucleico que codifica el factor de transcripción, o una combinación de dichos ácidos nucleicos, se puede suministrar a una célula por cualquiera de los medios conocidos en la técnica. En algunas realizaciones, el ácido nucleico se incorpora en un vector de  
25 expresión o un vector vírico. Preferiblemente, el vector vírico es un vector vírico de adeno virus. La expresión o vector vírico se puede introducir a la célula mediante cualquiera de los siguientes: transfección, electroporación, infección, o transducción.

[0082] *Población de Células Predispuestas a Transdiferenciación.*

[0083] La presente invención proporciona poblaciones de células  
5 derivadas de hígado que se predisponen a transdiferenciación. La  
población de células es útil en los métodos para producir células  
beta pancreáticas descritas aquí. Las células que se predisponen  
a transdiferenciación de la presente invención también se  
denominan que tienen capacidad de transdiferenciación aumentada o  
10 enriquecida. "Aumento de la capacidad de transdiferenciación"  
significa que cuando la población de células de la presente  
invención se somete a un protocolo de diferenciación (es decir  
introducción de un factor de transcripción pancreático), más de  
15 15%, más de 20%, más de 30%, más de 40%, más de 50%, más de 60%,  
más de 70% o más de 80% diferenciará un tipo de célula alterna.  
Por ejemplo, una población de células endoteliales, células  
epiteliales, células mesenquimales, fibroblastos, o células  
hepáticas con aumento de la capacidad de transdiferenciación se  
puede diferenciar para madurar las células pancreáticas o madurar  
20 células neurales.

[0084] En otra realización, la población de células que se  
predispone para transdiferenciación tiene la capacidad de activar  
e el elemento de respuesta de sintetasa de glutamina (GSRE). Por  
25 ejemplo, en la población de células de la presente invención, por  
lo menos 2%, por lo menos 3%, por lo menos 4%, por lo menos 5%,  
por lo menos 10%, por lo menos 15%, por lo menos 20%, por lo  
menos 30%, por lo menos 40%, por lo menos 50%, por lo menos 60%,  
por lo menos 70%, por lo menos 80% o por lo menos 90% de las

células en la población son capaces de activar GSRE. Preferiblemente, por lo menos 30% de las células en la población son capaces de activar GSRE. La sintetasa glutamina es una enzima predominantemente expresada en el cerebro, riñones e hígado, y  
5 cumple una función esencial en el metabolismo de nitrógeno al catalizar la condensación de glutamato y amoníaco para formar glutamina. La sintetasa glutamina, por ejemplo, se expresa únicamente en células hepáticas pericentrales y astrocitos en el cerebro. Los datos presentados aquí indican que las células que  
10 demuestran la activación de GSRE proporcionan un parámetro selectivo único para el aislamiento de células predispuestas a transdiferenciación.

[0085] La activación de GSRE se puede medir mediante métodos  
15 conocidos por un experto común en la técnica. Por ejemplo, se puede generar un adenovirus recombinante que contiene el elemento de respuesta de sintetasa de glutamina ligado operativamente a un promotor y un gen marcador, tal como una proteína fluorescente. Este adenovirus recombinante con el marcador GSRE se puede  
20 introducir en una mezcla heterogénea de células que contienen alguna parte de las células que se predisponen a transdiferenciación. Aquellas células que son competentes para activación del GSRE expresarán el gen marcador, que se puede detectar mediante métodos conocidos en la técnica, identificando  
25 por lo tanto células predispuestas a transdiferenciación.

[0086] Una población heterogénea de células, en la que no se conocen aquellas células predispuestas a transdiferenciación, se puede poner en contacto con un vector adenovírico que contiene el

GSRE ligado operativamente a un promotor TK mínimo y eGFP. Las células que pueden activar el GSRE expresará GFP y se pueden identificar mediante diversos métodos conocidos en la técnica para detectar la expresión GFP. Por ejemplo, la separación de las

5 células activadas por GSRE que se predisponen a transdiferenciación de las células que no se predisponen a transdiferenciación se puede lograr a través de un aparato FAC, clasificador y técnicas conocidas por aquellos expertos comunes en la técnica (Figura 14). Las células separadas que se

10 predisponen a transdiferenciación luego se pueden propagar o expandir in vitro. Los resultados descritos aquí demuestran que el pasaje de las células predispuestas a transdiferenciación para 5-12 pasajes o más retiene su capacidad de transdiferenciación. Por ejemplo, las células hepáticas aisladas predispuestas a

15 transdiferenciación continúan produciendo y secretando insulina en una forma dependiente de glucosa incluso después de 12 pasajes en el cultivo (Figura 17).

[0087] En otra realización, la población de células que se

20 predispone para transdiferenciación también tiene rutas de señalización Wnt activas. Las rutas de señalización Wnt cumplen una función significativa en la pluripotencia de blastocitos y destino celular durante desarrollo, así como también patrón de eje corporal, proliferación de células, y migración celular. Las

25 rutas de señalización Wnt se activan mediante la unión de un ligando de proteína Wnt a un receptor de la familia Frizzled (Fz) (un receptor de proteína acoplado G), opcionalmente activan una proteína de coreceptor, y la activación posterior de una proteína citoplásmica denominada Dishevelled (Dsh). En la ruta Wnt

canónica, el coreceptor LRP-5/6 también se activa y la beta-catenina se acumula en el citoplasma y se transloca eventualmente en el núcleo para actuar como un coactivador transcripcional de los factores de transcripción TCF/LEF. Sin señalización Wnt, un  
 5 complejo de destrucción que incluye proteínas de adenomatosis poliposis coli (APC), Axina, proteína fosfatasa 2A (PP2A), sintasa quinasa 3 de glucógeno (GSK3) y  $\beta$ -catenina que dirige quinasa caseína (CKIa) para ubiquitinación y su degradación posterior mediante la proteasoma. Sin embargo, la activación del  
 10 receptor Frizzled mediante unión Wnt provoca interrupción del complejo de destrucción, permitiendo de esta forma que se acumule  $\beta$ -catenina.

[0088] La señalización Wnt también puede ocurrir a través de la  
 15 rutas no canónicas que utilizan diferentes proteínas de coreceptor diferentes y activan diferentes efectores en la dirección 3', por ejemplo, para regular el citoesqueleto, estimular la liberación de calcio del retículo endoplásmico, activar las rutas mTOR, y regular la miogenia.

20

[0089] Un experto común en la técnica utilizará fácilmente los métodos conocidos en la técnica para determinar la activación de las rutas de señalización Wnt. Por ejemplo, células que expresan Wnt3a, niveles reducidos de DKK1 o DKK3, niveles reducidos de  
 25 APC, aumento de los niveles de beta-catenina activada, o elementos de unión STAT3 tienen rutas de señalización Wnt activa. DKK1, DKK3, y APC son inhibidores conocidos de las rutas de señalización Wnt. Otros efectores de señalización que indican las

rutas de señalización Wnt activa se conocen fácilmente en la técnica.

[0090] Preferiblemente, la población de células se predispone  
5 para transdiferenciación al linaje pancreático, en donde las  
células transdiferenciadas exhiben la función y fenotipo  
pancreático. Por ejemplo, las células transdiferenciadas exhiben  
el fenotipo de célula beta pancreática madura y función, que  
incluye, pero no se limita a, la expresión, producción, y/o  
10 secreción de hormonas pancreáticas. Las hormonas pancreáticas  
pueden incluir, pero no se limitan a, insulina, somatostatina,  
glucagón, o polipéptido amiloide de islote (IAPP). La insulina  
puede ser insulina hepática o insulina en suero. Preferiblemente  
la insulina es una forma de proceso completa m de insulina capaz  
15 de promover la utilización de glucosa, y carbohidrato,  
metabolismo de proteínas y grasa. Por ejemplo, las células  
predispuestas a transdiferenciación pueden abarcar  
aproximadamente 15% de todas las células en un cultivo celular  
hepático humano in vitro heterogéneo. Cuando las células expresan  
20 ectópicamente los pTF, más de 5% , 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%,  
50% de las células en el cultivo producen insulina o secretan el  
péptido c.

[0091] En una realización, la población de células que se  
25 predispone a transdiferenciación se ubican en proximidad cercana  
a las venas centrales del hígado, o son células hepáticas  
pericentrales. Como se muestra aquí, aunque alrededor de 40-50%  
de células hepáticas que expresan ectópicamente los factores de  
transcripción pancreáticos, tal como PDX-1, solo un subgrupo de

células que producen insulina luego de expresión de pTF. Estas células que producen insulina (IPC) se ubican principalmente cerca a las venas ventrales, como se muestra por la Figura IB. Estas células también se caracterizan por la expresión de  
5 sintetasa glutamina y señalización Wnt activa.

[0092] En otra realización preferida, la población de células de la presente invención se predisponen a transdiferenciación al linaje neural, en donde las células transdiferenciadas expresan  
10 marcadores neurales, exhiben el fenotipo neural, o exhiben la función neural. Las células transdiferenciadas pueden ser neuronas o células gliales.

[0093] En otra realización, las células con aumento de la  
15 predisposición para transdiferenciación se pueden identificar a través de marcadores de superficie celular específicos. Por ejemplo, las células con aumento en los niveles de HOMER1, LAMP3 o BMPR2 indican células con aumento de la capacidad de transdiferenciación cuando se compara con células sin  
20 predisposición para transdiferenciación. Las células con niveles reducidos de ABCB1, ITGA4, ABCB4, o PRNP indican células con aumento de la capacidad de transdiferenciación cuando se compara con células sin predisposición para transdiferenciación. Cualquier combinación de los marcadores de superficie celular  
25 descritos se puede utilizar para distinguir una población de células predispuestas a transdiferenciación de una población de células que no se predispone para transdiferenciación. Los anticuerpos para estos marcadores de superficie celular están comercialmente disponibles. Las técnicas de inmunoensayo o

inmunoafinidad conocidas en la técnica se pueden utilizar para distinguir células con aumento de la capacidad de transdiferenciación de aquellas células sin capacidad de transdiferenciación.

5

[0094] El uso de la población de células de la presente invención para producir células que exhiben fenotipos celulares pancreáticos proporciona determinadas ventajas sobre la diferenciación de las poblaciones heterogéneas de células no pancreáticas para producir células que exhiben fenotipos de célula pancreáticas. Los estudios previos descritos que expresan un factor de transcripción pancreático (pTF) tal como PDX-1 en una población heterogénea de células no pancreáticas (es decir, células hepáticas) muestran mejor, que solo 15% de las células que expresan PDX-1 son competentes para producir insulina. Por lo tanto, solo 15% de las células se diferencian exitosamente en una célula beta pancreática madura capaz para producir y secretar hormonas pancreáticas. En contraste, introducir los pTF en la población de células de la presente invención resulta en por lo menos 30%, por lo menos 40%, por lo menos 50%, por lo menos 60%, por lo menos 70%, o por lo menos 80% de las células que se diferencian en un fenotipo de célula beta pancreática madura, por ejemplo, produce insulina, glucagón, y/o secretan el péptido c. Preferiblemente, cuando las células de la población de células de la presente invención expresan un factor de transcripción pancreático, por lo menos 30% de las células producen insulina o secretan el péptido c.

[0095] *Métodos de Transdiferenciación*

[0096] La presente invención también proporciona métodos para utilizar la población de células con aumento de la capacidad de transdiferenciación para producir células que exhiben un tipo de célula diferenciada madura, en donde la célula diferenciada tiene un fenotipo diferente de la población de células de partida. Por ejemplo, una población de células con aumento de la capacidad de transdiferenciación (es decir células epiteliales, fibroblastos o células hepáticas) se puede diferenciar en células a lo largo del linaje pancreático o neural para exhibir fenotipos de células neurales o pancreáticas diferenciadas maduras. Se puede utilizar cualesquiera medios conocidos en la técnica para diferenciar células para linaje pancreático o neural.

[0097] En una realización, la población de células predisuestas a transdiferenciación se puede diferenciar a lo largo del linaje neural a través de la expresión del factor neural de transcripción. Los factores neurales de transcripción se conocen en la técnica. En otras realizaciones, la población de células de la presente invención se puede diferenciar para hacer madurar células neurales a través de poner en contacto las células con diversas citoquinas, factores de crecimiento, u otros agentes conocidos en la técnica para diferenciar células en el linaje neural. Las células neurales diferenciadas pueden expresar marcadores neurales, exhibir un fenotipo neural (es decir, perfil de expresión génica neural), o exhibir función neural. Las células diferenciadas pueden ser neuronas o células gliales.

[0098] En otra realización, la población de células predispuestas a transdiferenciación se puede diferenciar a lo largo del linaje pancreático a través de la expresión de los factores de transcripción pancreáticos. Los factores de transcripción pancreáticos son, por ejemplo, PDX-1, Pax-4, MafA, NeuroD 1, o una combinación de los mismos. Se describen métodos para producir células beta pancreáticas en la Patente Estadounidense No. 6,774, 120 y U.S. Publicación No. 2005/0090465, cuyos contenidos se incorporan mediante referencia en su totalidad.

10

[0099] En otra realización, la población de células predispuestas a transdiferenciación se puede diferenciar a lo largo del linaje pancreático a través de los métodos descritos aquí.

15 [00100] Fenotipos de Células *Beta Pancreáticas*

[00101] Los métodos proporcionados aquí producen células con una función o fenotipo de célula beta pancreática madura. "Función o fenotipo de células beta pancreáticas" significa que la célula exhibe una o más características típicas de células beta pancreáticas, es decir producción de hormonas pancreáticas, procesamiento, almacenamiento en gránulos secretores, secreción de hormonas, activación de promotores génicos pancreáticos, o perfil de expresión génica de células beta características. La secreción de hormonas incluye la secreción nutricionalmente y/o hormonalmente regulada. Preferiblemente, las células producidas exhiben por lo menos un función o fenotipo de células beta pancreáticas, como se describe aquí.

20  
25

[00102] La hormona pancreática puede ser por ejemplo, insulina, glucagón, somatostatina o polipéptido amiloide de islote (IAPP). La insulina puede ser insulina hepática o insulina en suero. En otra realización la hormona pancreática es insulina hepática. En una  
5 realización alternativa la hormona pancreática es insulina en suero (es decir, una forma completamente procesada de insulina capaz de promover, por ejemplo, utilización de glucosa, carbohidrato, metabolismo de grasa y proteínas).

10 [00103] En algunas realizaciones la hormona pancreática está en la forma de "prohormona". En otras realizaciones la hormona pancreática está en la forma biológicamente activa completamente procesada de la hormona. En otras realizaciones la hormona pancreática está bajo el control regulador es decir, la secreción  
15 de la hormona está bajo control nutricional y hormonal similar a las hormonas pancreáticas endógenamente producidas. Por ejemplo, en un aspecto de la invención la hormona está bajo el control regulador de glucosa. La secreción de insulina también se puede medir mediante, por ejemplo, procesamiento y secreción del  
20 péptido C.

[00104] Se puede determinar el fenotipo de células beta pancreática por ejemplo al medir la producción de hormonas pancreáticas, es decir, expresión de proteína o mRNA de proteína  
25 de insulina, somatostatina o glucagón. Se puede determinar la producción de hormonas mediante métodos conocidos en la técnica, es decir inmunoensayo, western blot, ensayos de unión de receptor o funcionalidad mediante la capacidad de aliviar hiperglucemia luego de implantación en el anfitrión diabético.

[00105] En algunas realizaciones, las células se pueden dirigir para producir y secretar insulina utilizando los métodos especificados aquí. La capacidad de una célula para producir insulina se puede evaluar mediante una variedad de métodos conocidos por aquellos expertos comunes en la técnica. Por ejemplo, se puede detectar mRNA de insulina mediante RT-PCR o se puede detectar insulina mediante los anticuerpos elevados contra insulina. Adicionalmente, otros marcadores de diferenciación pancreática incluyen la expresión de los genes Isl-1, Pdx-1, Pax-4, Pax-6, y Glut-2. Otros marcadores fenotípicos para la identificación de células islote se describen en el documento U.S. 2003/0138948, incorporado aquí en su totalidad.

[00106] Se puede determinar el fenotipo de células beta pancreáticas por ejemplo mediante genes específicos del promotor de activación de páncreas. Los promotores específicos de páncreas de particular interés incluyen los promotores para insulina y factores de transcripción pancreáticos, es decir PDX- 1 endógeno. La activación del promotor se puede determinar mediante los métodos conocidos en la técnica, por ejemplo mediante ensayo de luciferasa, EMSA, o detección de expresión génica en la dirección 3'.

[00107] En algunas realizaciones, el fenotipo de células beta pancreáticas también se puede determinar mediante inducción de un perfil de expresión génica pancreático. "Perfil de expresión génica pancreático" significa: incluir la expresión de uno o más genes que son normalmente inactivos transcripcionalmente en

tejidos no endocrinos, es decir, un factor de transcripción pancreático, enzimas pancreáticas u hormonas pancreáticas. Las enzimas pancreáticas son, por ejemplo, PCSK2 (PC2 o prohormona convertasa), PC 1/3 (prohormona convertasa 1/3), glucoquinasa, 5 trasportador de glucosa 2 (GLUT-2). Los factores de transcripción específicos pancreáticos incluyen, por ejemplo, Nkx2.2, Nkx6.1, Pax-4, Pax-6, MafA, NeuroD1, NeuroG3, Ngn3, beta-2, ARX, BRAIN4 y Isl-1.

10 [00108] La inducción del perfil de expresión génica pancreática se puede detectar utilizando técnicas bien conocidas por un experto común en la técnica. Por ejemplo, se pueden detectar secuencias de ARN de hormona pancreática en, por ejemplo, análisis de hibridación northern blot, métodos de detección con 15 base en amplificación tales como reacción de la cadena de polimerasa con base en transcripción inversa o detección sistémica mediante análisis de chip de micromatriz. Alternativamente, la expresión también se puede medir a nivel de la proteína, es decir, al medir los niveles de los polipéptidos 20 codificados por el gen. En una realización específica la expresión génica PC1/3 o de proteína se puede determinar por su actividad en procesamiento de prohormonas para su forma madura activa. Dichos métodos se conocen bien en la técnica e incluyen, por ejemplo, inmunoensayos con base en anticuerpos a proteínas 25 codificadas por los genes, o HPLC de las prohormonas procesadas.

[00109] En algunas realizaciones, las células que exhiben un fenotipo de células beta maduro generado por los métodos descritos aquí puede represar por lo menos un gen o perfil de

expresión génica de la célula original. Por ejemplo, una célula hepática que se induce por exhibir un fenotipo de células beta maduro que puede represar por lo menos un gen específico hepático. Un experto en la técnica puede determinar fácilmente la  
5 expresión génica específica hepática de la célula original y las células producidas utilizando los métodos conocidos en la técnica, es decir medir los niveles de mRNA o los polipéptidos codificados por los genes. Luego de comparación, una reducción en la expresión génica específica hepática indicaría que ha ocurrido  
10 transdiferenciación.

[00110] *Métodos para Tratar un Trastorno Pancreático*

[00111] La presente invención describe métodos para uso en  
15 tratar, es decir, evitar o retrasar el inicio o aliviar un síntoma de un trastorno pancreático en un sujeto. Por ejemplo, el trastorno pancreático es un trastorno pancreático degenerativo. Los métodos descritos aquí son particularmente útiles para aquellos trastornos pancreáticos que son provocados por o  
20 resultan en una pérdida de células pancreáticas, por ejemplo, células beta islote, o una pérdida en la función de células pancreáticas.

[00112] Los trastornos pancreáticos degenerativos comunes  
25 incluyen, pero no se limitan a: diabetes (por ejemplo, tipo I, tipo II, o gestacional) y cáncer pancreático. Otros trastornos pancreáticos o trastornos relacionados con páncreas que se pueden tratar al utilizar los métodos descritos aquí son, por ejemplo,

hiperglucemia, pancreatitis, pseudoquistes pancreáticos o trauma pancreático provocado por lesión.

[00113] La diabetes es un trastorno metabólico encontrado en tres formas: tipo 1, tipo 2 y gestacional. Tipo 1, o IDDM, es una enfermedad autoinmunitario; el sistema inmunitario destruye las células beta que producen insulina en el páncreas, reduciendo o eliminando la capacidad del páncreas de producir insulina. Los pacientes con diabetes del tipo 1 deben tomar diariamente complementos de insulina para sostener la vida. Los Síntomas se desarrollan normalmente rápidamente e incluyen aumento de sed y orina, hambre crónica, pérdida de peso, visión borrosa y fatiga. La diabetes del tipo 2 es la más común, encontrada en 90 por ciento a 95 por ciento de enfermos de diabetes. Se asocia con edad avanzada, obesidad, historia familiar, diabetes gestacional previa, inactividad física y etnia. La diabetes gestacional ocurre solo en el embarazo. Las mujeres que desarrollan diabetes gestacional tienen 20 por ciento a 50 por ciento de cambio para desarrollar diabetes del tipo 2 dentro de cinco a 10 años.

20

[00114] Un sujeto que sufre de o está en riesgo de desarrollar diabetes se identifica por los métodos conocidos en la técnica tales como determinar los niveles de glucosa en sangre. Por ejemplo, un valor de glucosa en sangre por encima de 140 mg/dL en por lo menos dos ocasiones después de un ayuno nocturno significa que la persona tiene diabetes. Una persona que no sufre de o está en riesgo de desarrollar diabetes se caracteriza por tener niveles de azúcar en ayuno entre 70-110 mg/dL.

25

[00115] Los síntomas de diabetes incluyen fatiga, náusea, orina frecuente, sed excesiva, pérdida de peso, visión borrosa, infecciones frecuentes y curación lenta de heridas o úlceras, presión arterial consistentemente en o por encima de 140/90, colesterol HDL de menos de 35 mg/dL o triglicéridos más de 250 mg/dL, hiperglucemia, hipoglucemia, deficiencia o resistencia de insulina. Los pacientes diabéticos o prediabéticos a los que se les administra los compuestos se identifican utilizando métodos diagnósticos conocidos en la técnica.

10

[00116] La hiperglucemia es un trastorno relacionado con el páncreas en el que una cantidad excesiva de glucosa circula en el plasma en sangre. Esto de manera general es un nivel de glucosa mayor de (200 mg/dl). Un sujeto con hiperglucemia puede o no puede tener diabetes.

15

[00117] El cáncer pancreático es el cuarto cáncer más común en los Estados Unidos, ocurre principalmente en personas en edad de aproximadamente 60, y tiene tasa de supervivencia de cinco años menos que cualquier cáncer. El adenocarcinoma, el tipo más común de cáncer pancreático, ocurre en el recubrimiento del conducto pancreático; el cistadenocarcinoma y carcinoma acinar son los más raros. Sin embargo, los tumores benignos también crecen dentro del páncreas; estos incluyen un tumor de insulinooma que secreta insulina, gastrinooma, que secreta niveles normales a mayores de gastrina, y glucagonoma, un tumor que secreta glucagón.

20

25

[00118] El cáncer pancreático no tiene causas conocidas, sino diversos riesgos, que incluyen diabetes, fumar cigarrillos y pancreatitis crónica. Los síntomas pueden incluir dolor abdominal superior, apetito pobre, ictericia, pérdida de peso, indigestión, 5 nausea o vomito, diarrea, fatiga, comezón u órganos abdominales agrandados. El diagnóstico se hace utilizando ultrasonido, exploración de tomografía computarizada, formación de imágenes de resonancia magnética, ERCP, colangiografía transhepática percutánea, biopsia de páncreas o pruebas de sangre. El 10 tratamiento puede involucrar cirugía, terapia de radiación o quimioterapia, medicación para el dolor o comezón, preparaciones de enzimas orales o tratamiento de insulina.

[00119] La pancreatitis es la inflamación y autodigestión del 15 páncreas. En autodigestión, el páncreas es destruido por sus propias enzimas, lo que provoca inflamación. La pancreatitis aguda normalmente implica solo una única incidencia, después de lo cual el páncreas regresará a lo normal. La pancreatitis crónica, sin embargo, involucra el daño permanente al páncreas y 20 la función pancreática y puede conducir a fibrosis. Alternativamente, se puede resolver después de varios ataques. La pancreatitis es provocada más frecuentemente por cálculos biliares que provocan bloqueo del conducto pancreático o por abuso de alcohol, que puede provocar que se bloqueen los 25 conductos pancreáticos pequeños. Otras causas incluyen trauma abdominal o cirugía, infecciones, falla renal, lupus, fibrosis quística, un tumor o una picadura venosa de escorpión.

[00120] Los síntomas frecuentemente asociados con pancreatitis incluyen dolor abdominal, posiblemente que irradia a la espalda o pecho, náusea o vómito, pulso rápido, fiebre, hinchamiento abdominal superior, ascitis, reducción de la presión arterial o ictericia leve. Los síntomas se pueden atribuir a otras enfermedades antes de ser identificadas como asociadas con pancreatitis.

[00121] *Método para Tratar Trastornos Neurológicos*

10

[00122] La presente invención también proporciona métodos para tratar un sujeto con un trastorno o enfermedad neurológica, tal como un trastorno o enfermedad neurodegenerativa. La población de células descritas aquí es útil para tratar un sujeto con una enfermedad o trastorno neurológico que se caracteriza por pérdida de células neurales o la función neural, por medio de relleno de las células no funcionales o degeneradas. Las enfermedades neurodegenerativas que se pueden tratar utilizando los métodos descritos aquí incluyen, pero no se limitan a, enfermedad de Parkinson, trastornos Parkinsonianos, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Huntington, esclerosis amiotrófica lateral, enfermedad de cuerpo de Lewy, neurodegeneración relacionada con la edad, cánceres neurológicos, y trauma cerebral que resulta de cirugía, accidente, isquemia, o apoplejía. La población de células descrita aquí se puede diferenciar a una población neural de células con la función neural, y la población neural diferenciada de células se puede administrar a un sujeto con una enfermedad o trastorno neurológico.

25

[00123] *Composiciones Terapéuticas*

[00124] Los compuestos que inducen transdiferenciación descritos aquí, o factor ectópico de transcripción pancreático (es decir, PDX-1, Pax-4, MafA, NeuroD1 o polipéptido Sox-9s, ácidos ribonucleicos o ácidos nucleicos que codifican PDX-1, Pax-4, MafA, NeuroD1 o polipéptido Sox-9s), cuando se utilizan terapéuticamente, se denominan aquí como "Compuestos Terapéuticos". Los métodos para la administración de los compuestos terapéuticos incluyen, pero no se limitan a, rutas intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intranasal, epidural, y oral. Los Compuestos terapéuticos de la presente invención se pueden administrar mediante cualquier ruta conveniente, por ejemplo mediante infusión o inyección de bolo, mediante absorción a través de los recubrimientos epitelial o mucocutáneo (por ejemplo, mucosa oral, mucosa rectal e intestinal, etc.) y se pueden administrar juntos con otros agentes biológicamente activos. La administración puede ser sistémica o local. Adicionalmente, puede ser ventajoso administrar el Agente Terapéutico en el sistema nervioso central mediante cualquier ruta adecuada, que incluye inyección intraventricular e intratecal. La inyección intraventricular se puede facilitar mediante un catéter intraventricular unido a un depósito (por ejemplo, un depósito Ommaya). La administración pulmonar también se puede emplear mediante el uso de un inhalante o nebulizador, y formulación con un agente aerosolizante. También puede ser deseable administrar el compuesto terapéutico localmente en el área en necesidad de tratamiento; esto se puede lograr mediante, por ejemplo, y no por vía de limitación,

infusión local durante cirugía, aplicación tópica, mediante inyección, por medio de un catéter, por medio de un supositorio, o por medio de un implante. Se conocen diversos sistemas de suministro y se puede utilizar para administrar un Compuesto terapéutico de la presente invención que incluye, por ejemplo:

(i) encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas; (ii) células recombinantes capaces de expresar el Compuesto terapéutico; (iii) endocitosis mediada por el receptor (Véase, por ejemplo, Wu y Wu, 1987. J Biol Chem 262:4429-4432); (iv) construcción de un ácido nucleico Terapéutico como parte de un vector retrovílico, adenovílico u otro vector, y similares. En una realización de la presente invención, el Compuesto terapéutico se pueden suministrar en una vesícula, en particular una liposoma. En una liposoma, se combina la proteína de la presente invención, adicionalmente con otros portadores farmacéuticamente aceptables, con agentes anfipáticos tales como lípidos que existen en forma agregada como micelas, monocapas insolubles, cristales líquidos, o capas lamelares en solución acuosa. Los lípidos adecuados para formulación liposómica incluyen, sin limitación, monoglicéridos, diglicéridos, sulfatidas, lsolecitina, fosfolípidos, saponina, ácidos biliares, y similares. La preparación de dichas formulaciones liposómicas está dentro del nivel del experto en la técnica, como se describe, por ejemplo, en la Patente Estadounidense No. 4,837,028; y Patente Estadounidense No. 4,737,323, todas las cuales se incorporan aquí mediante referencia. En todavía otra realización, el Compuesto terapéutico se puede suministrar en un sistema de liberación controlada que incluye, por ejemplo: una bomba de suministro (Véase, por ejemplo, Saudek, et al., 1989.

New Engl J Med 321:574 y un material polimérico semipermeable (Véase, por ejemplo, Howard, et al, 1989. J Neurosurg 71: 105). Adicionalmente, el sistema de liberación controlada se puede poner en proximidad del objetivo terapéutico (por ejemplo, el cerebro), requiriendo de esta forma solo una fracción de la dosis sistémica. Véase, por ejemplo, Goodson, In: Medical Applications of Controlled Release 1984. (CRC Press, Boca Raton, Fla.).

[00125] En una realización específica de la presente invención, en donde el Compuesto terapéutico es un ácido nucleico que codifica una proteína, el ácido nucleico Terapéutico se puede administrar in vivo para promover la expresión de su proteína codificada, al construirla como parte de un vector de expresión de ácido nucleico apropiado y administrarlo con el propósito de que se vuelva intracelular (por ejemplo, mediante el uso de un vector retroviral, mediante inyección directa, mediante el uso de bombardeo de micropartículas, mediante recubrimiento con lípidos o receptores de superficie celular o agentes de transfección, o al administrarlo en enlace con el péptido similar a homeosecuencia que se conoce por entrar al núcleo (Véase, por ejemplo, Joliot, et al, 1991. Proc Natl Acad Sci USA 88: 1864-1868), y similares. Alternativamente, se puede introducir un ácido nucleico terapéutico intracelularmente y se incorpora dentro del ADN de la célula anfitriona para expresión, mediante recombinación homóloga o permanece episómico.

[00126] Preferiblemente, el compuesto terapéutico se administra intravenosamente. Específicamente, el compuesto terapéutico se puede suministrar por medio de una infusión de la vena cava.

[00127] Como se utiliza aquí, el término "cantidad terapéuticamente efectiva" significa la cantidad total de cada componente activo de la composición farmacéutica o método que es suficiente para mostrar beneficio significativo para el paciente, es decir, tratamiento, curación, prevención o alivio de la afección médica relevante, o un aumento en el índice de tratamiento, curación, prevención o alivio de dichas afecciones. Cuando se aplica a un ingrediente activo individual, se administra solo, el término se refiere a ese ingrediente solo. Cuando se aplica a una combinación, el término se refiere a cantidades combinadas de los ingredientes activos que resultan en el efecto del Compuesto terapéutico, si se administra en combinación, serialmente o simultáneamente.

[00128] La cantidad del compuesto terapéutico de la invención que será efectivo en el tratamiento de un trastorno o afección particular dependerá de la naturaleza del trastorno o afección, y se puede determinar mediante técnicas clínicas estándar por aquellos expertos comunes dentro de la técnica. Adicionalmente, los ensayos in vitro opcionalmente se pueden emplear para ayudar a identificar los rangos de dosificación óptima. La dosis precisa que se va a emplear en la formulación también dependerá de la ruta de administración, y la gravedad general de la enfermedad o trastorno, y se debe decidir de acuerdo con el juicio del médico y cada una de las circunstancias del paciente. Finalmente, el médico que atiende decidirá la cantidad de proteína de la presente invención con la cual se trata cada paciente individual. Inicialmente, el médico que atiende administrará bajas dosis de

proteína de la presente invención y observará la respuesta del paciente. Las dosis más grandes de la proteína de la presente invención se pueden administrar hasta que se obtiene el efecto terapéutico óptimo para el paciente, y en ese punto la dosificación no aumenta adicionalmente. Sin embargo, los rangos de dosificación adecuados para administración intravenosa de los Compuestos terapéuticos de la presente invención son de manera general por lo menos 1 millones de células transdiferenciadas, por lo menos 2 millones de células transdiferenciadas, por lo menos 5 millones de células transdiferenciadas, por lo menos 10 millones de células transdiferenciadas, por lo menos 25 millones de células transdiferenciadas, por lo menos 50 millones de células transdiferenciadas, por lo menos 100 millones de células transdiferenciadas, por lo menos 200 millones de células transdiferenciadas, por lo menos 300 millones de células transdiferenciadas, por lo menos 400 millones de células transdiferenciadas, por lo menos 500 millones de células transdiferenciadas, por lo menos 600 millones de células transdiferenciadas, por lo menos 700 millones de células transdiferenciadas, por lo menos 800 millones de células transdiferenciadas, por lo menos 900 millones de células transdiferenciadas, por lo menos 1 miles de millones células transdiferenciadas, por lo menos 2 miles de millones células transdiferenciadas, por lo menos 3 miles de millones células transdiferenciadas, por lo menos 4 miles de millones células transdiferenciadas, o por lo menos 5 miles de millones células transdiferenciadas. Preferiblemente, la dosis es 1-2 miles de millones células transdiferenciadas en un sujeto de 60-75 kg. Un experto en la técnica apreciaría que las dosis efectivas se

pueden extrapolar a partir de curvas de respuesta de dosis derivadas de sistemas de prueba de modelo de animal o in vitro.

[00129] La duración de la terapia intravenosa utilizando el  
5 Compuesto terapéutico de la presente invención variará,  
dependiendo de la severidad de la enfermedad que se va a tratar y  
la afección y respuesta idiosincrática potencial de cada paciente  
individual. Se contempla que la duración de cada aplicación de la  
proteína de la presente invención estará en el rango de 12 a 24  
10 horas de administración intravenosa continua. Finalmente el  
médico que atiende decidirá la duración apropiada de la terapia  
utilizando la composición farmacéutica de la presente invención.

[00130] Las células también se pueden cultivar ex vivo en la  
15 presencia de compuestos terapéuticos, ácidos nucleicos, o  
proteínas de la presente invención con el propósito de proliferar  
o producir un efecto deseado sobre o actividad en dichas células.  
Las células tratadas luego se pueden introducir in vivo por medio  
de las rutas de administración descritas aquí para propósitos  
20 terapéuticos.

[00131] *Vectores de Expresión Recombinante y Células Anfitrionas*

[00132] Otro aspecto de la invención pertenece a vectores,  
25 preferiblemente los vectores de expresión, que contienen un ácido  
nucleico que codifica una proteína PDX, Pax-4, NeuroD1 o MafA, u  
otro factor de transcripción pancreático, tal como Ngn3, o  
derivados, fragmentos, análogos, homólogos o combinaciones de los  
mismos. En algunas realizaciones, el vector de expresión

comprende un único ácido nucleico que codifica cualquiera de los siguientes factores de transcripción: PDX-1, Pax-4, NeuroD1, Ngn3, MafA, o Sox-9 o derivados o fragmentos de los mismos. En algunas realizaciones, el vector de expresión comprende dos ácidos nucleicos que codifican cualquier combinación de los siguientes factores de transcripción: PDX-1, Pax-4, NeuroD1, Ngn3, MafA, o Sox-9 o derivados o fragmentos de los mismos. En una realización preferida, el vector de expresión contiene ácidos nucleicos que codifican PDX-1 y NeuroD1.

10 [00133] Como se utiliza aquí, el término "vector" se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que se ha ligado. Un tipo de vector es un "plásmido", que se refiere a un bucle de ADN lineal o de hebra doble en el que se pueden ligar los segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector vírico, en donde se pueden ligar segmentos de ADN adicionales en el genoma vírico. Determinados vectores son capaces de replicación autónoma en una célula anfitriona en la que se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen bacteriano de replicación y vectores de mamífero episómicos). Otros vectores (por ejemplo, vectores de mamífero no episómicos) se integran dentro del genoma de una célula anfitriona luego de introducción en la célula anfitriona, y por lo tanto se replican a lo largo del genoma anfitrión. Más aún, determinados vectores son capaces de dirigir la expresión de genes a los que se ligan operativamente. Dichos vectores se denominan aquí como "vectores de expresión". En general, los vectores de expresión de utilidad en técnicas de ADN recombinante están frecuentemente en la forma de plásmidos. En la presente

especificación, se puede utilizar intercambiablemente el "plásmido" y "vector" cuando el plásmido es la forma más comúnmente utilizada de vector. Sin embargo, la invención pretende incluir dichas otras formas de los vectores de expresión, tal como vectores víricos (por ejemplo, retrovirus defectuosos de replicación, lentivirus, adenovirus y virus adeno asociados), que sirven como funciones equivalentes. Adicionalmente, algunos vectores víricos son capaces de dirigir los tipos particulares de células específicamente o no específicamente.

[00134] Los vectores de expresión recombinante de la invención comprenden un ácido nucleico de la invención en una forma adecuada para la expresión del ácido nucleico en una célula anfitriona, lo que significa que los vectores de expresión recombinante incluyen una o más secuencias reguladoras, seleccionadas sobre la base de las células anfitrionas que se van a utilizar para expresión, que se liga operativamente a la secuencia de ácidos nucleicos que se va a expresar. Dentro de un vector de expresión recombinante, "ligado operablemente" pretende significar que la secuencia de nucleótidos de interés se liga a las secuencias reguladoras en una forma que permite la expresión de la secuencia de nucleótidos (por ejemplo, en un sistema de transcripción/traducción in vitro o en una célula anfitriona cuando el vector se introduce dentro de la célula anfitriona). El término "secuencia reguladora" pretende incluir promotores, mejoradores y otros elementos de control de expresión (por ejemplo, señales de poliadenilación). Dichas secuencias reguladoras se describen, por ejemplo, en Goeddel; GENE

EXPRESSION TECHNOLOGY: METHODS IN ENZYMOLOGY 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990). Las secuencias reguladoras incluyen aquellas que dirigen la expresión constitutiva de una secuencia de nucleótidos en muchos tipos de células anfitrionas y aquellas  
5 que dirigen la expresión de la secuencia de nucleótidos solo en determinadas células anfitriona (por ejemplo, secuencias reguladoras específicas de tejido). Se apreciará por aquellos expertos en la técnica que el diseño del vector de expresión puede depender de dichos factores como la elección de la célula  
10 anfitriona que se va a transformar, el nivel de expresión de la proteína deseada, etc. Los vectores de expresión de la invención se pueden introducir en células anfitrionas para producir por lo tanto proteínas o péptidos, que incluyen proteínas de fusión o péptidos, se codifican por ácidos nucleicos como se describe aquí  
15 (por ejemplo, proteínas PDX-1, Pax-4, MafA, NeuroD1 o Sox-9, o formas mutantes o proteínas de fusión de los mismos, etc.).

[00135] Por ejemplo, un vector de expresión comprende un ácido nucleico que codifica un factor de transcripción ligado  
20 operablemente a un promotor. En los vectores de expresión que comprenden dos ácidos nucleicos que codifican los factores de transcripción, cada ácido nucleico se puede ligar operablemente a un promotor. El promotor ligado operablemente a cada ácido nucleico puede ser igual o diferente. Alternativamente, los dos  
25 ácidos nucleicos se pueden ligar operablemente a un único promotor. Los promotores útiles para los vectores de expresión de la invención pueden ser cualquier promotor conocido en la técnica. El experto común puede determinar fácilmente los promotores adecuados para la célula anfitriona en la que el ácido

nucleico se expresa, el nivel de expresión de la proteína deseada, o el tiempo de expresión, etc. El promotor puede ser un promotor constitutivo, un promotor inducible, o un promotor específico de tipo celular.

5

[00136] Los vectores de expresión recombinante de la invención se pueden diseñar para la expresión de PDX-1 en células procarióticas o eucarióticas. Por ejemplo, se puede expresar PDX-1, Pax-4, MafA, NeuroD1, y/o Sox-9 en células bacterianas tal  
10 como E. coli, células de insecto (utilizando vectores de expresión de baculovirus), células de levadura o células de mamífero. Las células anfitrionas adecuadas se discuten adicionalmente en Goeddel, GENE EXPRESSION TECHNOLOGY: METHODS IN ENZYMOLOGY 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990).  
15 Alternativamente, el vector de expresión recombinante se puede transcribir y traducir in vitro, por ejemplo utilizando las secuencias reguladoras del promotor T7 y polimerasa T7.

[00137] La expresión de las proteínas en procariotes se lleva a  
20 cabo más frecuentemente en E. coli con vectores que contienen los promotores constitutivos o inducibles que dirigen la expresión de las proteínas de fusión o no fusión. Los vectores de fusión agregan una serie de aminoácidos a una proteína codificada allí, usualmente en el terminal amino de la proteína recombinante.  
25 Dichos vectores de fusión sirven normalmente para tres propósitos: (1) aumentar la expresión de la proteína recombinante; (2) aumentar la solubilidad de la proteína recombinante; y (3) ayudar en la purificación de la proteína recombinante al actuar como un ligando en purificación de

afinidad. Frecuentemente, en vectores de expresión de fusión, se introduce un sitio de división proteolítico en la unión de la unidad estructural de fusión y la proteína recombinante para permitir la separación de la proteína recombinante de la unidad

5    estructural de fusión para purificación de la proteína de fusión. Dichas enzimas, y sus secuencias de reconocimiento cognato, incluyen el Factor Xa, trombina y enteroquinasa. Los vectores de expresión de fusión típicos incluyen pGEX (Pharmacia Biotech Inc; Smith and Johnson (1988) Gene 67:31-40), pMAL (New England

10    Biolabs, Beverly, Mass.) y pRIT5 (Pharmacia, Piscataway, N.J.) que fusionan glutatona S-transferasa (GST), proteína de unión a maltosa E, o proteína A, respectivamente, para la proteína recombinante objetivo.

15    [00138] Ejemplos de los vectores de expresión E. coli de no fusión inducibles adecuados incluyen pTrc (Amrann et al., (1988) Gene 69:301-315) y pET1 Id (Studier et al, GENE EXPRESSION TECHNOLOGY: METHODS IN ENZYMOLOGY 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990) 60-89).

20    [00139] Una estrategia para maximizar la expresión de la proteína recombinante en E. coli es expresar la proteína en la bacteria anfitriona con una capacidad deteriorada para dividir proteolíticamente la proteína recombinante. Véase, Gottesman,

25    GENE EXPRESSION TECHNOLOGY: METHODS IN ENZYMOLOGY 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990) 119-128. Otra estrategia es alterar la secuencia de ácidos nucleicos del ácido nucleico que se va a insertar dentro del un vector de expresión de tal manera que los codones individuales para cada aminoácido son aquellos

utilizados preferiblemente en *E. coli* (Wada et al, (1992) *Nucleic acids Res.* 20:211 1-2118). Dicha alteración de las secuencias de ácidos nucleicos de la invención se puede llevar a cabo mediante técnica de síntesis de ADN estándar.

5

[00140] En otra realización, el vector de expresión PDX-1, Pax-4, MafA, NeuroD1, o Sox-9 es un vector de expresión de levadura. Ejemplos de vectores para la expresión en levadura *S. cerevisiae* incluyen pYepSec1 (Baldari, et al., (1987) *EMBO J* 6:229-234),  
 10 pMFa (Kujan y Herskowitz, (1982) *Cell* 30:933-943), pJRY88 (Schultz et al, (1987) *Gene* 54: 113-123), pYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, Calif), y picZ (InVitrogen Corp, San Diego, Calif).

15 [00141] Alternativamente, se puede expresar PDX-1, Pax-4, MafA, NeuroD1 o Sox-9 en células de insecto utilizando vectores de expresión de baculovirus. Los vectores de baculovirus disponibles para la expresión de las proteínas en las células de insecto cultivadas (por ejemplo, células SF9) incluyen la serie pAc  
 20 (Smith et al. (1983) *Mol Cell Biol* 3:2156-2165) y la serie pVL (Lucklow and Summers (1989) *Virology* 170:31-39).

[00142] En todavía otra realización, un ácido nucleico de la invención se expresa en células de mamífero utilizando un vector  
 25 de expresión de mamífero. Ejemplos de vectores de expresión de mamífero incluyen pCDM8 (Seed (1987) *Nature* 329:840) y pMT2PC (Kaufman et al. (1987) *EMBO J* 6: 187-195). Cuando se utiliza en células de mamífero, la función del control del vector de expresión se proporciona frecuentemente mediante elementos

reguladores víricos. Por ejemplo, los promotores comúnmente utilizados se derivan de polio, Adenovirus 2, citomegalovirus y Virus del Simio 40. Para otros sistemas de expresión adecuados para las células procarióticas y eucarióticas. Véase, por ejemplo, Chapters 16 y 17 de 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.

[00143] En otra realización, el vector de expresión de mamífero recombinante es capaz de dirigir la expresión del ácido nucleico preferiblemente en un tipo de célula particular (por ejemplo, se utilizan elementos reguladores específicos de tejido para expresar el ácido nucleico). Se conocen en la técnica elementos reguladores específicos de tejido. Los ejemplos no limitantes de promotores específicos de tejido adecuados incluyen el promotor de albúmina (específico de hígado; Pinkert et al. (1987) Genes Dev 1:268-277), promotores específicos linfoides (Calame and Eaton (1988) Adv Immunol 43:235-275), en particular promotores de receptores de células T (Winoto and Baltimore (1989) EMBO J 8:729-733) e inmunoglobulinas (Banerji et al. (1983) Cell 33:729-740; Queen and Baltimore (1983) Cell 33:741-748), promotores específicos de neuronas (por ejemplo, el promotor de neurofilamento; Byrne and Ruddle (1989) PNAS 86:5473-5477), promotores específicos de páncreas (Edlund et al. (1985) Science 230:912-916), y promotores específicos de glándula mamaria (por ejemplo, promotor de suero lácteo; Patente Estadounidense No. 4,873,316 y Publicación de Solicitud Europea No. 264,166). También se abarcan los promotores regulados en forma desarrollada, por ejemplo, los promotores hox de murino (Kessel

and Gruss (1990) Science 249:374-379) y el promotor de alfa-fetoproteína (Campes and Tilghman (1989) Genes Dev 3:537-546).

[00144] La invención proporciona adicionalmente un vector de  
5 expresión recombinante que comprende una molécula de ADN de la  
invención clonada en el vector de expresión en una orientación  
anticodificante. Es decir, la molécula de ADN se liga  
operativamente a una secuencia reguladora en una forma que  
permite la expresión (mediante transcripción de la molécula de  
10 ADN) de una molécula de ARN que es anticodificante para mRNA PDX.  
Las secuencias reguladoras ligada operativamente a un ácido  
nucleico clonado en la orientación anticodificante se puede  
seleccionar que dirige la expresión continua de la molécula de  
ARN anticodificante en una variedad de tipos de células, por  
15 ejemplo promotores víricos y/o mejoradores, o se pueden  
seleccionar secuencias reguladoras que dirigen la expresión  
constitutiva, específica de tejido o tipo de célula de ARN  
anticodificante. El vector de expresión anticodificante puede  
estar en la forma de un plásmido recombinante, fagémido o virus  
20 atenuado en el que los ácidos nucleicos anticodificantes se  
producen bajo el control de una región reguladora de alta  
eficiencia, cuya actividad se puede determinar por el tipo de  
célula en la que se introduce el vector. Para una discusión de la  
regulación de la expresión génica utilizando genes  
25 anticodificantes véase Weintraub et al., "Antisense RNA as a  
molecular tool for genetic analysis," Reviews- Trends in  
Genetics, Vol. 1(1) 1986.

[00145] Otro aspecto de la invención pertenece a células anfitrionas en los que se ha introducido un vector de expresión recombinante de la invención. Los términos "célula anfitriona" y "célula anfitriona recombinante" se utilizan intercambiabilmente aquí. Se entiende que dichos términos se refieren solo a la célula objeto particular pero también a la progenie o progenie potencial de dicha célula. Debido a que pueden ocurrir determinadas modificaciones en generaciones venideras debido a mutación o influencias ambientales, dicha progenie, de hecho, no puede ser idéntica a la célula progenitora, pero también se incluye dentro del alcance del término como se utiliza aquí. Adicionalmente, las células anfitrionas se pueden modular una vez se expresan PDX-1, Pax-4, MafA, NeuroD1 o Sox-9 o una combinación de los mismos, y puede mantener o perder características originales.

[00146] Una célula anfitriona puede ser cualquier célula procariótico o eucariótica. Por ejemplo, se puede expresar la proteína PDX-1, Pax-4, MafA, NeuroD1 o Sox-9 en células bacterianas tal como E. coli, células insectos, células de levadura o mamífero (tal como células de ovario de hámster Chino (CHO) o células COS). Alternativamente, una célula anfitriona puede ser una célula de mamífero premadura, es decir, blastocito pluripotente. Una célula anfitriona también se puede derivar de otro tejido humano. Se conocen otras células anfitrionas adecuadas por aquellos expertos en la técnica.

[00147] Se puede introducir el ADN de vector en células procarióticas o eucarióticas por medio de técnicas de

transformación convencional, transducción, infección o transfección. Como se utiliza aquí, los términos "transformación", "transducción", "infección" y "transfección" pretenden referirse a una variedad de técnicas reconocida en el arte para introducir ácido nucleico externo (por ejemplo, ADN) en una célula anfitriona, que incluye coprecipitación de cloruro de calcio o fosfato de calcio, transfección mediada por dextrano DEAE, lipofección, o electroporación. Adicionalmente la transfección puede estar mediada por un agente de transfección.

"Agente de transfección" significa que incluye cualquier compuesto que media la incorporación de ADN en la célula anfitriona, por ejemplo, liposoma. Los métodos adecuados para transformar o transfectar las células anfitrionas se puede encontrar en 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), y otros manuales de laboratorio.

[00148] La transfección puede ser "estable" (es decir integración de ADN externo en la genoma anfitrión) o "transitoria" (es decir, el ADN se expresa episómicamente en las células anfitrionas).

[00149] Para transfección estable de células de mamífero, se sabe que, dependiendo del vector de expresión y la técnica de transfección utilizada, solo se puede integrar una fracción pequeña de células al ADN externo dentro de su genoma del resto del ADN que permanece episómico. Con el propósito de identificar y seleccionar estos integrantes, un marcador seleccionable que codifica un gen (por ejemplo, resistencia a antibióticos) se

introduce de manera general en las células anfitrionas junto con el gen de interés. Diversos marcadores seleccionables incluyen aquellos que confieren resistencia a los fármacos, tales como G418, higromicina y metotrexato. El ácido nucleico que codifica un marcador seleccionable se puede introducir en una célula anfitriona sobre el mismo vector que aquel que codifica PDX o se puede introducir en un vector separado. Las células transfectadas establemente con el ácido nucleico introducido se pueden identificar mediante selección del fármaco (por ejemplo, células que han incorporado el gen marcador seleccionable que sobrevivirá, mientras que las otras células mueren). En otra realización las células moduladas por PDX o las células transfectadas se identifican mediante la inducción de la expresión de un gen marcador endógeno. En una realización específica, el promotor es el promotor de insulina que dirige la expresión de la proteína fluorescente verde (GFP).

[00150] En una realización el ácido nucleico PDX-1, Pax-4, MafA, NeuroD1, o Sox-9 está presente en un vector vírico. En una realización, los ácidos nucleicos PDX-1 y NeuroD1 están presentes en el mismo vector vírico. En otra realización el ácido nucleico PDX-1, Pax-4, MafA, NeuroD1, o Sox-9 se encapsula en un virus. En otra realización, el PDX-1 y NeuroD1 se encapsula en un virus (es decir, los ácidos nucleicos que codifican PDX-1 y NeuroD1 se encapsulan en la misma partícula de virus). En algunas realizaciones el virus preferiblemente infecta las células pluripotentes de diversos tipos de tejido, por ejemplo blastocitos hematopoyéticos blastocitos neuronales, blastocitos hepáticos o blastocitos embriónicos, preferiblemente el virus es

hepatotrópico. "Hepatotrópico" significa que el virus tiene la capacidad de dirigir preferiblemente las células del hígado ya sea específicamente o no específicamente. En realizaciones adicionales el virus es un virus de hepatitis modulado, virus SV-  
5 40, o Epstein-Bar. En todavía otra realización, el virus es un adenovirus.

[00151] *Terapia Génica*

10 [00152] En un aspecto de la invención un ácido nucleico o ácidos nucleicos que codifican un polipéptido PDX- 1, Pax-4, MafA, NeuroD1, o Sox-9 o una combinación de los mismos, o los derivados funcionales de los mismos, se administran por medio de terapia  
15 génica. La terapia génica se refiere a terapia que se realiza por la administración de un ácido nucleico específico a un sujeto. En este aspecto de la invención, el ácido nucleico produce su péptido codificado, que luego sirve para ejercer un efecto terapéutico al modular la función de una enfermedad o trastorno mencionado anteriormente, por ejemplo, diabetes. Cualquiera de  
20 las metodologías que se relacionan con terapia génica disponible dentro de la técnica se puede utilizar en la práctica de la presente invención. Véase por ejemplo, Goldspiel, et al, 1993. Clin Pharm 12: 488-505.

25 [00153] En una realización preferida, el compuesto terapéutico comprende un ácido nucleico que hace parte de un vector de expresión que expresan una cualquiera o más de los polipéptidos PDX-1, Pax-4, MafA, NeuroD1, y/o polipéptidos Sox-9, o fragmentos, derivados o análogos de los mismos mencionados

anteriormente, dentro de un anfitrión adecuado. En una realización específica, dicho ácido nucleico posee un promotor que se liga operablemente a las regiones codificantes de un polipéptido PDX-1, Pax-4, MafA, NeuroD1 y polipéptido Sox-9. El  
5 promotor puede ser inducible o constitutivo, y, opcionalmente, específico de tejido. El promotor puede tener, por ejemplo, origen vírico o de mamífero. En otra realización específica, se utiliza una molécula de ácido nucleico en la que las secuencias codificantes (y cualesquiera otras secuencias deseadas) se  
10 flanquean por regiones que promueven la recombinación homóloga en un sitio deseado dentro del genoma, de esta forma proporcionar expresión intra cromosómica de ácidos nucleicos. Véase por ejemplo, Koller and Smithies, 1989. Proc Natl Acad Sci USA 86: 8932-8935. En todavía otra realización el ácido nucleico que se  
15 suministra permanece episómico e induce un gen endógeno y de otra forma inactivo.

[00154] El suministro del ácido nucleico terapéutico en un paciente puede ser directo (es decir, el paciente se expone  
20 directamente al ácido nucleico o vector que contiene el ácido nucleico) o indirecto (es decir, las células primero se ponen en contacto con el ácido nucleico in vitro, luego se trasplanta en el paciente). Se desconocen estos dos métodos, respectivamente, como terapia génica in vivo o ex vivo. En una realización  
25 específica de la presente invención, un ácido nucleico se administra directamente in vivo, en donde se expresa para producir el producto codificado. Esto se puede llevar a cabo mediante cualquiera de los numerosos métodos conocidos en la técnica que incluyen, pero no se limitan a, que constituyen dicho

ácido nucleico como parte de un vector de expresión de ácido nucleico apropiado y se administra de la misma forma de tal manera que se vuelve intracelular (por ejemplo, mediante infección utilizando un vector retrovílico atenuado o defectuoso u otro vector vírico; véase Patente Estadounidense No. 4,980,286); se inyecta directamente ADN desnudo; utilizando bombardeo de micropartículas (por ejemplo, un "Gene Gun.RTM.; Biolistic, DuPont); se recubren dichos ácidos nucleicos con lípidos; utilizando receptores de superficie celular/agentes de transfección asociados; encapsulados en liposomas, micropartículas, o microcápsulas; administrarlos en unión a un péptido que se conoce por entrar al núcleo; o al administrarlos en unión a un ligando predispuesto a endocitosis mediada por receptor (véase, por ejemplo, Wu and Wu, 1987. J Biol Chem 262: 4429-4432), que se puede utilizar para "dirigir" los tipos de células que específicamente expresan los receptores de interés, etc.

[00155] Un método adicional para terapia génica en la práctica de la presente invención implica transferir un gen en la células en cultivo de tejido in vitro mediante dichos métodos como electroporación, lipofección, transfección mediada por fosfato de calcio, infección vírica, o similares. De manera general, la metodología de transferencia incluye la transferencia concomitante de un marcador seleccionable para las células. Las células luego se ponen bajo presión de selección (por ejemplo, resistencia antibiótica) con el propósito de facilitar el aislamiento de aquellas células que se han tomado, y que expresan, el gen transferido. Aquellas células luego se

suministran a un paciente. En una realización específica, ante de la administración in vivo de la célula recombinante resultante, el ácido nucleico se introduce en una célula mediante cualquier método conocido dentro de la técnica que incluye, pero no se limita a: transfección, electroporación, microinyección, infección con un vector vírico o bacteriófago que contiene las secuencias de ácidos nucleicos de interés, fusión de célula, transferencia génica mediada por cromosoma, transferencia génica mediada por microcélula, fusión de esferoplasto, y metodologías similares que aseguran las funciones fisiológicas y de desarrollo necesarias de las células receptoras no se interrumpen por la transferencia. Véase por ejemplo, Loeffler and Behr, 1993. Meth Enzymol 217: 599-618. La técnica seleccionada debe proporcionar la transferencia estable del ácido nucleico a la célula, de tal manera que el ácido nucleico se puede expresar por la célula. Preferiblemente, dicho ácido nucleico transferido es heredable y se puede expresar por la progenie de la célula. En una realización alternativa, el ácido nucleico transferido permanece episómico e induce de otra forma la expresión del ácido nucleico endógeno inactivo.

[00156] En realizaciones preferidas de la presente invención, las células recombinantes resultantes se pueden suministrar a un paciente mediante diversos métodos conocidos dentro de la técnica que incluyen, pero no se limitan a, inyección de células epiteliales (por ejemplo, subcutáneamente), aplicación de células de piel recombinantes como un injerto de piel en el paciente, e inyección intravenosa de células de sangre recombinantes (por ejemplo, células progenitoras o blastocitos hematopoyéticos) o

células hepáticas. La cantidad total de células que se prevén para uso dependen del efecto del efecto deseado, estado del paciente, y similares, y se puede determinar por un experto dentro de la técnica.

5

[00157] Las células en las que se puede introducir un ácido nucleico para propósitos de terapia génica abarca cualquier tipo de célula disponible, deseada, y puede ser xenogénico, heterogénico, singénico, o autogénico. Los tipos de células incluyen, pero no se limitan a, células diferenciadas tales como células epiteliales, células endoteliales, queratinocitos, fibroblastos, músculo células, hepatocitos y glóbulos, o diversos blastocito o células progenitoras, en particular células de músculo cardíaco embriónico, blastocitos hepáticos (Publicación de Patente Internacional WO 94/08598), blastocitos neurales (Stemple and yerson, 1992, Cell 71 : 973-985), blastocitos hematopoyéticos o células progenitoras, por ejemplo, como se obtiene a partir de médula ósea, sangre de cordón umbilical, sangre periférica, hígado fetal, y similares. En una realización preferida, las células utilizadas para terapia génica son autólogas para el paciente.

[00158] El ADN para terapia génica se puede administrar a pacientes parenteralmente, por ejemplo, intravenosamente, subcutáneamente, intramuscularmente, e intraperitonealmente. El ADN o un agente de inducción se administran en un portador farmacéuticamente aceptable, es decir, un vehículo biológicamente compatible que es adecuado para administración a un animal por ejemplo, solución salina fisiológica. Una cantidad

terapéuticamente efectiva es una cantidad que es capaz de producir un resultado médicamente deseable, por ejemplo, un aumento de un gen pancreático en un animal tratado. Dicha cantidad se puede determinar por un experto común en la técnica.

5 Como se conoce bien en las técnicas médicas, la dosificación para un paciente dado depende de muchos factores, que incluyen el tamaño del paciente, área de superficie corporal, edad, el compuesto particular que se administra, sexo, tiempo y la ruta de administración, salud general, y otros fármacos que se  
10 administran concurrentemente. Las dosificaciones pueden variar, pero una dosificación preferida para administración intravenosa de ADN es aproximadamente  $10^6$  a  $10^{22}$  copias de la molécula de ADN. Por ejemplo el ADN se administra a aproximadamente  $2 \times 10^{12}$  viriones por Kg.

15

[00159] *Composiciones Farmacéuticas*

[00160] Los compuestos, por ejemplo, polipéptidos PDX-1, Pax-4, MafA, NeuroD1, o Sox-9, ácidos nucleicos que codifican el  
20 polipéptido PDX-1, Pax-4, MafA, NeuroD1, o Sox-9, o un ácido nucleico o compuesto que aumenta la expresión de un ácido nucleico que codifica el polipéptido PDX-1, Pax-4, MafA, NeuroD1, o Sox-9 (también denominado aquí como "compuestos activos") de la invención, y derivados, fragmentos, análogos y homólogos de los  
25 mismos, se pueden incorporar en composiciones farmacéuticas adecuadas para administración. Dichas composiciones normalmente comprenden la molécula de ácido nucleico, o proteína, y un portador farmacéuticamente aceptable. Como se utiliza aquí, "portador farmacéuticamente aceptable" pretende incluir

cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes de retraso de absorción e isotónicos, y similares, compatibles con administración farmacéutica. Los portadores adecuados se describen en la edición más reciente de Remington's Pharmaceutical Sciences, un texto de referencia estándar en el campo, que se incorpora aquí mediante referencia. Ejemplos preferidos de dichos portadores o diluyentes incluyen, pero no se limitan a, agua, solución salina, soluciones de Ringer, solución de dextrosa, y 5% de albúmina de suero humano. También se pueden utilizar liposomas y vehículos no acuosos tales como aceites fijos. El uso de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas se conocen bien en la técnica. Excepto en la medida que cualquier medio convencional o agente sea incompatible con el compuesto activo, se contempla el uso de los mismos en las composiciones. También se pueden incorporar compuestos activos complementarios en las composiciones.

[00161] Se formula una composición farmacéutica de la invención para que sea compatible con su ruta pretendida de administración. Ejemplos de las rutas de administración incluyen administración parenteral, por ejemplo, intravenosa, intradérmica, subcutánea, oral (por ejemplo, inhalación), transdérmica (tópica), transmucosal, y rectal. Las soluciones o suspensiones utilizadas para aplicación parenteral, intradérmica, o subcutánea puede incluir los siguientes componentes: un diluyente estéril tal como agua para inyección, solución salina, aceites fijos, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros disolventes sintéticos; agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico

o metil parabenos; antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito de sodio; agentes quelantes tales como ácido etilenodiaminetetraacético; reguladores tales como acetatos, citratos o fosfatos, y agentes para el ajuste de tonicidad tal como cloruro de sodio o dextrosa. El pH se puede ajustar con ácidos o bases, tales como ácido clorhídrico o hidróxido de sodio. La preparación parenteral se puede encerrar en ampollas, jeringas desechables o frascos de múltiples dosis hechos de vidrio o plástico.

10

[00162] Las composiciones farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones acuosas estériles (en donde sean solubles en agua) o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de dispersión o solución inyectables estériles. Para administración intravenosa, los portadores adecuados incluyen solución salina fisiológica, agua bacteriostática, Cremofor EL.TM. (BASF, Parsippany, N.J.) o solución salina regulada con fosfato (PBS). En todos los casos, la composición puede ser estéril y debe ser fluida al grado que existe fácil para inyección. Puede ser estable bajo las condiciones de fabricación y almacenamiento y se puede conservar contra la acción de contaminante de los microorganismos tales como bacterias y hongos. El portador puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol líquido, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez apropiada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula deseado en el caso de dispersión y

15

20

25

mediante el uso de tensoactivos. La prevención de la acción de microorganismos se puede lograr mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal, y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol, cloruro de sodio en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede interrumpir aproximadamente al incluir en la composición un agente que retrasa la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

[00163] Las soluciones inyectables estériles se pueden preparar al incorporar el compuesto activo en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con una o una combinación de ingredientes enumerados anteriormente, como se requiera, seguido por esterilización filtrada. De manera general, se preparan dispersiones al incorporar el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de aquellos enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación son secado por vacío y secado por congelamiento que produce un polvo de ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional de una solución filtrada previamente estéril.

[00164] Las composiciones orales de manera general incluyen un diluyente inerte o un portador comestible. Esto se puede encerrar en cápsulas de gelatina o comprimir en comprimidos. Para el

propósito de administración terapéutica oral, el compuesto activo se puede incorporar con excipientes y utilizar en la forma de comprimidos, lozenges, o cápsulas. Las composiciones orales también se pueden preparar utilizando un portador de fluidos para uso como un enjuague bucal, en donde el compuesto en el portador de fluidos se aplica oralmente y se mastica y se expectora o se traga. Los agentes de aglutinación farmacéuticamente compatibles, y/o los materiales adyuvantes se pueden incluir como parte de la composición. Los comprimidos, píldoras, cápsulas, trociscos y similares pueden contener cualquiera de los siguientes ingredientes, o compuestos de una naturaleza similar: un aglutinante tal como celulosa microcristalina, goma tragacanto o gelatina; un excipiente tal como almidón o lactosa, un agente desintegrante tal como ácido algínico, Primogel, o almidón de maíz; un lubricante tal como estearato de magnesio o Esterotes; un deslizante tal como dióxido de sílice coloidal; un agente endulzante tal como sacarosa o sacarina; o un agente saborizante tal como menta, metil salicilato, o sabor a naranja.

[00165] La administración sistémica también puede ser por medio transmucosal o transdérmico. Para administración transmucosal o transdérmica, los penetrantes apropiados para la barrera que se va a permear se utilizan en la formulación. Dichos penetrantes se conocen de manera general en la técnica, e incluyen, por ejemplo, administración transmucosal, detergentes, sales biliares, y derivados de ácido fusídico. La administración transmucosal se puede llevar a cabo a través del uso de rociadores nasales o supositorios. Para administración transdérmica, los compuestos

activos se formulan en ungüentos, pomadas, geles, o cremas como se conoce de manera general en la técnica.

[00166] En una realización, los compuestos activos se preparan con portadores que protegerán el compuesto contra eliminación rápida del cuerpo, tal como una formulación de liberación controlada, que incluye implantes y sistemas de suministro microencapsulados. Se pueden utilizar polímeros biodegradables, biocompatibles, tales como etilen vinil acetato, polianhidridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres, y ácido poliláctico. Los métodos para preparación de dichas formulaciones serán evidentes para aquellos expertos en la técnica. Los materiales también se pueden obtener comercialmente de Alza Corporation y Nova Pharmaceuticals, Inc. Las suspensiones liposómicas (que incluyen liposomas dirigidos a células infectadas con anticuerpos monoclonales a antígenos víricos) también se pueden utilizar como portadores farmacéuticamente aceptables. Estos se pueden preparar de acuerdo con métodos conocidos por aquellos expertos en la técnica, por ejemplo, como se describe en la Patente Estadounidense No. 4,522,81 1, se incorpora completamente aquí mediante referencia.

[00167] Es especialmente ventajoso formular composiciones orales o parenterales en forma de dosificación unitaria para facilidad de administración y uniformidad de dosificación. La forma de dosificación unitaria como se utiliza aquí se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para el sujeto que se va a tratar; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para

producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el portador farmacéutico requerido. La especificación para las formas de dosificación unitaria de la invención se dicta mediante y directamente dependiente de las únicas características del compuesto activo y el efecto terapéutico particular que se va a lograr.

[00168] Las moléculas de ácido nucleico de la invención se puede insertar en vectores y utilizar como vectores de terapia génica.

Los vectores de terapia génica se pueden suministrar a un sujeto mediante cualquiera de una serie de rutas, por ejemplo, como se describe en la Patente Estadounidense No. 5,703,055. El suministro de esta forma también puede incluir, por ejemplo, inyección intravenosa, administración local (véase Patente Estadounidense No. 5,328,470) o inyección estereotáctica (véase por ejemplo, Chen et al. (1994) PNAS 91:3054-3057). La preparación farmacéutica de la terapia génica vector puede incluir el vector de terapia génica en un diluyente aceptable, o puede comprender una matriz de liberación lenta en la que se incorpora el vehículo de suministro de gen. Alternativamente, cuando el vector suministrado de gen completo se puede producir intacto de células recombinantes, por ejemplo, vectores retrovíricos, la preparación farmacéutica puede incluir una o más células que producen el sistema de suministro de gen.

[00169] Las composiciones farmacéuticas se pueden incluir en un recipiente, paquete, o dispensador junto con instrucciones para administración.

[00170] Cabe entender que la presente invención no se limita a metodologías particulares, protocolos y reactivos, y ejemplos descritos aquí. La terminología y ejemplos utilizados aquí son para el propósito de describir solo realizaciones particulares, para intención y propósito de proporcionar directriz al experto, y no pretende limitar el alcance de la presente invención.

## EJEMPLOS

### 10 [00171] **EJEMPLO 1: MÉTODOS GENERALES**

[00172] *Células Hepáticas Humanas*

[00173] Se obtienen tejidos hepáticos humanos de adulto de individuos de 3-23 años de edad o mayores. Los tejidos hepáticos se utilizan con la aprobación del Comité en Investigaciones Clínicas (la junta de revisión institucional). El aislamiento de células hepáticas humanas se realiza como se describe (Sapir et al, 2005; Meivar-Levy et al, 2007). Las células se cultivan en medio esencial mínimo de Dulbecco (1 g/l de glucosa) complementado con 10% de suero de becerro fetal, 100 unidades/ml de penicilina; 100 ng/ml de estreptomicina; 250 ng/ml de anfotericina B (Biological Industries, Beit Haemek, Israel), y se mantienen a 37°C en una atmósfera humidificada de 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de aire.

[00174] *Infección Vírica*

[00175] Los adenovirus utilizados en este estudio son como sigue:  
 Ad-CMV-Pdx-1 (Sapir et al, 2005; Meivar-Levy et al, 2007), Ad-  
 RIP-luciferasa (Seijffers et al, 1999), Ad-CMV- $\beta$ - $\beta\alpha$ I, Ad-CMV-MafA  
 (un gentil obsequio de Newgard, C.B., Duke University), Ad-CMV-  
 5 Pax4-IRES-GFP (un gentil obsequio de St Onge, L. DeveloGen AG,  
 G5ttingen, Alemania), y Ad-CMV-Is11 (un gentil obsequio de  
 Kieffer, T. University de British Columbia, Vancouver, Canadá).  
 Las partículas víricas se generan por el protocolo estándar (He  
 et al, 1998).

10

[00176] Las células hepáticas se infectan con adenovirus  
 recombinantes durante 5-6 días (Tabla 1) complementado con EGF  
 (20 ng/ml; Cytolab, Ltd., Israel) y nicotinamida (10 mM; Sigma).  
 La multiplicidad óptima de de infección (MOI) se determina de  
 15 acuerdo con la supervivencia de la célula (<75%) y inducción de  
 la secreción del péptido C. El MOI de los virus utilizados son;  
 Ad-CMV-Pdx-1 (1000 MOI), Ad-CMV-Pax4-IRES-GFP (100 MOI), Ad-CMV-  
 MAf-A (10 MOI) y Ad-CMV-Is11 (100 MOI).

20 [00177] Aislamiento de ARN, reacciones RT y RT-PCR

[00178] El ARN se aísla y se prepara cADN y se amplifica, como se  
 describió previamente (Ber et al, 2003; Sapir et al, 2005). El  
 RT-PCR de tiempo real cuantitativo se realiza utilizando el  
 25 sistema de Detección de secuencia plus de una etapa ABI (Applied  
 Biosystems, CA, USA), como se describió previamente (Sapir et al,  
 2005; Meivar-Levy et al, 2007; Aviv et al, 2009).

[00179] Detección de secreción de insulina y péptido C

[00180] Se miden la secreción de insulina y péptido C mediante incubaciones estáticas de cultivos primarios de células hepáticas adultas 6 días después de la exposición inicial a tratamiento vírico, como se describe (Sapir et al, 2005; Meivar-Levy et al, 2007; Aviv et al, 2009). La secreción del péptido C regulada por glucosa se mide a 2 mM y 17.5 mM de glucosa, que se determina mediante análisis dependiente de dosis para inducir máximamente la secreción de insulina de células transdiferenciadas hepáticas, sin que tenga efectos adversos en la función de células tratadas (Sapir et al, 2005; Meivar-Levy et al, 2007; Aviv et al, 2009). La secreción del péptido C se detecta mediante radioinmunoensayo utilizando el equipo de radioinmunoensayo de péptido C humano (Linco Research, St. Charles, MO; < 4% de reactividad cruzada para proinsulina humana). Se detecta de la secreción de insulina mediante radioinmunoensayo utilizando equipo de radioinmunoensayo de insulina humana (DPC, Angeles, CA; 32% de reactividad cruzada para proinsulina humana). La secreción se normaliza en la proteína celular total medida por un equipo de ensayo de proteína Bio-Rad.

[00181] *Ensayo de Luciferasa*

[00182] Se coninfectan células hepáticas humanas con Ad-RIF'-luciferasa (200moi) y los diversos adenoviruses (como se describe adelante). Seis días después, la actividad de luciferasa se mide utilizando el Ensayo del Sistema de Luciferasa (Promega) y el Luminómetro LKB 1250 (LKB, Finlandia). Los resultados se

normalizan para la proteína celular total medido mediante el equipo de Ensayo de Proteína Bio-Rad (Bio-Rad).

[00183] Inmunofluorescencia

5

[00184] Las células hepáticas humanas tratada con los diversos adenovirus, se ponen en placas en portaobjetos de vidrio en placas de cultivo de 12 pozos ( $2 \times 10^5$  células/pozo). 3-4 días después, las células se fijan y se tiñen como se describe (Sapir  
 10 et al, 2005; Meivar-Levy et al, 2007; Aviv et al, 2009). Los anticuerpos utilizados en este estudio son: PDX-1 de anticonejo, PDX-1 de anticabra (ambos 1 : 1000 de un gentil obsequio de C.V. E. Wrigth), insulina anti-humana, somatostatina anti -humana (ambos 1 : 100, Dako, Glostrup, Dinamarca), anti-Pax4 (1 : 100;  
 15 R&D Systems, Minneapolis, MN), anti-MafA (1 : 160; Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA). Los anticuerpos secundarios utilizados son: anticuerpo 1 :250 conjugado con Cianuro IgG anticonejo (cy2), anticuerpo 1 :250 conjugado con indocarbocianuro IgG anticonejo (cy3), anticuerpo 1 :200  
 20 conjugado con cianuro IgG anticabra (cy2), anticuerpo 1 :250 indocarbocianuro IgG anticabra (cy3), y anticuerpo 1 :250 conjugado con indocarbocianuro IgG antiratón (cy3) (todos de Jackson ImmunoResearch, PA). Finalmente, las células se tiñen con  
 4', 6-diamidino-2-fenil-indol (DAPI, Sigma). Se toman imágenes de  
 25 portaobjetos y se analizan utilizando un microscopio fluorescente (Provis, Olympus).

[00185] *Análisis Estadístico*

[00186] Se realizan análisis estadísticos con una prueba de Student de dos muestras asumiendo varianzas no iguales.

[00187] **EJEMPLO 2: TRANSDIFERENCIACIÓN INDUCIDO POR PDX-1**

5

[00188] Los estudios previos (Sapir et al, 2005; Meivar-Levy et al, 2007; Aviv et al, 2009; Gefen-Halevi et al, 2010; Meivar-Levy et al, 2011) han sugerido que solo Pdx-1 es capaz de inducir el fenotipo similar a célula  $\beta$  y la función en células hepáticas humanas, posiblemente debido a su capacidad de activar numerosos pTF endógeno de otra forma inactivos en hígado. La activación del linaje pancreático es rápida y ocurre dentro de 5 días (Sapir et al, 2005, Ber et al, 2003).

10

15

[00189] En este ejemplo, se examina la secuencia de eventos que media la transdiferenciación de hígado a páncreas inducida por Pdx-1. Los vectores adenovíricos que codifican Pdx-1 se introducen en células hepáticas humanas adultas, y los efectos de la expresión ectópica de Pdx-1 se supervisan durante días consecutivos post infección (Días 2-5; Figura 1). La expresión del factor de transcripción específico de páncreas y hormona pancreática se determina mediante análisis RT-PCR cuantitativo cada día durante 5 días. Los resultados se normalizan para expresión génica de  $\beta$ -actina dentro de la misma muestra de cADN y se presentan como la media  $\pm$  EE de la expresión relativa versus virus de control (Ad-CMV-frgal, 1000 MOI) de células tratadas el mismo día. Se realizaron dos experimentos independientes, con  $n \geq 4$ , \* $p < 0,05$  y \*\*  $p < 0,01$ .

20

25

[00190] Los genes de glucagón y somatostatina se activan inmediatamente, dentro de un día después de infección Ad-Pdx-1 (Figura 1C y ID). Sin embargo, la expresión de insulina solo se detecta en el cuarto a quinto día postinfección (Figura 1A). Para proporcionar una explicación mecánica para la activación temporal distinta de las tres hormonas pancreáticas principales, los niveles de expresión de los factores de transcripción activados endógenamente se analizan durante el proceso de transdiferenciación. Se activan inmediatamente los factores de transcripción endocrinos pancreáticos tempranos, NGN3 y NEUROD1. Sin embargo, los TF específicos de células  $\beta$ , tales como NKX6.1 y MafA, solo se activan gradual y modestamente en respuesta a la expresión ectópica de Pdx-1, que alcanza su nivel de expresión pico en el cuarto y quinto día, respectivamente. La activación de la expresión génica de insulina en el quinto día se asocia no solo con un aumento en la expresión de MafA sino también con una reducción en la expresión de Isl1 (Figura ID). Estos datos sugieren que la transdiferenciación de células hepáticas humanas a lo largo del linaje pancreático, a pesar de ser rápida, es un proceso gradual y consecutivo. La activación temporal distinta de la expresión génica de la hormona pancreática (tal como somatostatina y glucagón) se puede atribuir parcialmente al curso de tiempo y los niveles relativos de la expresión de los pTF endógenamente activos.

[00191] **EJEMPLO 3: EXPRESIÓN COMBINADA DE PDX-1, PAX4 y MAFA AUMENTA LA EFICIENCIA DE TRANSDIFERENCIACIÓN DEL HÍGADO AL**

[00192] Los estudios previos han sugerido que la expresión relacionada de diversos pTF aumenta la eficiencia de transdiferenciación a lo largo del linaje de células  $\beta$ , comparado con aquel inducido por pTF individuales (Kaneto et al, 2005; Tang et al, 2006; Song et al, 2007; Wang et al, 2007; Gefen-Halevi et al, 2010), así como también a lo largo de otros linajes. Con el propósito de analizar este concepto en el sistema experimental de cultivos de células hepáticas humanas primarias descrito aquí, se investigan la contribución individual y conjunta de los tres pTF principales en transdiferenciación de hígado a páncreas. El Pdx-1, Pax4 y MafA, que median diferentes etapas en la organogenia del páncreas, se coexpresan ectópicamente en cultivos primarios de células hepáticas humanas adultas utilizando adenovirus recombinantes. Las células hepáticas humanas de adulto cultivadas se infectan con Ad-CMV-Pdx-1 (1000 MOI), Ad-CMV-Pax-4 (100 MOI) y Ad-CMV-MafA (10 MOI) solas o en conjunto o con el virus de control (Ad-CMV-fi-gal, 1000 MOI), y se examinan los marcadores pancreáticos de diferenciación seis días después. La multiplicidad de infección (MOI) de cada factor se titula por resultar en eficiencia de reprogramación máxima asociada por efectos adversos mínimos en viabilidad de células infectadas. Se expresa Pdx-1 en 70% de las células en el cultivo, y la coexpresión conjunta de todos los 3 pTF es evidente en 46,8 % de las células positivas Pdx-1 (Figura 2A). Muy pocas células se tiñen positivas solo para Pax-4 o para MafA. Las células que se tiñen positivas para todos los tres pTF se indican por las flechas (Figura 2A, panel derecho). En la Figura 2B, las células hepáticas se coinfectan con los pTF combinados y con Ad-RIP-LUC

(200 moi), y se mide la actividad de Luciferasa del promotor de insulina.

[00193] La expresión combinada de los tres pTF resulta en un  
 5 aumento sustancial en la activación del promotor de insulina  
 (Figura 2B), un aumento de tres veces en el número de células que  
 producen (pro)insulina (Figura 2C) y aumento de 30-60% en  
 secreción de (pro)insulina regulada por glucosa (Figura 2D),  
 comparado con aquella inducida por cada uno de los pTF solos.  
 10 Tomados juntos, estos resultados sugieren que la combinación de  
 los 3 pTF aumenta la eficiencia de transdiferenciación y también  
 indica que cada uno de los factores se limita en su capacidad o  
 es insuficiente para promover individualmente la  
 transdiferenciación máxima (Kaneto et al, 2005; Tang et al, 2006;  
 15 Zhou et al, 2008).

[00194] **EJEMPLO 4: MADURACIÓN Y SEGREGACIÓN EN LAS DIFERENTES  
 CÉLULAS DE CÉLULAS TRANSDIFERENCIADAS QUE PRODUCEN HORMONAS SE  
 CONTROLA TEMPORALMENTE EN UNA FORMA JERÁRQUICA**

20

[00195] En este ejemplo, el impacto de controlar temporalmente la  
 expresión ectópica de los pTF se investiga para determinar si se  
 aumenta eficiencia de transdiferenciación mediante expresión  
 ectópica combinada de los tres pTF también se controla  
 25 temporalmente como se sugirió anteriormente (Figura 2). En el  
 soporte del control temporal que tiene una función de  
 transdiferenciación del páncreas, se sabe que los tres pTF Pdx-1,  
 Pax4, y MafA exhiben expresión temporal distinta y la función  
 durante organogenia del páncreas.

[00196] Los tres pTF Pdx-1, Pax4, y MafA se introducen secuencialmente o en conjunto con cultivos primarios de células hepáticas humanas de adulto utilizando adenovirus recombinantes.

5 La expresión génica ectópica mediada por adenovirus alcanza un pico 17 horas post infección (Varda-Bloom et al, 2001). Por lo tanto, los pTF se administran secuencialmente durante tres días consecutivos (véase infección vírica en el Ejemplo 1), permitiendo la manifestación de sus efectos individuales. Las

10 células se infectan de acuerdo con el esquema como se visualiza en la Tabla 1.

Tabla 1.

| Orden de tratamiento | Día 1                              | Día 2   | Día 3    | Día 4 | Día 5 | Día 6   |
|----------------------|------------------------------------|---------|----------|-------|-------|---------|
| A                    | Ad-β-gal<br>(control)              |         |          |       |       | Cosecha |
| B                    | Ad-Pdx-1<br>+ Ad-Pax4<br>+ Ad-MafA |         |          |       |       | Cosecha |
| C                    | Ad-Pdx-1                           | Ad-Pax4 | Ad-Mafa  |       |       | Cosecha |
| D                    | Ad-MafA                            | Ad-Pax4 | Ad-Pdx-1 |       |       | Cosecha |
| E                    | Ad-Pdx 1                           | Ad-Mafa | Ad-Pax4  |       |       | Cosecha |

15 [00197] Las células se infectan secuencialmente con una construcción adenovírica de pTF por día durante tres días en tres secuencias diferentes: un orden jerárquico directo (tratamiento C= Pdx-1→Pax4→MafA), en un orden opuesto (tratamiento D=MafA→Pax4→Pdx-1), y en un orden aleatorio (tratamiento E=Pdx-

20 1→MafA→Pax4). El efecto de la administración de los pTF

secuenciales en la eficiencia de transdiferenciación y en la maduración similar a célula  $\beta$  se compara con aquella de la administración conjunta o simultánea de todos los tres pTF en el primer día (tratamiento B= Pdx-1+Pax4+MafA) y al MOI de virus de control similar (tratamiento A = $\beta$ -gal) (Tabla 1 y Figura 3A). Específicamente, las células hepáticas humanas de adulto cultivadas se infectan con Ad-CMV-Pdx-1(1000 MOI), Ad-CMV-Pax-4 (100 MOI) y Ad-CMV-MafA (10 MOI) juntas o en una forma secuencial como se resume en la Figura 3A y Tabla 1 (tratamientos B-E) o con el virus de control (Ad-CMV-fi-gal, 1000 moi, tratamiento A), y se analizan para su diferenciación pancreática seis días después.

[00198] La actividad del promotor de insulina (Figura 4A), el porcentaje de células que producen insulina (Figura 3B) y secreción de (pro)insulina regulada por glucosa (Figura 3C) no se afectan por el orden de los pTF administrados secuencialmente. De forma interesante, la administración pTF secuencial en el orden aleatorio (tratamiento E= Pdx-1→MafA→Pax4) resulta en aumento de la actividad de promotor de insulina pero se asocia con pérdida de regulación de glucosa de secreción de insulina y reducción de la expresión del transportador de glucosa 2 (GLUT-2) (Figura 3B, 3C y 4B). La pérdida de capacidad de detección de glucosa luego de cambiar el orden de la administración de Pax4 y MafA sugiere un efecto potencial de la secuencia de los pTF expresados en maduración similar a células  $\beta$  pero no en la eficiencia del proceso de transdiferenciación.

[00199] **EJEMPLO 5: ADMINISTRACIÓN JERÁRQUICA DE PDX-1, PAX4, Y MAFA PROMUEVE LA MADURACIÓN DE CÉLULAS TRANSDIFERENCIADAS A CÉLULAS SIMILARES A  $\beta$**

5 [00200] Los resultados previos alientan adicionalmente la investigación para determinar a qué grado y bajo qué condiciones el aumento de eficiencia de transdiferenciación se asocia con maduración mejorada a lo largo del linaje de células  $\beta$ . Las características distintivas de células  $\beta$  maduras son la capacidad  
 10 de procesar la proinsulina y secretarla en una forma regulada por glucosa (Eberhard et al, 2009; Borowiak, 2010). Para analizar si los cambios temporales en la expresión de pTF afectan en forma distinta la maduración de célula trans diferenciada a lo largo del linaje de células  $\beta$ , el efecto de los tratamientos A-E  
 15 distintos (Tabla 1 y Figura 3A) en procesamiento de proinsulina y se analiza la secreción del péptido C regulada por glucosa.

[00201] De hecho, solo la administración jerárquica directa (tratamiento C) de los pTF resulta en producción pronunciada de  
 20 la insulina procesada y su secreción regulada por glucosa que exhibe características de respuesta de dosis de glucosa fisiológica (Figuras 3C y 5A). El fenotipo nuevamente adquirido y la función son estables, como se demuestra por la capacidad para secretar el péptido c en una forma regulada con glucosa durante  
 25 hasta cuatro semanas in vitro (Figuras 5A y 5B).

[00202] El aumento del procesamiento de prohormona solo luego de los pTF jerárquicos directos (tratamiento C) se asocia con aumento pronunciado en la expresión génica de PCSK2 y GLUT2, que

posee las funcione en el procesamiento de prohormona y las capacidades de detección de glucosa, respectivamente (Figuras 3 y 4). Estos datos sugieren una función obligatoria para la expresión secuencial y jerárquica directa de los pTF en promover la maduración y la función de las células hepáticas transdiferenciadas a lo largo del linaje de células  $\beta$ . La administración de TF conjunta (tratamiento B) y secuencial en un modo jerárquico indirecto (tratamiento D y E), falla en generar células transdiferenciadas que exhiben características similares a células  $\beta$  maduras.

[00203] Para proporcionar una explicación mecánica para los cambios en el estado similar de células  $\beta$  de maduración se analiza el repertorio de los pTF endógenamente activados bajo los tratamientos temporales distintos (B-E). Todos los tratamientos (B-E) resultan en aumento en la expresión de numerosos pTF endógenos (Figura 3E), tales como NEUROG3, NEUROD1, NKX6.1 y NKX2.2. Sin embargo, la diferencia más robusta entre los fenotipos "maduro" (tratamiento C) e "inmaduro" (tratamientos B, E y D) se exhibe en niveles de la expresión endógena del gen *Isl1*. De esta forma, la maduración más mejorada a lo largo del linaje de células  $\beta$  se induce por la administración de pTF jerárquicos directos (tratamiento C) se correlaciona con una reducción dramática en la expresión endógena de *Isl1* (Figura 3E, flecha). Tomados juntos estos datos sugieren que la maduración de las células transdiferenciadas en células  $\beta$  se puede afectar por los niveles de expresión relativos y temporales de los pTF específicos.

[00204] **EJEMPLO 6: ADMINISTRACIÓN JERÁRQUICA DE PDX-1, PAX4, Y MAFA PROMUEVE LA SEGREGACIÓN DE CÉLULAS TRANSDIFERENCIADAS ENTRE CÉLULAS SIMILARES A  $\beta$  Y SIMILARES A  $\delta$**

5 [00205] La exclusión de MafA del tratamiento C (Tabla 1) induce la expresión del gen Isl-1 (Fig 6D) y somatostatina (Figura 8D). Para analizar si el aumento de la expresión de Isl-1 luego de exclusión de MafA de hecho provoca aumento de expresión del gen Somatostatina, se agrega Ad-CMV-Isl-1 junto con MafA en el tercer

10 día (tratamiento C, en la tabla 1). De hecho, el aumento de la expresión génica de somatostatina Isl-1 (Figura 6E). La expresión ectópica Isl-1 (C+Isl-1) provoca también aumento de la producción de proteína de Somatostatina (Figura 6F) y su coproducción en células que producen insulina (Figura 9, panel inferior), lo que

15 sugiere que la alta expresión de MafA asociada por la baja expresión de Isl-1 es crucial para segregar entre células que producen insulina y somatostatina.

[00206]

20

[00207] **EJEMPLO 7: ANÁLISIS DE LA CONTRIBUCIÓN INDIVIDUAL DE PDX-1, PAX4, Y MAFA PARA TRANSDIFERENCIACIÓN DE HÍGADO A PÁNCREAS**

[00208] Las características secuenciales del proceso de

25 transdiferenciación se identifican mediante ganancia temporal de los estudios de función. Adicionalmente el análisis de la contribución separada de cada uno de los factores de transcripción, Pdx-1, Pax4 y MafA, para el proceso de desarrollo jerárquico se realiza mediante un método de "función reducida"

relativa y temporal. Las células hepáticas humanas de adulto se tratan por el protocolo de reprogramación temporal y secuencial directo (tratamiento C), del cual se omite uno de los pTF ectópicos. El pTF omitido se reemplaza por un adenovirus de control que lleva la expresión  $\beta$ -gal en una multiplicidad similar de infección. Específicamente, se tratan células hepáticas humanas de adulto por orden de infección secuencial "jerárquico" directo (tratamiento C, Figura 3A y Tabla 1). Se omite un único factor de transcripción (pTF) en un momento y se reemplaza por el moi idéntico de Ad-CMV-fi-gal. La omisión de Pdx-1 se indica como (C-Pdx-1), la omisión Pax4 se indica como (C-Pax4), y la omisión MafA se indica como (C-MafA).

[00209] Las consecuencias funcionales de omitir en forma separada cada una de las expresiones de los pTF se analizan a niveles molecular y funcional (Figura 6). El Pdx-1 separado y la omisión de MafA (C-Pdx-1 y C-MafA, respectivamente) resulta en reducción de la activación del promotor de insulina (Figura 6A), la respuesta de glucosa de ablación de la secreción de insulina procesada (Figura 6B) y la expresión reducida de GLUT2 y GK (Figura 6C). La exclusión de MafA se asocia también con la expresión reducida de la prohormona convertasa, PCSK2 (Figura 6C). De otra parte, la exclusión de Pax4 (C-Pax4) no afecta significativamente la activación del promotor de insulina, ni tampoco afecta la secreción del péptido C regulada por glucosa. La omisión de Pax-4 se asocia con la expresión reducida de GLUT2 y PCSK2 (Figura 6C), lo que sugiere posiblemente que la expresión de GK es suficiente para obtener la capacidad de control de glucosa de la secreción de la hormona.

[00210] El análisis de las consecuencias de la exclusión pTF temporal y separada en el repertorio de la expresión pTF endógenamente activada se realiza para explicar estas alteraciones de desarrollo. La exclusión de Pdx-1 y Pax4 provoca una reducción marcada en la expresión de la mayoría de otros pTF (que incluye NeuroG3, NKX2.2, NKX6.2, y Pax6), lo que sugiere que su contribución potencial para aumentar la eficiencia de transdiferenciación se relaciona con su capacidad de activar los TF pancreáticos endógenos (Figura 6D). De otra parte, la exclusión de MafA no contribuye a la activación adicional de la expresión endógena de pTF, lo que refleja posiblemente su expresión tardía y restringida solo en células  $\beta$  pancreáticas. Por el contrario, la contribución de MafA para aumentar la actividad del promotor de insulina, el procesamiento de prohormona y su secreción regulada por glucosa se asocia solo con la expresión reducida de Isl-1 (Figura 6D). Estos datos pueden sugerir que MafA no está implicado en promover adicionalmente la eficiencia de la expresión endógena de los pTF y la transdiferenciación de hígado a páncreas, pero a diferencia de promover la maduración de células transdiferenciadas.

#### **EJEMPLO 8: ISL-1 EVITA LA MADURACIÓN DE CÉLULAS TRANSDIFERENCIADAS PARA LINAJE DE CÉLULAS $\beta$**

[00211] El efecto de MafA en maduración similar a células  $\beta$  puede estar en parte asociado con su capacidad de reprimir la expresión de Isl1. Para probar esta hipótesis, el Isl1 ectópico se introduce por infección adenovírica (Ad-Isl1) en células

transdiferenciadas. En resumen, se tratan células hepáticas humanas de adulto por orden de infección secuencial "jerárquico" directo (tratamiento C) y se complementa por Ad-Is11(1 o 100 MOI) en el tercer día (C+Is11).

5

[00212] Como se indicó anteriormente, la administración secuencial de los tres pTF en una forma jerárquica directa (tratamiento C) resulta en aumento de la eficiencia de transdiferenciación y la maduración de las células nuevamente generadas a lo largo del linaje de células  $\beta$ . El Is11 se administra conjuntamente con MafA en el tercer día (C+Is11). De hecho, la sobreexpresión de Is11 en el tercer día, bajo el control de un promotor heterólogo, que resulta en reducción sustancial de la expresión génica de insulina y ablación de la secreción de (pro)insulina regulada con glucosa (Figura 7). La pérdida de capacidad de detección de glucosa se asocia con la expresión disminuida de GLUT2 (Figura 7C). Estos resultados sugieren que la expresión desregulada de Is11 en las etapas finales del protocolo de transdiferenciación obstaculiza potencialmente la maduración a lo largo del linaje de células  $\beta$ , y puede representar en parte la maduración de ablación bajo la baja expresión de MafA.

[00213] Tomados juntos, estos datos sugieren una función obligatoria crucial para la expresión jerárquica directa de los pTF en promover la maduración de las célula hepáticas transdiferenciadas a lo largo del linaje de células  $\beta$ . Más aún, el proceso de desarrollo secuencial se asocia con activación y represión de los pTF que puede promover u obstaculizar la

25

maduración de la célula transdiferenciada a lo largo del linaje de células  $\beta$  pancreáticas.

[00214] **EJEMPLO 9: ADMINISTRACIÓN JERÁRQUICA DE PDX-1, PAX4 y**

**5 MAFA INDUCE LA EXPRESIÓN DE GLUCAGÓN y SOMATOSTATINA**

[00215] La transdiferenciación a lo largo del linaje pancreático endocrino resulta en la activación de la expresión de numerosas hormonas pancreáticas. También se investiga el grado con el cual  
 10 estos niveles de expresión de hormonas se afectan por la manipulación temporal de los pTF. La expresión génica de hormonas pancreáticas glucagón (GCG) (Figuras 8A y 8B), somatostatina (SST) (Figuras 8A, 8D, y 8E) o factores de transcripción  
 15 análisis PCR en tiempo real cuantitativo después de los tratamientos indicados.

[00216] La transcripción de los genes de glucagón (GCG) y somatostatina (SST) se induce mediante cada uno de los pTF  
 20 individualmente expresados, principalmente por Pdx-1 y MafA y a un grado menor por Pax4 (Figura 8A). Un aumento adicional en la transcripción génica de glucagón solo ocurre luego de la administración jerárquica directa de los pTF (Figura 4A, véase  
 tratamiento C). El Pdx-1 y MafA ejercen sus efectos en la  
 25 expresión de glucagón en un proceso con la activación de los factores de transcripción específicos de célula  $\alpha$  ARX y BRAI 4 o ARX solo, respectivamente (Figura 8C). La expresión génica de somatostatina que permanece no afectada por la mayoría de  
 tratamientos (Figuras 8A y 8D), aumenta cuando el protocolo

temporal concluye por la expresión ectópica de Pax4 (E=Pdx-1→MafA→Pax4). Este protocolo secuencial también exhibe un efecto de deterioro en la secreción de (pro)insulina regulada por glucosa y se asocia por aumento de la expresión endógena de Isl1 (Figura 3C y E). La maduración de ablación a lo largo del linaje de células  $\beta$  se asocia con aumento de la expresión génica de somatostatina y un aumento en el número de células positivas de somatostatina (Figura 8F). Muchas de las células exhiben colocalización de somatostatina e insulina (datos no mostrados).

10

[00217] La exclusión de cada pTF de la administración jerárquica (tratamiento C) como se discute en el Ejemplo 6 también se utiliza para investigar adicionalmente la función de los pTF individuales en la expresión de glucagón y somatostatina (Figuras 8B y 8D). La exclusión de Pax4 reduce sustancialmente la expresión génica de somatostatina, lo que sugiere su función potencial en inducir la transcripción de este gen (Figura 8D). De forma interesante, la exclusión de MafA al final del proceso de desarrollo también aumenta sustancialmente la expresión génica de somatostatina, lo que sugiere un efecto inhibidor potencial de MafA en la expresión génica de somatostatina. A este efecto también se le puede atribuir la capacidad del MafA de reprimir la expresión de Isl1. Para superar esta hipótesis, se analiza el efecto de Isl1 ectópico en la expresión génica de somatostatina. De hecho, la administración de Ad-Isl1 en el tercer día junto con MafA (C+Isl1) aumenta la expresión génica de somatostatina (Figura 8E), mientras e reduce la expresión génica de insulina, la producción de hormonas y secreción (Figuras 8A, 8B y Figura 7). Bajo estas condiciones experimentales, 40% de las células que

15

20

25

producen insulina se tiñen positivas para somatostatina con muy pocas células que expresan solo somatostatina.

[00218] Estos resultados sugieren que parte de la maduración de células transdiferenciadas a células  $\beta$  se atribuye a la expresión de MafA en las últimas etapas del proceso de transdiferenciación. En esta etapa, el MafA restringe la expresión de somatostatina en un proceso asociado con su capacidad de inhibir la expresión de Isl1.

10

[00219] La Figura 9 muestra el mecanismo propuesto de transdiferenciación de hígado a páncreas inducido por el factor de transcripción pancreático. Cada uno de los pTF es capaz de activar un fenotipo modesto similar a células  $\beta$ , en un número restringido de células hepáticas humanas. La expresión conjunta de los pTF aumenta marcadamente la transdiferenciación endocrina del hígado al páncreas. Sin embargo las células nuevamente generadas son inmaduras y coexpresan la insulina y somatostatina. Solo la administración secuencial de los mismos factores en una forma jerárquica directa aumenta la eficiencia de transdiferenciación y también la maduración de células transdiferenciadas a lo largo del linaje de células  $\beta$ .

20

#### [00220] **EJEMPLO 10: IDENTIFICACIÓN DE LA POBLACIÓN DE CÉLULAS CON CAPACIDAD DE TRANSDIFERENCIACIÓN IN VIVO**

25

[00221] La población de células con capacidad de transdiferenciación se identifica in vivo en ratones. La expresión ectópica del gen Pdx-1 se logra en hígados de ratones.

A pesar de la expresión uniforme del gen ectópico Pdx-1 en aproximadamente 40-50% de las células de hígado (Figura 10A) (Ferber et al, Nat Med. 2000, y Ber et al., JBC, 2003) que producen insulina (IPC) en ratones tratados con Pdx- 1 in vivo se ubican principalmente cerca a las venas centrales (Figura 10B), que se caracteriza por señalización Wnt activa y la expresión de sintetasa glutamina (GS) (Figura 1C). La colocalización de la expresión GS y la activación de insulina mediante Pdx-1 también indican que aquellas células que pueden activar el GSRE tienen una predisposición para aumentar la capacidad de transdiferenciación. Por lo tanto, la población de células predispuestas a transdiferenciación también se puede identificar mediante activación de GSRE y la ruta de señalización activa Wnt.

#### **[00222] EJEMPLO 10: USO DE ADENOVIRUS PARA IDENTIFICAR CÉLULAS HEPÁTICAS HUMANAS PREDISPUESITAS A TRANSDIFERENCIACIÓN**

[00223] Este ejemplo demuestra el uso de adenovirus recombinantes para identificar células hepáticas humanas que están predispuestas a transdiferenciación. Las células hepáticas humanas en el cultivo son heterogéneas con respecto a la activación de la ruta de señalización intracelular Wnt y la expresión de GS. Como el GS se expresa únicamente en las células hepáticas pericentrales, por lo tanto la capacidad de activar GSRE (Elemento Regulador GS) se puede utilizar como un parámetro selectivo de aislamiento de células relevantes (Gebhardt et al., Prog Histochem Cytochem, 2007; Gebhardt et al, Methods Mol Biol, 1998; y Gaunitz et al., Hepatology, 2005).

[00224] Adicionalmente como el GSRE también contiene un elemento aglutinante STAT3, la predisposición de las células para transdiferenciación puede estar mediada por este elemento. La ruta STAT3 también puede estar implicada en la dotación de las células con predisposición de reprogramación o transdiferenciación (figuras 10, 11, 14 y 19).

[00225] Ejemplo 11: **GSRE dirige repetitivamente 13-15% de las células hepáticas humanas en el cultivo.** El GSRE incluye los elementos de aglutinación TCF/LEF y STAT5 (Figura 11). Se han generado dos adenovirus recombinantes que llevan la expresión del gen eGFP o genes Pdx-1 bajo el control de GSRE (Figura 11) ligado operativamente a un promotor TK mínimo (Figura 11). Estos adenovirus conducen la expresión de Pdx-1 (Figura 12A) o eGFP (Figura 12B). Ambas proteínas se expresan repetitivamente en aproximadamente 13-15% de las células hepáticas humanas en el cultivo que sugiere el objetivo de una población específica de células hepáticas.

[00226] Ejemplo 12: **GSRE que induce PDX-1 es más eficiente que el CMV dirigido en PDX- 1 en la producción de insulina activante en células hepáticas.** A pesar de la expresión repetitiva de GSRE induce PDX-1 solo en aproximadamente 13±2% de las células en la capacidad de transdiferenciación de cultivo es similar o mayor que aquella inducida por Ad-CMV-Pdx-1, que dirige la expresión de Pdx-1 en 60-80% de las células en el cultivo (Figura 13). Las células que activan GSRE no pueden representar la mayoría de capacidad de transdiferenciación de las células hepáticas humanas de adulto completas en el cultivo. La producción de insulina

ocurre en 25% de células positivas Pdx-1 luego de tratamiento Ad-GSRE-Pdx-1 comparado con 1% de las células tratadas con Ad-CMV-Pdx-1.

5    [00227]    **EJEMPLO 13: UTILIZANDO LENTIVIRUS PARA MARCAR PERMANENTEMENTE LAS CÉLULAS GSRE+ MEDIANTE EGFP**

[00228] Se realiza seguimiento de linaje permanente utilizando construcciones de Lentivirus. El seguimiento de linaje in vitro  
10 para actividad GSRE se realiza mediante un sistema de lentivirus dual modificado recientemente utilizado para trazar la expresión de KRT5 en queratinocitos (Mauda-Havakuk, et al, PLoS One, 2011) o albúmina (Meivar-Levy et al., J Transplant, 2011) en células hepáticas. Este sistema de lentivirus (una colaboración con Prof.  
15 P. Ravassard de Universite Pierre et Marie Curie Paris, Francia; Figura 12A) incluye el marcador CMV-loxP-DsRed2-loxP-eGFP (R/G) (Meivar-Levy et al, J Transplan, 2011; Mauda-Havakuk et al, PLoS One, 2011; y Russ et al, Diabetes, 2008) y un vector lentivírico adicional lleva la expresión de recombinasa Cre bajo el control  
20 de GSRE y un promotor TK mínimo (contribuido generosamente por Prof. Gaunitz, (Gebhardt et al, Prog Histochem Cytochem, 2007 and Gaunitz et al, Hepatology, 2005) Alemania, Figura 3A). De esta forma, las células que activan GSRE se marcan irreversiblemente por eGFP (eGFP+), mientras que el resto de las células doblemente  
25 infectadas se marcan por DsRed2 (DsRed2+). Diez a catorce por ciento de las células es eGFP+ dentro de menos de 10 días (Figura 14B). Las células se separan por un clasificador de células (Figura 14) y se propagan en forma separada (Figura 15A). Los

cultivos de eGFP-r (activadores GSRE) y células DsRed2+ se generan de 10 diferentes donantes humanos (edades 3-60).

[00229] **EJEMPLO 14. LAS CÉLULAS EGFP+ EXHIBEN CONSISTENTEMENTE**

**5 CAPACIDAD DE TRANSDIFERENCIACIÓN SUPERIOR**

[00230] Las células hepáticas humanas separadas por seguimiento de linaje de acuerdo con actividad GSRE eficientemente propagada (Figura 15 A) y se infectan eficientemente de forma similar  
10 mediante adenovirus recombinantes. Las células eGFP+ exhiben consistentemente capacidad de transdiferenciación superior (Figura 16) se manifiesta por la expresión génica de insulina y glucagón que es comparable con aquella de islotes pancreáticos humanos en el cultivo (Figura 16A), secreción de insulina  
15 regulada con glucosa (Figura 16B) y secreción del péptido C regulada con glucosa (Figura 16C). Estas capacidades son consistentes y no se disminuyen luego de proliferación celular extensa, (Figura 17).

20 [00231] **EJEMPLO 15: CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS CON PREDISPOSICIÓN PARA TRANSDIFERENCIACIÓN**

[00232] Para identificar los factores que pueden afectar potencialmente las eficiencias distintas de transdiferenciación  
25 de las células hepáticas humanas, comparamos el perfil de expresión global del gen de las dos poblaciones separadas utilizando análisis de chip de micromatriz. Los cultivos de células hepáticas humanas derivadas de 3 donantes diferentes y separados en células eGFP+ y DsRed2+ y se propagan para 4

pasajes. El ARN extraído se convierte en cADN y se somete a análisis de chip de micromatriz utilizando General Human Array (GeneChip Human Genome U133A 2.0 Array, Affymetrix). Mientras que la mayoría de los genes se expresan a niveles comparables en los grupos separados, la expresión de aproximadamente 800 sondas es significativamente diferente (Figura 18). De acuerdo con análisis de chip de micromatriz, aproximadamente 100 genes que codifican las proteínas de membrana se expresan en forma diferente entre las células propensas a transdiferenciación (eGFP+) y no responden (DsRed2+). Se presentan diversos estos marcadores en la Tabla 2.

[00233] **Tabla 2. Antígenos de membrana que se expresan diferencialmente en células eGFP+ y DsRed2+.**

15

| Antigen | Alta expresión | Veces (Log 2) | Valor p   | Anticuerpo comercial      |
|---------|----------------|---------------|-----------|---------------------------|
| ABCB1   | Dsred2         | -6,363        | 1,52E-02  | BD Biosciences (#557002)  |
| ITGA4   | DsRed2         | - 1,979       | 2,69E-02  | R&D system (FAB1354G)     |
| ABCB4   | DsRed2         | -4,42         | 4,62E-02  | Abcam (ab24108)           |
| PR P    | DsRed2         | - 1,35        | 4,20E-02  | eBioscience (12-9230-73)  |
| HOMER1  | eGFP           | 1,41          | 3,25E-04  | Biorbyt (orb37754)        |
| LAMP 3  | eGFP           | 1,285         | 1,81 E-02 | BD Biosciences (#558 126) |
| BMPR2   | eGFP           | 1,236         | 3,50E-02  | R&D system (AF811)        |

[00234] Los datos de micromatriz sugieren numerosas proteínas de membrana que son la expresión diferencial entre las células eGFP+

y DsRed2+ (Veces= la expresión diferencial eGFP+ comparado con el DsRed2+ (log 2)). Todos los antígenos presentados tienen anticuerpos comercialmente disponibles.

## 5 [00235] EJEMPLO 16: SEÑALIZACIÓN WNT ES ACTIVA EN CÉLULAS PREDISPUESITAS A TRANSDIFERENCIACIÓN

[00236] Se ha sugerido que la zonificación hepática se controla por un gradiente de los niveles de  $\beta$ -catenina activados; mientras  
 10 que la mayoría de las células en el hígado contienen actividad de  $\beta$ -catenina muy baja, las células hepáticas pericentrales expresan la alta actividad de  $\beta$ -catenina asociada con señalización Wnt activa (Gebhardt, et al, Prog Histochem Cytochem, 2007). Debido a que la señalización de Wnt es obligatoria para actividad de  
 15 células  $\beta$  competentes (Liu et al, J Biol Chem, 2008; Liue et al, Adv Exp Med Biol, 2010; Loder et al, Biochem Soc Trans, 2008; y Shu et al., Diabetes, 2008), la activación de linaje pancreático inducido por los pTF en el hígado se restringe a las células que una señalización Wnt activa se exhibe priori.

20

[00237] El GSRE utiliza un elemento regulador TCF aislado del mejorador 5' de GS. Si la transdiferenciación de hígado a páncreas inducida por Pdx- 1 está mediada en parte por la ruta de señalización intracelular Wnt, los factores que modulan la ruta  
 25 de señalización Wnt también debe afectar la eficiencia de transdiferenciación (Figura 19).

[00238] Estos datos en células hepáticas humanas de adultos sugieren que el aumento en las concentraciones de Wnt3a aumenta

la secreción de insulina regulada por glucosa inducida por Pdx-1, aunque el DKK3 (un inhibidor de la ruta de señalización Wnt) suprime completamente el efecto de Pdx- 1 en el proceso (Figura 19). El DKK3 también suprime totalmente la capacidad de transdiferenciación de las células eGFP aisladas de acuerdo con su capacidad de activar GSRE (Figura 20).

[00239] Se realiza la caracterización de la actividad de la ruta de señalización Wnt en la población de células eGFP+ y DsRed+. La expresión de APC, que participa en desestabilización de  $\beta$ -catenina, que de esta forma disminuye la señalización Wnt, es 700% mayor en células DsRed2+ que en células eGFP+ (Figura 21 A, de acuerdo relativo con la zonificación exhibida in vivo). La población eGFP+ ha aumentado los niveles de  $\beta$ -catenina activada (40%) comparado con los niveles analizados en células DsRed2+ (Figura 2 IB y C). Estos datos demuestran que la señalización de Wnt es activa en células que son competentes para activación GSRE y tienen predisposición para transdiferenciación.

## **OTRAS REALIZACIONES**

[00240] Aunque la invención se ha descrito en conjunto con la descripción detallada de la misma, la descripción anterior pretende ilustrar y no limitar el alcance de la invención, que se define por el alcance de las reivindicaciones adjunta. Otros aspectos, ventajas, y modificaciones están dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

## Referencias

1. Ambasudhan, R., M. Talantova, et al. (2011). Direct reprogramming of adult human fibroblasts to functional neurons under defined conditions. *Cell* 9: 113-118.
- 5 2. Atala, A. (2008). Extending life using tissue and organ replacement. *Curr Aging Sci* 1: 73-83.
- 10 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.
- 15 4. Ber, I., K. Shternhall, et al. (2003). Functional, persistent, and extended liver to pancreas transdifferentiation. *J Biol Chem* 278: 31950-31957.
- 20 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.
- 25 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.
- 5 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 10. Collombat, P., J. Hecksher-Sorensen, et al. (2006). Specifying pancreatic endocrine cell fates. *Mech Dev* 123: 501-512.
- 11 11. Collombat, P., A. Mansouri, et al. (2003). Opposing actions of Arx and Pax4 in endocrine pancreas development. *Genes Dev* 15 17: 2591-2603.
- 12 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.
- 20 13. Eberhard, D. and E. Lammert (2009). The pancreatic beta-cell in the islet and organ community. *Curr Opin Genet Dev* 19: 469-475.
- 25 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.
- 5 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.
- 10 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  
15 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  
20 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-  
25 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 or Ngn3, 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-betacellulin terapia génica 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.
- 5 29. Meivar-Levy, I. and S. Ferber (2010). Adult cell fate reprogramming: converting liver to pancreas. *Methods Mol. Biol.* 636: 251-283.
- 10 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.
- 15 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.
- 20 32. Murtaugh, L. C. and D. A. Melton (2003). Genes, signals, and lineages in pancreas development. *Annu Rev Cell Dev Biol* 19: 71-89.
- 25 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 RIPE3b1 as mammalian MafA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 6737-6742.
- 5 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  
10 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  
15 insulin-producing tissue from adult human liver cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 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  
20 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.
- 25 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. .

5

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

10

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

15

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.

20

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.

25

47. Varda-Bloom, N., A. Shaish, et al. (2001). Tissue-specific terapia génica 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.

5

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

- 10 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.

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