



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

C12Q 1/6806 (2019.02)

(21)(22) Заявка: 2017118312, 05.12.2012

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
05.12.2012

Дата регистрации:
07.06.2019

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:

05.12.2011 US 61/566,948;

12.12.2011 US 61/569,595;

24.04.2012 US 61/637,570;

07.05.2012 US 13/465,490;

26.06.2012 US 61/664,494

Номер и дата приоритета первоначальной заявки,
из которой данная заявка выделена:
2014127505 05.12.2011

(43) Дата публикации заявки: 02.11.2018 Бюл. № 31

(45) Опубликовано: 07.06.2019 Бюл. № 16

Адрес для переписки:

129090, Москва, ул. Большая Спасская, д. 25,
строение 3, ООО "Юридическая фирма
Городисский и Партнеры"

(72) Автор(ы):

ЭНДЖЕЛ Маттью (US),

РОДЕ Кристофер (US)

(73) Патентообладатель(и):

ФЭКТОР БАЙОСАЙЕНС ИНК. (US)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: Nathalia Holt, Human hematopoietic
stem/progenitor cells modified by zinc-finger
nucleases targeted to CCR5 control HIV-1 in
vivo, nature biotechnology advance online
publication, 2 July 2010. Kufe DW, Pollock RE,
Weichselbaum RR, et al., Holland-Frei Cancer
Medicine. 6th edition., 2003 г. Трансплантация
гемопоэтических стволовых клеток и генная
(см. прод.)

(54) СПОСОБЫ И ПРЕПАРАТЫ ДЛЯ ТРАНСФЕКЦИИ КЛЕТОК

(57) Реферат:

Настоящее изобретение относится к
биотехнологии, в частности к терапевтической
композиции. Описаны способы индукции
экспрессии белков клетками, а также
перепрограммирования и генного редактирования
клеток при помощи РНК. Также описаны

способы получения клеток из образцов, взятых
у пациентов, клетки, полученные при помощи
этих способов, и терапевтические препараты,
содержащие клетки, полученные при помощи
этих способов. 4 з.п. ф-лы, 11 ил., 2 табл., 29 пр.

(56) (продолжение):

терапия в лечении пациентов, инфицированных ВИЧ, Григорян АС, Клеточная трансплантология
и тканевая инженерия Том IV, 1У<3, 2009. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome
engineering., Thomas Gaj., Trends in Biotechnology July 2013, Vol. 31, No. 7.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

C12Q 1/6806 (2019.02)(21)(22) Application: **2017118312, 05.12.2012**(24) Effective date for property rights:
05.12.2012Registration date:
07.06.2019

Priority:

(30) Convention priority:
05.12.2011 US 61/566,948;
12.12.2011 US 61/569,595;
24.04.2012 US 61/637,570;
07.05.2012 US 13/465,490;
26.06.2012 US 61/664,494Number and date of priority of the initial application,
from which the given application is allocated:
2014127505 05.12.2011(43) Application published: **02.11.2018 Bull. № 31**(45) Date of publication: **07.06.2019 Bull. № 16**

Mail address:

129090, Moskva, ul. Bolshaya Spasskaya, d. 25,
stroenie 3, OOO "Yuridicheskaya firma
Gorodisskij i Partnery"

(72) Inventor(s):

ANGEL Matthew (US),
ROHDE Christopher (US)

(73) Proprietor(s):

FACTOR BIOSCIENCE INC. (US)(54) **METHODS AND PREPARATIONS FOR TRANSFECTION OF CELLS**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: present invention relates to biotechnology, in particular to a therapeutic composition. Described are methods of inducing protein expression in cells, as well as reprogramming and gene cell editing using RNA. There are also described methods for obtaining cells from samples taken from

patients, cells obtained using these methods, and therapeutic preparations containing cells obtained using these methods.

EFFECT: methods and preparations for transfection of cells are offered.

5 cl, 11 dwg, 2 tbl, 29 ex

ПРИОРИТЕТ

Настоящая заявка испрашивает приоритет относительно предварительной заявки на патент США № 61/566,948, поданной 5 декабря 2011 г., предварительной заявки на патент США № 61/569,595, поданной 12 декабря 2011 г., предварительной заявки на патент США № 61/637,570, поданной 24 апреля 2012 г., заявки на патент США № 13/465,490, поданной 7 мая 2012 г., и предварительной заявки на патент США № 61/664,494, поданной 26 июня 2012 г., которые в полном объеме включены в данный текст посредством ссылки.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение частично относится к нуклеиновым кислотам, кодирующим белки, нуклеиновым кислотам, содержащим неканонические нуклеотиды, терапевтическим препаратам, содержащим нуклеиновые кислоты, способам, наборам инструментов и устройствам для индукции экспрессии белков клетками, способам, наборам инструментов и устройствам для трансфекции, редактирования генов и перепрограммирования клеток, и клеткам, организмам и терапевтическим препаратам, полученным при помощи этих способов, наборов инструментов и устройств.

ОПИСАНИЕ ТЕКстового ФАЙЛА, ПОДАННОГО В ЭЛЕКТРОННОМ ВИДЕ

Содержание текстового файла, поданного в электронном виде вместе с заявкой, в полном объеме включено в данный текст посредством ссылки: копия перечня последовательностей в читаемом компьютером формате (название файла: FABI_001_01WO_SeqList_ST25.txt; дата записи: 4 декабря 2012 г.; размер файла: 18 КБ).

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Трансфекция нуклеиновыми кислотами

Нуклеиновые кислоты можно *in vitro* и *in vivo* доставлять в клетки путем предварительного комплексования нуклеиновых кислот с заряженными липидами, липидоидами, протеинами, полимерами или их смесями. Подобные трансфекционные реагенты являются коммерчески доступными и широко применяются для доставки нуклеиновых кислот в клетки при культивировании. Клетки, обрабатываемые комплексами из трансфекционного реагента и нуклеиновой кислоты, могут поглощать эти комплексы путем эндоцитоза либо другими способами. Оказавшись внутри клетки, нуклеиновая кислота может осуществлять предназначенную ей биологическую функцию. В случае кодирующей белок РНК, к примеру, РНК может быть транслирована в белок рибосомами клетки.

Бессывороточная клеточная культура

Животные сыворотки, такие как фетальная бычья сыворотка (ФБС), обычно используют в качестве добавок в клеточных культуральных средах для стимуляции роста многих типов клеток. При этом неопределенная природа сыворотки делает клетки, контактирующие с этим компонентом, непригодными как для исследований, так и для терапевтических применений. Как следствие, были разработаны бессывороточные клеточные культуральные среды для того, чтобы исключить постоянную изменчивость и риск загрязнения токсичными и/или патогенными веществами, которые присущи сыворотке.

Наиболее распространенным белком в сыворотке является сывороточный альбумин. Сывороточный альбумин связывается с большим количеством молекул, как *in vitro*, так и *in vivo*, включая гормоны, жирные кислоты, ионы кальция и металлов, а также низкомолекулярные лекарственные препараты, и может транспортировать эти молекулы в клетки, как *in vitro*, так и *in vivo*. Сывороточный альбумин (наиболее часто это бычий сывороточный альбумин (БСА) или человеческий сывороточный альбумин (ЧСА))

является обычным ингредиентом в бессывороточной клеточной культуральной среде, в которой его обычно используют в концентрации 1-10 г/Л. Как правило, сывороточный альбумин готовят из плазмы крови путем фракционирования этанолом (по методу Кона). Фракцию, содержащую сывороточный альбумин ("фракция Кона V" или просто "фракция V"), выделяют и обычно используют без дальнейшей обработки. Таким образом, стандартное приготовление сывороточного альбумина включает белковую часть (полипептид сывороточного альбумина) и часть с участием ассоциированных молекул (включая соли, жирные кислоты и т.д., которые связаны с полипептидом сывороточного альбумина). Состав компонента сывороточного альбумина, содержащего ассоциированные молекулы, в общем случае является сложным и неизвестным.

Сывороточный альбумин можно обрабатывать для использования в определенных специализированных применениях (*смотрите* Barker A method for the deionization of bovine serum albumin. Tissue Culture Association. 1975; Droge *et al.* Biochem Pharmacol. 1982;31:3775-9; Ng *et al.* Nat Protoc. 2008; 3:768-76; Публикация заявки на патент США № 2010/0168000, содержание которых включено в данный текст посредством ссылки). Обычно процессы обработки применяются для удаления из растворов сывороточного альбумина глобулинов и контаминантных вирусов и они часто включают стабилизацию полипептида сывороточного альбумина путем добавления короткоцепочечной жирной кислоты, октановой кислоты с последующей термоинактивацией/преципитацией загрязняющих веществ. Для высокоспециализированных применений в культивировании стволовых клеток было показано, что использование ионообменной смолы для удаления излишка соли из растворов БСА повышает жизнеспособность клеток (*смотрите* Ng *et al.* Nat Protoc. 2008; 3:768-76; Публикация заявки на патент США № 2010/0168000, содержание которых включено в данный текст посредством ссылки). При этом такая обработка не приносит пользы в случае рекомбинантного сывороточного альбумина даже при аналогичных чувствительных способах применения в культивировании стволовых клеток (*смотрите* Ng *et al.* Nat Protoc. 2008; 3:768-76; Публикация заявки на патент США № 2010/0168000, содержание которых включено в данный текст посредством ссылки), демонстрируя, что эффект деионизации в этих применениях направлен на удаление излишка соли в растворе альбумина, но не на изменение компонента альбумина, содержащего ассоциированные молекулы. Вдобавок, до настоящего времени не исследовали воздействие такой обработки на другие типы клеток, такие как человеческие фибробласты, а также воздействие такой обработки на эффективность трансфекции и на связанную с трансфекцией токсичность. Более того, было показано, что связанные с альбумином липиды являются критическими для культуры человеческих полипотентных стволовых клеток, а удаление таких клеток из альбумина приводит к спонтанной дифференциации человеческих полипотентных стволовых клеток даже в том случае, когда липиды отдельно добавляют в клеточную культуральную среду (*смотрите* Garcia-Gonzalo *et al.* PLoS One. 2008; 3:e1384, содержание которой включено в данный текст посредством ссылки). Таким образом, считается, что клеточная культуральная среда, содержащая альбумин с немодифицированным компонентом, содержащим ассоциированные молекулы, является критической для культуры человеческих полипотентных стволовых клеток. Важным является и то, что взаимосвязь между содержащим ассоциированные молекулы компонентом липидного носителя, такого как альбумин, и эффективностью трансфекции и связанной с трансфекцией токсичности, до настоящего времени не была исследована.

Перепрограммирование клеток

Клетки можно перепрограммировать путем воздействия на них специфических внеклеточных сигналов и/или путем эктопической экспрессии специфических белков, микроРНК и т.д. Хотя ранее было описано несколько способов перепрограммирования, большинство способов, основанных на эктопической экспрессии, требует внесения экзогенной ДНК, что может привести к риску появления мутаций. Сообщалось о способах перепрограммирования без участия ДНК, основанных на прямой доставке перепрограммирующих белков, но при этом данные способы являются слишком неэффективными и ненадежными для коммерческого использования. Вдобавок были описаны основанные на РНК способы перепрограммирования, но при этом существующие основанные на РНК способы перепрограммирования являются медленными, ненадежными и неэффективными при применении их к зрелым клеткам, требуют большого количества трансфекций (что приводит к высокой стоимости и возможности ошибки), могут перепрограммировать лишь ограниченное количество типов клеток, могут перепрограммировать клетки лишь в ограниченное количество типов клеток, требуют использования иммунодепрессантов, а также требуют использования большого количества компонентов человеческого происхождения, включая полученный из крови ЧСА и человеческие фибробластные фидеры. Большое количество недостатков описанных ранее способов перепрограммирования клеток делают их непригодными как для применения в исследованиях, так и для терапевтического применения.

Генное редактирование

Некоторые белки природного происхождения содержат ДНК-связывающие домены, которые могут распознавать специфические последовательности ДНК, например, цинковые пальцы (ЦП) и транскрипционные эффекторы активаторного типа (TALEs - от англ. "transcription activator-like effectors"). Белки слияния, содержащие один или более ДНК-связывающих доменов и каталитический домен нуклеазы, можно использовать для создания двухцепочечного разрыва в нужном участке ДНК в клетке. При соединении с ДНК-матрицей, содержащей один или более участков, гомологичных к ДНК клетки, генно-редактирующие белки можно использовать для вставки последовательности ДНК или изменения последовательности ДНК клетки другим контролируемым способом. При этом большинство существующих на данный момент способов генного редактирования в клетках используют векторы на основе ДНК для экспрессии генно-редактирующих белков. Как следствие, эти способы генного редактирования являются неэффективными и несут риск возникновения неконтролируемого мутагенеза, что делает их непригодными как для применения в исследованиях, так и для терапевтического применения. Способы генного редактирования соматических клеток без участия ДНК ранее не исследовали, как и способы одновременного или последовательного генного редактирования и перепрограммирования соматических клеток. И наконец, применение генного редактирования в антибактериальном, противовирусном или противораковом лечении ранее не исследовали.

Модельные организмы

Крыс с выключенными генами получали путем эмбриональной микроинъекции нуклеиновых кислот, кодирующих цинк-пальцевые нуклеазы и TALE-нуклеазы (TALENs). Также сообщалось о генном редактировании с целью внесения специфичных к последовательности мутаций (также называемых "выключениями"), проводимом на мышцах и крысах путем инъекции нуклеиновых кислот, кодирующих цинк-пальцевые нуклеазы, в эмбрионы. Генетически модифицированных крыс получали, используя

эмбриональные стволовые клетки, а компетентные крысиные полипотентные стволовые клетки зародышевой линии получали при помощи перепрограммирования соматических клеток. При этом ранее не исследовали использование клеток, прошедших перепрограммирование и генное редактирование, для получения генетически

5 модифицированных организмов.

В данной области техники существует потребность в усовершенствованных способах и препаратах для трансфекции клеток.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Соответственно, в настоящем изобретении предложены реагенты, протоколы, наборы
10 инструментов и устройства для индукции экспрессии белков клетками и для трансфекции, перепрограммирования и геномного редактирования клеток. В отличие от способов, о которых сообщалось ранее, отдельные варианты реализации настоящего изобретения не включают обработку клеток экзогенной ДНК или аллогенными материалами либо материалами животного происхождения.

15 В одном аспекте данного изобретения предложена синтетическая молекула РНК, содержащая три или более неканонических нуклеотидов, каждый из которых содержит одну или более из следующих замен: пиримидина в позиции 2С, пиримидина в позиции 4С, пиримидина в позиции 5С, пурина в позиции 6С, пурина в позиции 7N и пурина в позиции 8С. В некоторых вариантах реализации изобретения синтетическую молекулу
20 РНК получают путем *in vitro* транскрипции. В других вариантах реализации изобретения синтетическая молекула РНК дополнительно содержит по меньшей мере один следующий элемент: 5'-кэп, 5'-кэп 1 структуру и 3'-поли(А) хвост. В других вариантах реализации изобретения по меньшей мере два неканонических нуклеотида являются пиримидинами. В других вариантах реализации изобретения неканонические нуклеотиды
25 содержат по меньшей мере одно из следующих соединений: псевдоуридин, 2-тиоуридин, 4-тиоуридин, 5-азауридин, 5-гидроксиуридин, 5-аминоуридин, 5-метилуридин, 2-тиопсевдоуридин, 4-тиопсевдоуридин, 5-гидроксипсевдоуридин, 5-метилпсевдоуридин, 5-аминопсевдоуридин, псевдоизоцитидин, 5-метилцитидин, N4-метилцитидин, 2-тиоцитидин, 5-азацитидин, 5-гидроксицитидин, 5-аминоцитидин, N4-
30 метилпсевдоизоцитидин, 2-тиопсевдоизоцитидин, 5-гидроксипсевдоизоцитидин, 5-аминопсевдоизоцитидин, 5-метилпсевдоизоцитидин, N6-метиладенозин, 7-дезааденозин, 6-тиогуанозин, 7-дезагуанозин, 8-азагуанозин, 6-тио-7-дезагуанозин, 6-тио-8-азагуанозин, 7-деза-8-азагуанозин и 6-тио-7-деза-8-азагуанозин. В других вариантах реализации изобретения по меньшей мере два неканонических нуклеотида содержат
35 менее чем 20% молекулы синтетической РНК каждый. В других вариантах реализации изобретения неканонические нуклеотиды содержат по меньшей мере одно из следующих соединений: псевдоуридин, 2-тиоуридин, 4-тиоуридин, 5-азауридин, 5-гидроксиуридин, 5-аминоуридин, 5-метилуридин, 2-тиопсевдоуридин, 4-тиопсевдоуридин, 5-гидроксипсевдоуридин, 5-метилпсевдоуридин и 5-аминопсевдоуридин, и по меньшей
40 мере из следующих соединений: псевдоизоцитидин, 5-метилцитидин, N4-метилцитидин, 2-тиоцитидин, 5-азацитидин, 5-гидроксицитидин, 5-аминоцитидин, N4-метилпсевдоизоцитидин, 2-тиопсевдоизоцитидин, 5-гидроксипсевдоизоцитидин, 5-аминопсевдоизоцитидин и 5-метилпсевдоизоцитидин. В дополнительном варианте реализации изобретения неканонические нуклеотиды дополнительно содержат по
45 меньшей мере одно из следующих соединений: N6-метиладенозин, 7-дезааденозин, 6-тиогуанозин, 7-дезагуанозин, 8-азагуанозин, 6-тио-7-дезагуанозин, 6-тио-8-азагуанозин, 7-деза-8-азагуанозин и 6-тио-7-деза-8-азагуанозин.

В другом аспекте данного изобретения предложена синтетическая молекула РНК,

которая содержит неканонический нуклеотид и кодирует генно-редактирующий белок.

В другом варианте реализации изобретения предложен терапевтический состав, содержащий описанную в данном тексте синтетическую молекулу РНК.

В другом аспекте данного изобретения предложен терапевтический состав,
5 содержащий синтетическую молекулу РНК, которая кодирует генно-редактирующий белок, и трансфекционный реагент.

В другом варианте реализации изобретения предложен способ трансфекции клетки нуклеиновой кислотой, включающий приведение клетки в контакт с описанной в данном тексте синтетической молекулой РНК.

10 В другом варианте реализации изобретения предложен способ индукции экспрессии клеткой млекопитающего представляющего интерес белка, включающий приведение клетки в контакт с описанными в данном тексте синтетическими молекулами РНК. В другом варианте реализации изобретения предложен способ перепрограммирования клетки, включающий приведение клетки в контакт с описанными в данном тексте
15 синтетическими молекулами РНК. В другом варианте реализации изобретения предложен способ генного редактирования клетки, включающий приведение клетки в контакт с описанными в данном тексте синтетическими молекулами РНК.

В другом аспекте данного изобретения предложен способ трансфекции клетки нуклеиновой кислотой, включающий: приведение клетки в контакт со средой,
20 содержащей гидрокортизон и/или альбумин, причем альбумин обработан ионообменной смолой или древесным углем, и приведение клетки в контакт с нуклеиновой кислотой. В одном варианте реализации изобретения альбумин обработан короткоцепочечной жирной кислотой и/или нагрет до температуры, составляющей по меньшей мере 40°C. В других вариантах реализации изобретения данный способ дополнительно включает
25 приведение клетки в контакт с трансфекционным реагентом. В других вариантах реализации изобретения клетка является клеткой млекопитающего, а в клетке млекопитающего индуцируют экспрессию представляющего интерес белка. В других вариантах реализации изобретения данный способ дополнительно включает приведение клетки в контакт с нуклеиновой кислотой по меньшей мере дважды в продолжение 5
30 последовательных дней. В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеиновая кислота кодирует перепрограммирующий белок. В других вариантах реализации изобретения клетку перепрограммируют. В другом варианте реализации изобретения клетка является клеткой кожи, а способ дополнительно включает культивирование клетки кожи в условиях, которые способствуют росту по меньшей мере одного из
35 следующих видов клеток: клеток кожи, полипотентных стволовых клеток, глюкозозависимых инсулин-продуцирующих клеток, гемопоэтических клеток, сердечных клеток и ретинальных клеток, при этом клетку кожи перепрограммируют в клетку, выбранную из: клетки кожи, полипотентной стволовой клетки, глюкозозависимой инсулин-продуцирующей клетки, гемопоэтической клетки, сердечной клетки и
40 ретинальной клетки. В другом варианте реализации изобретения нуклеиновая кислота кодирует белок Oct4. В другом варианте реализации изобретения данный способ дополнительно включает приведение клетки в контакт с нуклеиновой кислотой, которая кодирует по меньшей мере один из белков: белок Sox2, белок Klf4 и белок c-Myc. В другом варианте реализации изобретения данный способ дополнительно включает
45 приведение клетки в контакт с одной или более нуклеиновыми кислотами, которые кодируют белок Sox2, белок Klf4 и белок c-Myc. В других вариантах реализации изобретения нуклеиновая кислота кодирует генно-редактирующий белок. В других вариантах реализации изобретения нуклеиновая кислота кодирует белок, который

действуя отдельно или в комбинации с одной или более другими молекулами, создает одноцепочечный или двухцепочечный разрыв в молекуле ДНК. В разных вариантах реализации изобретения клетка является генетически отредактированной. В некоторых вариантах реализации изобретения одноцепочечный или двухцепочечный разрыв

5 составляет около 5,000,000 оснований сайта инициации транскрипции гена, выбранного из: CCR5, CXCR4, GAD1, GAD2, CFTR, HBA1, HBA2, HBB, HBD, FANCA, XPA, XPB, XPC, ERCC2, POLH, HTT, DMD, SOD1, APOE, APP, LRRK2, PRNP, BRCA1 и BRCA2, или его аналога, варианта и представителя семейства. В некоторых вариантах реализации изобретения данный способ дополнительно включает приведение клетки в контакт с

10 по меньшей мере одним соединением из: поли-L-лизина, поли-L-орнитина, RGD-пептида, фибронектина, витронектина, коллагена и ламинина, или его биологически активным фрагментом, функциональным вариантом или представителем семейства. В других вариантах реализации изобретения нуклеиновая кислота является синтетической молекулой РНК, которая может содержать по меньшей мере одно соединение из:

15 псевдоуридина, 5-метилпсевдоуридина и 5-метилцитидина. В некоторых вариантах реализации изобретения данный способ предусматривает приведение клетки в контакт с фактором дифференцировки или получение клетки от пациента и/или доставку клетки пациенту.

В другом аспекте данного изобретения предложена среда, содержащая альбумин,

20 причем альбумин является рекомбинантным и обработанным ионообменной смолой или древесным углем. В другом варианте реализации изобретения среда дополнительно содержит буферный солевой раствор и аминокислоты, а также один или более компонентов из инсулина, трансферрина и селена, и/или холестерин, и/или стероид (такой как, например, гидрокортизон), и/или иммунодепрессант (такой как, например,

25 B18R).

В другом аспекте данного изобретения предложен набор инструментов, содержащий гидрокортизон и/или альбумин, причем альбумин обработан ионообменной смолой или древесным углем, и синтетическую молекулу РНК. В одном варианте реализации изобретения синтетическая молекула РНК кодирует по меньшей мере один из белков:

30 белок Oct4, белок Sox2, белок Klf4, белок c-Myc, белок Nanog, белок Lin28 и белок Utf1. В другом варианте реализации изобретения набор инструментов дополнительно содержит трансфекционный реагент и/или описанные в данном тексте синтетические молекулы РНК. В другом варианте реализации изобретения набор инструментов является набором инструментов для перепрограммирования и/или набором

35 инструментов для генного редактирования.

В другом аспекте данного изобретения предложен комплекс из нуклеиновой кислоты и трансфекционного реагента, содержащий нуклеиновую кислоту и трансфекционный реагент, при этом комплекс из нуклеиновой кислоты и трансфекционного реагента отвержден путем охлаждения. В некоторых вариантах реализации изобретения комплекс

40 из нуклеиновой кислоты и трансфекционного реагента отвержден путем приведения в контакт комплекса из нуклеиновой кислоты и трансфекционного реагента с жидким азотом в жидком и/или парообразном состоянии.

В другом аспекте данного изобретения предложен способ трансфекции клетки, включающий приведение клетки в контакт с описанным в данном тексте комплексом

45 из нуклеиновой кислоты и трансфекционного реагента.

В другом аспекте данного изобретения предложено устройство для трансфекции клеток, содержащее приспособления для приведения клеток в контакт с трансфекционной средой и приспособления для приведения клеток в контакт с

комплексами из нуклеиновой кислоты и трансфекционного реагента. В некоторых вариантах реализации изобретения атмосфера, окружающая клетки, содержит около 5% углекислого газа и/или около 5% кислорода.

В некоторых вариантах реализации изобретения предложены клетка, и/или организм, и/или терапевтический состав, и/или терапевтический состав, содержащие клетку, полученную при помощи описанных в данном тексте способов.

В некоторых аспектах предложены синтетические молекулы РНК с низкой токсичностью и высокой трансляционной эффективностью. В других аспектах предложены способы, наборы инструментов и устройства для получения и доставки синтетических молекул РНК в клетки. В других аспектах предложена клеточная культуральная среда для высокоэффективной трансфекции, перепрограммирования и генного редактирования клеток. Другие аспекты относятся к содержащим синтетические молекулы РНК терапевтическим препаратам для лечения заболеваний, включая диабет 1 типа, сердечную недостаточность, включая ишемическую и дилатационную кардиомиопатию, макулярную дегенерацию, болезнь Паркинсона, кистозный фиброз, серповидноклеточную анемию, талассемию, анемию Фанкони, тяжелый комбинированный иммунодефицит, радикулярную сенсорную наследственную невропатию, пигментную ксеродерму, болезнь Хантингтона, мышечную дистрофию, амиотрофический боковой склероз, болезнь Альцгеймера, рак и инфекционные заболевания, включая гепатиты и ВИЧ/СПИД. Дополнительные аспекты относятся к содержащим клетки терапевтическим препаратам для лечения заболеваний, включая диабет 1 типа, сердечную недостаточность, включая ишемическую и дилатационную кардиомиопатию, макулярную дегенерацию, болезнь Паркинсона, кистозный фиброз, серповидноклеточную анемию, талассемию, анемию Фанкони, тяжелый комбинированный иммунодефицит, радикулярную сенсорную наследственную невропатию, пигментную ксеродерму, болезнь Хантингтона, мышечную дистрофию, амиотрофический боковой склероз, болезнь Альцгеймера, рак и инфекционные заболевания, включая гепатиты и ВИЧ/СПИД.

ДЕТАЛЬНОЕ ОПИСАНИЕ ФИГУР

Данное изобретение в качестве примера, но не в качестве ограничения, проиллюстрировано фигурами из прилагаемых чертежей, в которых:

На ФИГ. 1 показана РНК, кодирующая указанные белки, разделенные в денатурирующем формальдегидном арагозном геле.

На ФИГ. 2А показаны первичные человеческие фибробласты, трансфицированные синтетической РНК, кодирующей Oct4 и содержащей указанные нуклеотиды. "А" обозначает аденозин, "Г" обозначает гуанозин, "У" обозначает уридин, "Ц" обозначает цитидин, "псУ" обозначает псевдоуридин, "5мЦ" обозначает 5 метилцитидин, "N4мЦ" обозначает N4-метилцитидин, "7дГ" обозначает 7-дезагуанозин и "псизоЦ" обозначает псевдоизоцитидин. Числа перед нуклеотидами указывают на долю соответствующего нуклеотид-5'-трифосфата в реакции *in vitro* транскрипции. Например, 0,5 N4мЦ обозначает РНК, синтезированную при помощи реакции *in vitro* транскрипции с участием равных количеств N4-метилцитидин-5'-трифосфата и цитидин-5'-трифосфата. Через 20 ч после трансфекции клетки фиксировали и окрашивали на наличие белка Oct4.

На ФИГ. 2Б показана экспрессия Oct4 и клеточная плотность культур первичных человеческих фибробластов, трансфицированных синтетической РНК, кодирующей Oct4 и содержащей указанные нуклеотиды. Нуклеотиды обозначаются так же, как и на ФИГ. 2А, за исключением того, что "7дА" обозначает 7-дезааденозин и "пиЦ" обозначает псевдоизоцитидин. Приведенная клеточная плотность нормирована

относительно нетрансфицированных клеток. Приведенная экспрессия Oct4 нормирована относительно синтетической РНК, содержащей только канонические нуклеотиды. Планки погрешностей показывают среднеквадратическую погрешность (n=3).

На ФИГ. 3А показана перепрограммированная клеточная линия, полученная путем трансфекции первичных человеческих фибробластов РНК, кодирующей белки Oct4, Sox2, Klf4, c-Мус-2 (T58A) и Lin28, через день после того, как колонии были собраны и высеяны на покрытый экстрагированной базальной мембраной планшет.

На ФИГ. 3Б показана перепрограммированная клеточная линия, полученная таким же способом, как и на ФИГ. 3А, окрашенная на наличие полипотентных маркеров стволовых клеток Oct4 и SSEA4. На сегменте, обозначенном как "Хехст", показаны ядра, а на сегменте, обозначенном как "Совмещение" показаны совмещенные сигналы от трех каналов.

На ФИГ. 3В показаны первичные человеческие фибробласты, трансфицированные и культивированные как на ФИГ. 3А. Всего было проведено 5 трансфекций. Снимки делали на 7 день. Видно несколько колоний клеток с перепрограммированной морфологией.

На ФИГ. 4А показан образец ткани диаметром 1,5 мм, полученный путем проведения биопсии при помощи дерматома.

На ФИГ. 4Б показан образец ткани, полученный как на ФИГ. 4А и находящийся во взвешенном состоянии на границе раздела воздух-жидкость раствора, содержащего фермент.

На ФИГ. 4В показаны первичные человеческие фибробласты, полученные как на ФИГ. 4А, диссоциированные как на ФИГ. 4Б и высеянные в лунки 96-луночного планшета.

На ФИГ. 5А показаны первичные человеческие фибробласты, перепрограммированные в инсулин-продуцирующие клетки. Клетки фиксировали и окрашивали на наличие инсулина.

На ФИГ. 5Б показаны первичные человеческие фибробласты, перепрограммированные в гемопоэтические клетки. Клетки фиксировали и окрашивали на наличие CD34.

На ФИГ. 5В показаны первичные человеческие фибробласты, перепрограммированные в сократительные сердечные клетки.

На ФИГ. 6А показана передняя цепь матрицы для *in vitro* транскрипции для получения остова РНК TALEN™.

На ФИГ. 6Б показана матрица с ФИГ. 6А после проведения реакции клонирования Золотые ворота для включения серии повторяющихся мономеров, образующих полную матрицу РНК TALEN™.

На ФИГ. 6В показана 5'-кэпированная, 3'-поли(А)-хвостовая РНК TALEN™, полученная с матрицы с ФИГ. 6Б.

На ФИГ. 7 показана последовательность матрицы с ФИГ. 6Б, где РНК TALEN™ предназначена для связывания с участком ДНК в 20 п.о. и где участки, обозначенные как "X(02)X", "X(03)X" и так далее, представляют собой повторяющиеся варибельные домены (ПВД), которые можно выбрать таким образом, чтобы они были нацелены на специфическую последовательность ДНК. Данная матрица кодирует РНК TALEN™, причем первый остаток, который связывает РНК TALEN™, является остатком тимидина независимым от ПВД, и, таким образом, первый ПВД обозначен как "X(02)X" вместо "X(01)X".

На ФИГ. 8 показаны первичные человеческие фибробласты, генетически

отредактированные и перепрограммированные. Стрелки указывают на колонии клеток с перепрограммированной морфологией.

На ФИГ. 9А показан вид спереди на устройство, которое может трансфицировать и/или перепрограммировать клетки в автоматическом или полуавтоматическом режиме.

На ФИГ. 9Б показана задняя панель устройства с ФИГ. 9А.

На ФИГ. 9В показаны основные компоненты устройства с ФИГ. 9А.

На ФИГ. 10А показано комплексирование РНК и трансфекционного реагента в комплексобразующей среде.

На ФИГ. 10Б показаны два способа распределения пре-комплексационных таблеток, содержащих нуклеиновые кислоты.

На ФИГ. 10В показан способ снятия крышки с луночного планшета путем присасывания.

На ФИГ. 10Г показан способ снятия крышки с луночного планшета при помощи зажима.

На ФИГ. 11 показано устройство, которое может трансфицировать и/или перепрограммировать клетки в автоматическом или полуавтоматическом режиме в функциональной комбинации с оборудованием для визуализации, инкубации и других манипуляций с клетками.

Определения

Под "молекулой" подразумевается молекулярная частица (молекула, ион, комплекс и т.д.).

Под "белком" подразумевается полипептид.

Под "молекулой РНК" подразумевается молекула, которая содержит РНК.

Под "синтетической молекулой РНК" подразумевается молекула РНК, которая синтезирована вне клетки или которая синтезирована в клетке при помощи биоинженерии, например, синтезированная путем реакции *in vitro* транскрипции молекула РНК, синтезированная путем прямого химического синтеза молекула РНК или синтезированная в созданной методами генетической инженерии клетке *E.coli* молекула РНК.

Под "нуклеотидом" подразумевается нуклеотид либо его фрагмент или производное, например, нуклеиновое основание, нуклеозид, нуклеотид-трифосфат и т.д.

Под "нуклеозидом" подразумевается нуклеотид.

Под "трансфекцией" подразумевается приведение клетки в контакт с молекулой, при котором молекула поглощается клеткой.

Выражение "при трансфекции" подразумевает во время или после трансфекции.

Под "трансфекционным реагентом" подразумевается вещество или смесь веществ, которое связывается с молекулой и способствует доставке молекулы в клетку и/или поглощению молекулы клеткой, например, катионный липид, заряженный полимер или проникающий в клетку пептид.

Под "трансфекцией на основе реагента" подразумевается трансфекция, осуществленная при помощи трансфекционного реагента.

Под "клеточной культуральной средой" подразумевается среда, которая может быть использована для культивирования клеток, например, среда Игла, модифицированная по способу Дульбекко (DMEM - от англ. "Dulbecco's Modified Eagle's Medium") или DMEM+10% фетальной бычьей сыворотки (ФБС).

Под "средой для комплексования" подразумевается среда, в которую добавляют трансфекционный реагент и трансфетируемую молекулу, и в которой трансфекционный реагент связывается с трансфетируемой молекулой.

Под "трансфекционной средой" подразумевается среда, которую можно использовать для трансфекции, например, среда Игла, модифицированная по способу Дульбекко (DMEM) или DMEM/F12.

Под "рекомбинантным белком" подразумевается белок или пептид который не синтезируется в организме животных или людей. Неограничивающие примеры включают 5 человеческий трансферрин, который синтезируется в бактериях, человеческий фибронектин, который синтезируется в *in vitro* культуре мышинных клеток, и человеческий сывороточный альбумин, который синтезируется в рисовой культуре.

Под "липидным носителем" подразумевается вещество, которое может повысить 10 растворимость липида или липидорастворимой молекулы в водном растворе, например, человеческий сывороточный альбумин или метил-бета-циклодекстрин.

Под "белком Oct4" подразумевается белок, который кодируется геном POU5F1, либо его природный или полученный методами генетической инженерии вариант, представитель семейства, ортолог, фрагмент или конструкция слияния, например, 15 человеческий белок Oct4 (SEQ ID NO:1), мышинный белок Oct4, белок Oct1, белок, кодируемый псевдогеном 2 POU5F1, ДНК-связывающий домен белка Oct4 или белок слияния Oct4-3ФБ. В некоторых вариантах реализации изобретения белок Oct4 содержит аминокислотную последовательность, которая обладает по меньшей мере 70% 20 идентичности с SEQ ID NO:1, или, в других вариантах реализации изобретения - по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентичности с SEQ ID NO:1. В некоторых вариантах реализации изобретения белок Oct4 содержит аминокислотную последовательность, содержащую от 1 до 20 аминокислотных инсерций, делеций или 25 замен (в совокупности) по отношению к SEQ ID NO:1. В других вариантах реализации изобретения белок Oct4 содержит аминокислотную последовательность, содержащую от 1 до 15 или от 1 до 10 аминокислотных инсерций, делеций или замен (в совокупности) по отношению к SEQ ID NO:1.

Под "белком Sox2" подразумевается белок, который кодируется геном SOX2, либо его природный или полученный методами генетической инженерии вариант, представитель семейства, ортолог, фрагмент или конструкция слияния, например, 30 человеческий белок Sox2 (SEQ ID NO:2), мышинный белок Sox2, ДНК-связывающий домен белка Sox2 или белок слияния Sox2-3ФБ. В некоторых вариантах реализации изобретения белок Sox2 содержит аминокислотную последовательность, которая обладает по меньшей мере 70% идентичности с SEQ ID NO:2, или, в других вариантах реализации изобретения - по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентичности 35 с SEQ ID NO:2. В некоторых вариантах реализации изобретения белок Sox2 содержит аминокислотную последовательность, содержащую от 1 до 20 аминокислотных инсерций, делеций или замен (в совокупности) по отношению к SEQ ID NO:2. В других вариантах реализации изобретения белок Sox2 содержит аминокислотную последовательность, содержащую от 1 до 15 или от 1 до 10 аминокислотных инсерций, делеций или замен (в 40 совокупности) по отношению к SEQ ID NO:2.

Под "белком Klf4" подразумевается белок, который кодируется геном KLF4, либо его природный или полученный методами генетической инженерии вариант, представитель семейства, ортолог, фрагмент или конструкция слияния, например, 45 человеческий белок Klf4 (SEQ ID NO:3), мышинный белок Klf4, ДНК-связывающий домен белка Klf4 или белок слияния Klf4-3ФБ. В некоторых вариантах реализации изобретения белок Klf4 содержит аминокислотную последовательность, которая обладает по меньшей мере 70% идентичности с SEQ ID NO:3, или, в других вариантах реализации изобретения - по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентичности с SEQ ID

NO:3. В некоторых вариантах реализации изобретения белок Klf4 содержит аминокислотную последовательность, содержащую от 1 до 20 аминокислотных инсерций, делеций или замен (в совокупности) по отношению к SEQ ID NO:3. В других вариантах реализации изобретения белок Klf4 содержит аминокислотную последовательность, содержащую от 1 до 15 или от 1 до 10 аминокислотных инсерций, делеций или замен (в совокупности) по отношению к SEQ ID NO:3.

Под "белком с-Мус" подразумевается белок, который кодируется геном MYC, либо его природный или полученный методами генетической инженерии вариант, представитель семейства, ортолог, фрагмент или конструкция слияния, например, человеческий белок с-Мус (SEQ ID NO:4), мышинный белок с-Мус, белок 1-Мус, белок с-Мус (T58A), ДНК-связывающий домен белка с-Мус или белок слияния с-Мус-3ФБ. В некоторых вариантах реализации изобретения белок с-Мус содержит аминокислотную последовательность, которая обладает по меньшей мере 70% идентичности с SEQ ID NO:4, или, в других вариантах реализации изобретения - по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентичности с SEQ ID NO:4. В некоторых вариантах реализации изобретения белок с-Мус содержит аминокислотную последовательность, содержащую от 1 до 20 аминокислотных инсерций, делеций или замен (в совокупности) по отношению к SEQ ID NO:4. В других вариантах реализации изобретения белок с-Мус содержит аминокислотную последовательность, содержащую от 1 до 15 или от 1 до 10 аминокислотных инсерций, делеций или замен (в совокупности) по отношению к SEQ ID NO:4.

Под "перепрограммированием" подразумевается инициация изменения в фенотипе клетки, например, инициация дифференцирования β -клетки-предшественницы в зрелую β -клетку, инициация дедифференцирования фибробласта в полипотентную стволовую клетку, инициация трансдифференцирования кератиноцита в сердечную стволовую клетку или инициация роста аксона нейрона.

Под "фактором перепрограммирования" подразумевается молекула, которая в случае контакта клетки с этой молекулой и/или экспрессии этой молекулы клеткой, может как отдельно, так и в комбинации с другими молекулами, иницировать перепрограммирование, например, это белок Oct4.

Под "фидером" подразумевается клетка, которую можно использовать для улучшения среды или другого способа стимуляции роста других клеток в культуре.

Под "кондиционированием" подразумевается приведение одного или более фидеров в контакт со средой.

Под "жирной кислотой" подразумевается молекула, которая содержит алифатическую цепь, содержащую по меньшей мере два атома углерода, например, линолевая кислота, α -линолевая кислота, октановая кислота, лейкотриен, простагландин, холестерин, глюкокортикоид, резолвин, протектин, тромбосан, липоксин, марезин, сфинголипид, триптофан, N-ацетил триптофан или их соли, метиловые эфиры или производные.

Под "короткоцепочечной жирной кислотой" подразумевается жирная кислота, которая содержит алифатическую цепь, содержащую от двух до 30 атомов углерода.

Под "альбумином" подразумевается белок, который является хорошо растворимым в воде, например, человеческий сывороточный альбумин.

Под "ассоциированной молекулой" подразумевается молекула, которая нековалентно связана с другой молекулой.

Под "компонентом альбумина, содержащим ассоциированные молекулы" подразумеваются одна или более молекул, которые связаны с полипептидом альбумина, например, это липиды, гормоны, холестерин, ионы кальция и т.д., которые связаны с

полипептидом альбумина.

Под "обработанным альбумином" подразумевается альбумин, который обработан для того, чтобы уменьшить, удалить, заменить или каким-либо другим способом инактивировать компонент альбумина, содержащий ассоциированные молекулы, например, это человеческий сывороточный альбумин, который инкубирован при повышенной температуре, человеческий сывороточный альбумин, который приведен в контакт с октаноатом натрия, или человеческий сывороточный альбумин, который приведен в контакт с пористым материалом.

Под "ионообменной смолой" подразумевается вещество, которое при контакте с содержащим ионы раствором может заменить один или более ионов одним или более отличными ионами, например, вещество, которое может заменить один или более ионов кальция одним или более ионами натрия.

Под "зародышевой клеткой" подразумевается сперматозоид или яйцеклетка.

Под "полипотентной стволовой клеткой" подразумевается клетка, которая может дифференцироваться в клетки всех трех зародышевых слоев (энтодерма, мезодерма и эктодерма) *in vivo*.

Под "соматической клеткой" подразумевается клетка, которая не является полипотентной стволовой клеткой или зародышевой клеткой, например, клетка кожи.

Под "глюкозозависимой инсулин-продуцирующей клеткой" подразумевается клетка, которая при воздействии определенной концентрации глюкозы может синтезировать и/или секретировать такое количество инсулина, которое отличается (как в меньшую, так и в большую сторону) от количества инсулина, которое клетка синтезирует и/или секретирует при воздействии другой концентрации глюкозы, например, это β -клетка.

Под "гемопоэтической клеткой" подразумевается клетка крови или клетка, которая может дифференцироваться в клетку крови, например, гемопоэтическая стволовая клетка или белые кровяные тельца.

Под "сердечной клеткой" подразумевается клетка сердца или клетка, которая может дифференцироваться в клетку сердца, например, сердечная стволовая клетка или кардиомиоцит.

Под "ретиальной клеткой" подразумевается клетка сетчатки или клетка, которая может дифференцироваться в клетку сетчатки, например, ретиальная пигментная эпителиальная клетка.

Под "клеткой кожи" подразумевается клетка, которую обычно можно обнаружить в коже, например, фибробласт, кератиноцит, меланоцит, адипоцит, мезенхимная стволовая клетка, жировая стволовая клетка или клетка крови.

Под "агонистом Wnt-сигнального пути" подразумевается молекула, которая может выполнять одну или более биологических функций одного или более представителей семейства белков Wnt, например, Wnt1, Wnt2, Wnt3, Wnt3a или 2-амино-4-[3,4-(метилendioкси)бензиламино]-6-(3-метоксифенил)пиримидин.

Под "агонистом IL-6-сигнального пути" подразумевается молекула, которая может выполнять одну или более биологических функций белка IL-6, например, белок IL-6 или рецептор IL-6 (также известный как растворимый рецептор IL-6, IL-6R, IL-6R альфа и т.д.).

Под "агонистом TGF- β -сигнального пути" подразумевается молекула, которая может выполнять одну или более биологических функций одного или более представителей надсемейства белков TGF- β , например, TGF- β 1, TGF- β 3, активин A, КМБ-4 или Nodal.

Под "иммунодепрессантом" подразумевается вещество, которое может подавлять один или более аспектов иммунной системы и которое обычно не присутствует в

организме млекопитающего, например, В18R или дексаметазон.

Под "генным редактированием" подразумевается изменение последовательности ДНК клетки.

Под "генно-редактирующим белком" подразумевается белок, который может, как
5 отдельно, так и в комбинации с другой молекулой, изменять последовательность ДНК
клетки, например, это нуклеаза, транскрипционная активаторо-подобная эффекторная
нуклеаза (TALEN - от англ. "transcription activator-like effector nuclease"), цинк-пальцевая
нуклеаза, мегануклеаза, никаза, либо его природный или полученный методами
10 генетической инженерии вариант, представитель семейства, ортолог, фрагмент или
конструкция слияния.

Под "одноцепочечным разрывом" подразумевается участок одноцепочечной или
двухцепочечной ДНК, на котором в одной из одной или двух цепей были разорваны
одна или более ковалентных связей между нуклеотидами.

Под "двухцепочечным разрывом" подразумевается участок двухцепочечной ДНК,
15 на котором в каждой из двух цепей были разорваны одна или более ковалентных связей
между нуклеотидами.

Сывороточный альбумин является обычным компонентом в бессывороточной
клеточной культуральной среде. Недавно было обнаружено, что сывороточный
альбумин может подавлять трансфекцию и что добавление необработанного
20 сывороточного альбумина в трансфекционную среду в концентрации, которая обычно
используется в бессывороточной клеточной культуральной среде, может привести к
низкой эффективности трансфекции и/или низкой жизнеспособности клеток после
трансфекции. Полипептид сывороточного альбумина может связываться с большим
количеством молекул, включая липиды, ионы, холестерин и т.д., как *in vitro*, так и *in*
25 *vivo*, и в результате как выделенный из крови сывороточный альбумин, так и
рекомбинантный сывороточный альбумин содержат полипептидный компонент и
компонент, содержащий ассоциированные молекулы. Недавно было обнаружено, что
низкая эффективность трансфекции и низкая жизнеспособность клеток после
трансфекции, причиной которых является сывороточный альбумин, могут быть частично
30 вызваны компонентом сывороточного альбумина, содержащим ассоциированные
молекулы. Также было обнаружено, что эффективность трансфекции можно повысить,
а связанную с трансфекцией токсичность снизить путем частичного или полного
уменьшения, удаления, замены или инактивации каким-либо другим способом
компонента сывороточного альбумина, содержащего ассоциированные молекулы.
35 Определенные варианты реализации изобретения, следовательно, относятся к белку,
который обработан таким образом, чтобы уменьшить, удалить, заменить или
инактивировать каким-либо другим способом компонент белка, содержащий
ассоциированные молекулы.

Определенные варианты реализации изобретения относятся к способу обработки
40 белка путем приведения белка в контакт с одной или более молекулами, которые
уменьшают низкую эффективность трансфекции и/или низкую жизнеспособность клеток
после трансфекции, причиной которых является белок. Было обнаружено, что
приведение сывороточного альбумина в контакт с короткоцепочечной жирной кислотой,
октаноатом натрия (также известным как "октановая кислота", "октаноат", "каприлат"
45 или "каприловая кислота") в некоторых ситуациях уменьшает низкую эффективность
трансфекции и низкую жизнеспособность клеток после трансфекции, причиной которых
является сывороточный альбумин. Другие вещества, которые можно применять для
обработки белка, включают: каприновую кислоту, лауриновую кислоту, миристиновую

кислоту, пальмитиновую кислоту, стеариновую кислоту, арахидиновую кислоту, бегеновую кислоту, лигноцериновую кислоту, церотиновую кислоту, миристолеиновую кислоту, пальмитолеиновую кислоту, сапиеновую кислоту, олеиновую кислоту, элаидиновую кислоту, вакценовую кислоту, линолевую кислоту, линоэлаидиновую

кислоту, альфа-линолевую кислоту, арахидоновую кислоту, эйкозапентаеновую кислоту, эруковую кислоту, докозагексаеновую кислоту, триптофан, N-ацетил триптофан, холестерин, другие жирные кислоты и их соли, смеси, фрагменты и производные.

Вещества для обработки белка могут являться чистыми веществами, смесями с точно определенными компонентами либо комплексными смесями или смесями с неопределенными компонентами, такими как масла животного или растительного происхождения, например, рыбий жир. В определенных вариантах реализации изобретения белок обрабатывают после того, как белок очищают. В других вариантах реализации изобретения белок обрабатывают перед тем, как белок очищают. В других вариантах реализации изобретения белок обрабатывают и очищают одновременно. В других вариантах реализации изобретения белок обрабатывают, но не очищают.

Инкубация белка при повышенной температуре может привести к частичной или полной денатурации полипептидного компонента белка, что может уменьшить количество или ликвидировать связывающие участки, которые могут являться критическими для поддержания компонента белка, содержащего ассоциированные молекулы. Определенные варианты реализации изобретения, следовательно, относятся к способу обработки белка путем инкубации белка при повышенной температуре. В одном варианте реализации изобретения белок инкубируют при температуре, составляющей по меньшей мере 40°C, на протяжении по меньшей мере около 10 минут. В другом варианте реализации изобретения белок инкубируют при температуре, составляющей по меньшей мере 50°C, на протяжении по меньшей мере около 10 минут. В другом варианте реализации изобретения белок инкубируют при температуре, составляющей по меньшей мере 55°C, на протяжении по меньшей мере около 30 минут. В одном варианте реализации изобретения белок приводят в контакт с октаноатом натрия, а потом инкубируют при около 60°C на протяжении нескольких часов, например между около 1 часом и около 24 часами, или между около 2 часами и около 6 часами. В другом варианте реализации изобретения концентрация октаноата натрия составляет между около 5 мМ и около 50 мМ, или между около 10 мМ и около 40 мМ. В определенных вариантах реализации изобретения октаноат натрия заменяют или применяют в комбинации с по меньшей мере одним элементом из каприновой кислоты, лауриновой кислоты, миристиновой кислоты, пальмитиновой кислоты, стеариновой кислоты, арахидиновой кислоты, бегеновой кислоты, лигноцериновой кислоты, церотиновой кислоты, миристолеиновой кислоты, пальмитолеиновой кислоты, сапиеновой кислоты, олеиновой кислоты, элаидиновой кислоты, вакценовой кислоты, линолевой кислоты, линоэлаидиновой кислоты, альфа-линолевой кислоты, арахидоновой кислоты, эйкозапентаеновой кислоты, эруковой кислоты, докозагексаеновой кислоты, триптофана, N-ацетил триптофана и холестерина или их солей, смесей, фрагментов и производных.

Гликирование и гликозилирование являются процессами, при помощи которых одна или более молекул сахаров связываются с белком. Гликирование и гликозилирование могут влиять на связывающие свойства белка, а сывороточный альбумин содержит несколько потенциальных участков гликирования. Определенные варианты реализации изобретения, следовательно, относятся к способу обработки белка путем гликирования или гликозилирования белка.

Ионообменные смолы, включая анионообменные, катионообменные и смешанные смолы, обычно применяют для деионизации растворов. Содержащий ассоциированные молекулы компонент белков, таких как сывороточный альбумин, может содержать ионы. Определенные варианты реализации изобретения, следовательно, относятся к способу обработки белка путем приведения белка в контакт с одной или более ионообменными смолами. В одном варианте реализации изобретения одна или более из ионообменных смол содержит смешанную смолу, содержащую функциональные группы с протонными (H⁺) и гидроксильными (OH⁻) формами. В другом варианте реализации изобретения одна или более из ионообменных смол содержит индикатор, который изменяет цвет, когда смола насыщается ионами. Дополнительно к приведению в контакт с одной или более ионообменными смолами можно использовать другие способы для того, чтобы уменьшить, удалить, заменить или инактивировать каким-либо другим способом компонент белка, содержащий ассоциированные молекулы, включая приведение белка в контакт с древесным углем, который может быть активирован и/или обработан химическим веществом, таким как сульфат декстрана, диализ (включая разбавление, приводящее к деассоциации компонента белка, содержащего ассоциированные молекулы, с или без последующего удаления деассоциированных молекул из раствора), кристаллизацию, хроматографию, электрофорез, тепловую обработку, низкотемпературную обработку, обработку растворами с высоким уровнем pH, обработку растворами с низким уровнем pH, преципитацию органическими растворителями и афинную очистку.

Определенные способы обработки белка могут предпочтительно уменьшить, удалить, заменить или инактивировать каким-либо другим способом специфические типы молекул. Следовательно, в определенных ситуациях может быть выгодным комбинировать два или более способов обработки белка для того, чтобы уменьшить низкую эффективность трансфекции и/или низкую жизнеспособность клеток после трансфекции, причиной которых является белок. Определенные варианты реализации изобретения, следовательно, относятся к способу обработки белка, в котором применяются два или более способов для того, чтобы уменьшить, удалить, заменить или инактивировать каким-либо другим способом компонент белка, содержащий ассоциированные молекулы. В одном варианте реализации изобретения белок приводят в контакт с одной или более ионообменными смолами и активированным древесным углем. В другом варианте реализации изобретения белок приводят в контакт с октаноатом натрия, инкубируют при повышенной температуре, приводят в контакт с одной или более ионообменными смолами и приводят в контакт с активированным древесным углем. В другом варианте реализации изобретения белок является сывороточным альбумином, а повышенная температура составляет по меньшей мере около 50°C.

Определенные элементы компонента белка, содержащего ассоциированные молекулы, могут оказаться полезными для клеток в культуре и/или для трансфекции, например, это некоторые резолвины, протектины, липоксины, марезины, эйкозаноиды, простаглицлины, тромбоксаны, лейкотриены, циклопентенон простаглицлины и глюкокортикоиды. Определенные варианты реализации изобретения, следовательно, относятся к способу обработки белка для того, чтобы уменьшить, удалить, заменить или инактивировать каким-либо другим способом компонент белка, содержащий ассоциированные молекулы, без уменьшения, удаления, замены или инактивации каким-либо другим способом одного или более из полезных элементов компонента белка, содержащего ассоциированные молекулы. Другие варианты реализации изобретения

относятся к способу обработки белка для того, чтобы уменьшить, удалить, заменить или инактивировать каким-либо другим способом компонент белка, содержащий ассоциированные молекулы, и дополнительного приведения белка в контакт с одной или более молекулами, содержащими один или более полезных элементов компонента

5 белка, содержащего ассоциированные молекулы.

Другие варианты реализации изобретения относятся к способу обработки белка для того, чтобы уменьшить низкую эффективность трансфекции и/или низкую жизнеспособность клеток после трансфекции, причиной которых является белок, путем

10 приведения белка в контакт с одной или более молекулами, содержащими один или более полезных элементов компонента белка, содержащего ассоциированные молекулы.

Другие варианты реализации изобретения относятся к способу повышения эффективности трансфекции и/или повышения жизнеспособности клеток после

трансфекции путем приведения клетки в контакт с одной или более молекулами, содержащими один или более полезных элементов компонента белка, содержащего

15 ассоциированные молекулы. В одном варианте реализации изобретения белок приводят в контакт с одной или более ионообменными смолами или древесным углем и

дополнительно приводят в контакт с глюкокортикоидом, таким как гидрокортизон, преднизон, преднизолон, метилпреднизолон, дексаметазон или бетаметазон. В другом

варианте реализации изобретения клетку приводят в контакт с глюкокортикоидом, таким как гидрокортизон, преднизон, преднизолон, метилпреднизолон, дексаметазон

20 или бетаметазон. Дополнительно было обнаружено, что в определенных ситуациях добавление в трансфекционную среду одного или более стероидов и/или одного или

более антиоксидантов может повысить эффективность трансфекции, эффективность перепрограммирования и эффективность генного редактирования. Определенные

25 варианты реализации изобретения, следовательно, относятся к способу индукции экспрессии клеткой представляющего интерес белка путем культивирования клетки в

среде, содержащей стероид и приведения клетки в контакт с одной или более синтетическими молекулами РНК. В одном варианте реализации изобретения стероид

является гидрокортизоном. В другом варианте реализации изобретения гидрокортизон

30 присутствует в среде в концентрации между около 0,1 мкМ и около 10 мкМ или около 1 мкМ. Другие варианты реализации изобретения относятся к способу индукции

экспрессии клеткой представляющего интерес белка путем культивирования клетки в среде, содержащей антиоксидант и приведения клетки в контакт с одной или более

синтетическими молекулами РНК. В одном варианте реализации изобретения антиоксидант является аскорбиновой кислотой или аскорбиновой кислотой-2-фосфатом.

35 В другом варианте реализации изобретения аскорбиновая кислота или аскорбиновая кислота-2-фосфат присутствует в среде в концентрации между около 0,5 мг/Л и около 500 мг/Л, включая около 50 мг/Л. Другие варианты реализации изобретения относятся

к способу перепрограммирования и/или генного редактирования клетки путем культивирования клетки в среде, содержащей стероид и/или антиоксидант и приведения

40 клетки в контакт с одной или более синтетическими молекулами РНК, при этом одна или более из синтетических молекул РНК кодирует один или более

перепрограммирующих и/или генно-редактирующих белков. В определенных вариантах реализации изобретения клетка изначально присутствует в организме, а стероид и/или

45 антиоксидант доставляют в организм.

Сообщалось, что добавление в среду для комплексования трансферрина в определенных ситуациях повышает эффективность плазмидной трансфекции. Недавно

было обнаружено, что добавление трансферрина в среду для комплексования также

может повысить эффективность трансфекции синтетическими молекулами РНК.

Определенные варианты реализации изобретения, следовательно, относятся к способу индукции экспрессии клеткой представляющего интерес белка путем добавления одной или более синтетических молекул РНК и трансфекционного реагента в раствор, содержащий трансферрин. В одном варианте реализации изобретения трансферрин присутствует в растворе в концентрации между около 1 мг/Л и около 100 мг/Л, например, около 5 мг/Л. В другом варианте реализации изобретения трансферрин является рекомбинантным.

Другие варианты реализации изобретения относятся к среде, содержащей белок, который обработан согласно одному или более способам настоящего изобретения. В определенных вариантах реализации изобретения белок обрабатывают до того, как его смешивают с одним или более другими ингредиентами среды. В одном варианте реализации изобретения среда является трансфекционной средой. В другом варианте реализации изобретения данная среда также способствует эффективной трансфекции и высокой жизнеспособности клеток. В определенных вариантах реализации изобретения белок и одну или более молекул, которые уменьшают низкую эффективность трансфекции и/или низкую жизнеспособность клеток после трансфекции, причиной которых является белок, добавляют в среду независимо друг от друга. В одном варианте реализации изобретения белок обрабатывают до того, как его смешивают с одним или более других ингредиентов среды. В другом варианте реализации изобретения среду готовят, обрабатывая сначала концентрированный раствор сывороточного альбумина путем приведения концентрированного раствора сывороточного альбумина в контакт с одной или более ионообменными смолами, затем удаляя одну или более ионообменных смол из концентрированного раствора сывороточного альбумина, и затем добавляя обработанный концентрированный раствор сывороточного альбумина к другим компонентам среды. В другом варианте реализации изобретения концентрированный раствор сывороточного альбумина дополнительно приводят в контакт с древесным углем перед тем, как добавить обработанный концентрированный раствор сывороточного альбумина к другим компонентам среды. В другом варианте реализации изобретения концентрированный раствор сывороточного альбумина сначала приводят в контакт с октаноатом натрия, затем нагревают до температуры по меньшей мере около 50°C на протяжении по меньшей мере 10 минут, затем приводят в контакт с одной или более ионообменными смолами, затем приводят в контакт с активированным древесным углем, а затем добавляют к другим компонентам среды.

Недавно было обнаружено, что трансфекция клеток с применением среды, содержащей буферный солевой раствор, аминокислоты, холестерин, гидрокортизон и сывороточный альбумин, может привести к эффективной трансфекции, и что трансфекция клеток с применением среды, в значительной степени состоящей из буферного солевого раствора, аминокислот, инсулина, трансферрина, холестерина, гидрокортизона, сывороточного альбумина и фактора роста фибробластов, может привести к эффективной трансфекции и эффективному перепрограммированию. Определенные варианты реализации изобретения, следовательно, относятся к трансфекционной среде, содержащей: буферный солевой раствор, аминокислоты, холестерин, гидрокортизон и сывороточный альбумин. Другие варианты реализации изобретения относятся к трансфекционной среде, в значительной степени состоящей из и/или содержащей: буферный солевой раствор, аминокислоты, инсулин, трансферрин, холестерин, гидрокортизон, сывороточный альбумин и фактор роста фибробластов. Другие варианты реализации изобретения относятся к перепрограммирующей среде,

в значительной степени состоящей из и/или содержащей: буферный солевой раствор, аминокислоты, инсулин, трансферрин, холестерин, гидрокортизон, сывороточный альбумин и фактор роста фибробластов. В одном варианте реализации изобретения среда также содержит полиоксиэтиленсорбитан моноолеат и/или D-альфа-токоферола ацетат. В другом варианте реализации изобретения среда также содержит аскорбиновую кислоту или аскорбиновую кислоту-2-фосфат, например, в концентрации между около 1 мг/л и около 100 мг/л. В одном варианте реализации изобретения гидрокортизон присутствует в концентрации около 1 мкМ. В другом варианте реализации изобретения фактор роста фибробластов является основным фактором роста фибробластов, и основной фактор роста фибробластов присутствует в концентрации между около 1 нг/мл и около 200 нг/мл, например, между около 4 нг/мл и около 100 нг/мл, или между около 10 нг/мл и около 50 нг/мл, или около 20 нг/мл. В одном варианте реализации изобретения сывороточный альбумин является человеческим сывороточным альбумином, и человеческий сывороточный альбумин присутствует в концентрации между около 0,05% и около 2%, включая между около 0,1% и около 1%, например, около 0,5%. В другом варианте реализации изобретения человеческий сывороточный альбумин является рекомбинантным. В другом варианте реализации изобретения холестерин присутствует в концентрации около 4,5 мг/л. В одном варианте реализации изобретения среда не содержит компонентов животного происхождения. В другом варианте реализации изобретения среда не содержит компонентов с неопределенным составом, например, жирных кислот рыбьего жира или сыворотки. В одном варианте реализации изобретения среда содержит ингибитор TGF- β , например, A83-01 или SB431542. В одном варианте реализации изобретения ингибитор TGF- β присутствует в концентрации между около 0,1 мкМ и около 10 мкМ. В одном варианте реализации изобретения среда содержит агонист Wnt-сигнального пути, такой как Wnt3a. В другом варианте реализации изобретения агонист Wnt-сигнального пути присутствует в концентрации между около 10 нг/мл и около 500 нг/мл, включая между около 50 нг/мл и около 200 нг/мл. В одном варианте реализации изобретения среда содержит источник селена, такой как селенит натрия.

В определенных ситуациях может возникать необходимость замены компонентов животного происхождения на компоненты неживотного происхождения и/или рекомбинантные компоненты, частично по причине того, что компоненты неживотного происхождения и/или рекомбинантные компоненты можно получать с более высокой степенью выдержанности, чем компоненты животного происхождения, и частично по причине того, что риск загрязнения компонентов неживотного происхождения и/или рекомбинантных компонентов токсичными и/или патогенными веществами меньше, чем для компонентов животного происхождения. Определенные варианты реализации изобретения, следовательно, относятся к белку, который имеет неживотное происхождение и/или является рекомбинантным. Другие варианты реализации изобретения относятся к среде, отличающейся тем, что некоторые или все компоненты данной среды имеют неживотное происхождение и/или являются рекомбинантными. В одном варианте реализации изобретения белок является рекомбинантным сывороточным альбумином. В другом варианте реализации изобретения белок является рекомбинантным человеческим сывороточным альбумином. В другом варианте реализации изобретения белок является рекомбинантным сывороточным альбумином, а все компоненты среды имеют неживотное происхождение и/или являются рекомбинантными.

N-конец сывороточного альбумина может содержать никель- и медь-связывающий

домен, который может являться важной антигенной детерминантой. Удаление остатка аспарагиновой кислоты с N-конца сывороточного альбумина может исключить никель- и медь-связывающую активность сывороточного альбумина и привести к образованию гипоаллергенного варианта белка. Определенные варианты реализации изобретения, следовательно, относятся к белку с модифицированными связывающими характеристиками и/или другими необходимыми характеристиками, таким как гипоаллергенность. В одном варианте реализации изобретения белок является сывороточным альбумином, а в сывороточном альбумине отсутствует N-концевая аспарагиновая кислота.

Другие варианты реализации изобретения относятся к способу трансфекции клетки. В одном варианте реализации изобретения клетку трансфицируют одной или более нуклеиновыми кислотами, а трансфекцию проводят при помощи трансфекционного реагента, такого как трансфекционный реагент на липидной основе. В одном варианте реализации изобретения одна или более нуклеиновых кислот включает по меньшей мере одну молекулу РНК. В другом варианте реализации изобретения клетку трансфицируют одной или более нуклеиновыми кислотами, а одна или более нуклеиновых кислот кодирует по меньшей мере один элемент из: р53, TERT, цитокина, секретируемого белка, мембраносвязанного белка, фермента, генно-редактирующего белка, хроматин-модифицирующего белка, ДНК-связывающего белка, транскрипционного фактора, гистондеацетилазы, патоген-ассоциированного молекулярного паттерна и опухолеассоциированного антигена, либо его биологически активный фрагмент, аналог, вариант или представителя семейства. В другом варианте реализации изобретения клетку трансфицируют многократно, например, по меньшей мере 2 раза на протяжении около 10 последовательных дней, или по меньшей мере 3 раза на протяжении около 7 последовательных дней, или по меньшей мере 4 раза на протяжении около 6 последовательных дней.

Перепрограммирование можно проводить при помощи трансфекции клеток одной или более нуклеиновыми кислотами, кодирующими один или более перепрограммирующих факторов, и культивирования клеток в среде, которая поддерживает жизнедеятельность перепрограммированных клеток. Примеры перепрограммирующих факторов включают, но не ограничиваются этим: белок Oct4, белок Sox2, белок Klf4, белок c-Myc, белок l-Myc, белок TERT, белок Nanog, белок Lin28, белок Utf1, белок Aicda, микро-РНК miR200, микро-РНК miR302, микро-РНК miR367, микро-РНК miR369 и их биологически активные фрагменты, аналоги, варианты или представителей семейств. Определенные варианты реализации изобретения, следовательно, относятся к способу перепрограммирования клетки. В одном варианте реализации изобретения клетку перепрограммируют путем трансфекции клетки одной или более нуклеиновыми кислотами, кодирующими один или более перепрограммирующих факторов. В одном варианте реализации изобретения одна или более нуклеиновых кислот включает молекулу РНК, которая кодирует белок Oct4. В другом варианте реализации изобретения одна или более нуклеиновых кислот также включает одну или более молекул РНК, которая кодирует белок Sox2, белок Klf4 и белок c-Myc. В другом варианте реализации изобретения одна или более нуклеиновых кислот также включает молекулу РНК, которая кодирует белок Lin28. В одном варианте реализации изобретения клетка является человеческой клеткой кожи, а человеческую клетку кожи перепрограммируют в полипотентную стволовую клетку. В другом варианте реализации изобретения клетка является человеческой клеткой кожи, а человеческую клетку кожи перепрограммируют в глюкозозависимую инсулин-

продуцирующую клетку. Примеры других клеток, которые можно перепрограммировать, и других клеток, в которые клетку можно перепрограммировать, включают, но не ограничиваются этим: клетки кожи, полипотентные стволовые клетки, мезенхимные стволовые клетки, β -клетки, ретинальные пигментные эпителиальные клетки, гемопоэтические клетки, сердечные клетки, эпителиальные клетки верхних дыхательных путей, нейральные стволовые клетки, нейроны, глиальные клетки, костные клетки, клетки крови и стволовые клетки зубной пульпы. В других вариантах реализации изобретения клетку культивируют в среде, которая поддерживает жизнедеятельность перепрограммированной клетки. В одном варианте реализации изобретения среда также поддерживает жизнедеятельность клетки.

Сообщалось о важном факте, который состоит в том, что инфицирование клеток вирусами, кодирующими Oct4, Sox2, Klf4 и c-Мус в комбинации с культивированием клеток в среде, которая способствует росту кардиомиоцитов, приводит к перепрограммированию клеток кожи в кардиомиоциты без предварительного перепрограммирования клеток кожи в полипотентные стволовые клетки (*Смотрите Efs et al/Nat Cell Biol.* 2011; 13:215-22, содержание которой включено в данный текст посредством ссылки). В определенных ситуациях, например, при разработке индивидуального терапевтического препарата, может быть необходимым прямое перепрограммирование (перепрограммирование одной соматической клетки в другую соматическую клетку без предварительного перепрограммирования соматической клетки в полипотентную стволовую клетку, также известное как "трансдифференцировка"), частично из-за того, что культивирование полипотентных стволовых клеток может требовать продолжительного времени и высоких затрат, дополнительная обработка, требуемая для создания и оценки стабильной линии полипотентных стволовых клеток, может нести повышенный риск загрязнения, а дополнительное время в процессе культивирования, связанное с изначальным получением полипотентных стволовых клеток, может нести повышенный риск геномной нестабильности и появления мутаций, включая точечные мутации, вариации числа копий и кариотипические нарушения. Определенные варианты реализации изобретения, следовательно, относятся к способу перепрограммирования соматической клетки, в котором клетку перепрограммируют в соматическую клетку, и в котором не формируется характерная линия полипотентных стволовых клеток.

Известные ранее способы перепрограммирования клеток путем их трансфекции РНК, кодирующей перепрограммирующие факторы, требуют применения фидеров. Во многих ситуациях применение фидеров может быть нежелательным, частично потому, что фидеры могут быть получены из животных или алогенных ресурсов и, таким образом, могут нести риск иммуногенности и загрязнения патогенами. Недавно было обнаружено, что с помощью среды, являющейся объектом настоящего изобретения, можно осуществить перепрограммирование РНК в отсутствие фидеров. Дополнительно было обнаружено, что перепрограммирование клеток согласно способам настоящего изобретения, в котором клетки не приводят в контакт с фидерами, может быть быстрым, эффективным и надежным. Определенные варианты реализации изобретения, следовательно, относятся к способу перепрограммирования клетки, в котором клетку не приводят в контакт с фидерами.

Недавно было обнаружено, что эффективность перепрограммирования может коррелировать с начальной плотностью клеток, в случае, когда клетки перепрограммируют согласно способам настоящего изобретения. Определенные варианты реализации изобретения, следовательно, относятся к способу

перепрограммирования клеток, в котором клетки высевает с плотностью между около 100 клеток/см² и около 100,000 клеток/см². В одном варианте реализации изобретения клетки высевает с плотностью между около 100 клеток/см² и около 10,000 клеток/см²,
 5 или между около 2000 клеток/см² и около 20,000 клеток/см², или между около 1000 клеток/см² и около 2000 клеток/см².

Дополнительно было обнаружено, что в некоторых ситуациях для перепрограммирования клетки согласно способам настоящего изобретения может требоваться меньшее общее количество трансфекций, чем при других способах.
 10 Определенные варианты реализации изобретения, следовательно, относятся к способу перепрограммирования клетки, в котором на протяжении около 20 последовательных дней проводят от около 2 до около 12 трансфекций, или на протяжении около 15 последовательных дней проводят от около 4 до около 10 трансфекций, или на протяжении около 10 последовательных дней проводят от около 4 до около 8 трансфекций. Известно, что когда в среду, в которой культивируют клетку, добавляют нуклеиновые кислоты, с большей вероятностью может произойти контакт и/или поглощение клеткой более чем одной молекулы нуклеиновой кислоты, как
 15 одновременно, так и в разное время. Соответственно, клетка может контактировать с нуклеиновой кислотой более одного раза, т.е., неоднократно, даже в случае, когда
 20 нуклеиновые кислоты только один раз добавляют в среду, в которой культивируют клетку.

Фидеры могут способствовать адгезии клеток к поверхности, секретируя молекулы, такие как коллаген, которые связываются с поверхностью ("молекулы клеточной адгезии"). Белки, включая интегрины, находясь на поверхности клеток, могут
 25 связываться с этими молекулами клеточной адгезии, что может привести к прикреплению клеток к поверхности. Недавно было обнаружено, что клетки можно перепрограммировать, в том числе в отсутствие фидеров, при помощи покрытия поверхности одной или более молекулами клеточной адгезии. Дополнительно было обнаружено, что такие молекулы клеточной адгезии как фибронектин и витронектин
 30 особенно хорошо подходят для этой цели. Определенные варианты реализации изобретения, следовательно, относятся к способу трансфекции, перепрограммирования и/или генного редактирования клетки, в котором клетку приводят в контакт с поверхностью, которую приводят в контакт с одной или более молекулами клеточной адгезии. В одном варианте реализации изобретения одна или более из молекул клеточной адгезии включает по меньшей мере одно соединение из: поли-L-лизина, поли-L-орнитина, RGD-пептида, фибронектина, витронектина, коллагена и ламинина, либо его биологически активный фрагмент, аналог, вариант или представителя семейства. В другом варианте реализации изобретения одна или более из молекул клеточной адгезии является фибронектином или его биологически активным фрагментом. В другом
 40 варианте реализации изобретения фибронектин является рекомбинантным. В другом варианте реализации изобретения одна или более из молекул клеточной адгезии представляют собой смесь фибронектина и витронектина или их биологически активных фрагментов. В другом варианте реализации изобретения фибронектин и витронектин
 45 каждый присутствуют на поверхности в концентрации около 100 нг/см² или в растворе, который применяют для покрытия поверхности, в концентрации около 1 мкг/мл. В другом варианте реализации изобретения фибронектин и витронектин являются рекомбинантными. Приведение поверхности в контакт с одной или более молекулами клеточной адгезии можно проводить как независимый этап и/или путем добавления

одной или более молекул клеточной адгезии в среду.

Следует отметить, что нуклеиновые кислоты могут содержать один или более неканонических или "модифицированных" остатков (например, остатков, которые не являются аденином, гуанином, тиминном, урацилом и цитозином или их стандартными нуклеозидными, нуклеотидными, дезоксинуклеозидными или дезоксинуклеотидными производными). В особенности следует отметить, что уридин-5'-трифосфат можно заменить на псевдоуридин-5'-трифосфат в реакции *in vitro* транскрипции, чтобы получить синтетическую РНК, отличающуюся тем, что до 100% остатков уридина синтетической РНК можно заменить остатками псевдоуридина. При помощи *in vitro* транскрипции можно получить РНК с иммуногенностью остатков, даже когда уридин и цитидин полностью заменены псевдоуридином и 5-метилцитидином соответственно (*Смотрите Angel Reprogramming Human Somatic Cells to Pluripotency Using RNA [Doctoral Thesis]. Cambridge, MA: MIT; 2011, содержание которой включено в данный текст посредством ссылки*). По этой причине при трансфекции клеток РНК обычно применяют добавление в трансфекционную среду иммунодепрессанта. В некоторых ситуациях добавление в трансфекционную среду иммунодепрессанта может быть нежелательным, частично из-за того, что наиболее часто применяемый для этой цели рекомбинантный иммунодепрессант В18R может быть дорогостоящим и труднопроизводимым. Недавно было обнаружено, что клетки можно трансфицировать и/или перепрограммировать согласно способам настоящего изобретения без применения В18R или любого другого иммунодепрессанта. Дополнительно было обнаружено, что перепрограммирование клеток согласно способам настоящего изобретения без применения иммунодепрессантов может быть быстрым, эффективным и надежным. Определенные варианты реализации изобретения, следовательно, относятся к способу трансфекции клетки, в котором трансфекционная среда не содержит иммунодепрессант. Другие варианты реализации изобретения, следовательно, относятся к способу перепрограммирования клетки, в котором трансфекционная среда не содержит иммунодепрессант. В определенных ситуациях, например, при применении высокой клеточной плотности, добавление иммунодепрессанта в трансфекционную среду может быть полезным. Определенные варианты реализации изобретения, следовательно, относятся к способу трансфекции клетки, в котором трансфекционная среда содержит иммунодепрессант. Другие варианты реализации изобретения относятся к способу перепрограммирования клетки, в котором трансфекционная среда содержит иммунодепрессант. В одном варианте реализации изобретения иммунодепрессант является В18R либо его биологически активным фрагментом, аналогом, вариантом или представителем семейства или дексаметазоном либо его производным. В одном варианте реализации изобретения клетки высевают с плотностью, составляющей менее чем около 20,000 клеток/см², а трансфекционная среда не содержит иммунодепрессант. В другом варианте реализации изобретения трансфекционная среда не содержит иммунодепрессант, а дозировку нуклеиновой кислоты подбирают так, чтобы избежать излишней токсичности. В другом варианте реализации изобретения дозировка нуклеиновой кислоты составляет менее чем 2 мкг/лунку 6-луночного планшета, например, около 0,25 мкг/лунку 6-луночного планшета или около 1 мкг/лунку 6-луночного планшета.

Перепрограммированные клетки, полученные согласно определенным способам настоящего изобретения, подходят для терапевтических применений, включая трансплантацию пациентам, так как они не содержат экзогенных последовательностей ДНК и не подвержены действию продуктов животного или человеческого происхождения, состав которых может быть неопределенным, и которые могут

содержать токсичные и/или патогенные примеси. Более того, высокая скорость, эффективность и надежность определенных способов настоящего изобретения может снизить риск появления и накопления мутаций и других хромосомных аномалий.

Определенные варианты реализации настоящего изобретения можно, таким образом, применять для получения клеток с приемлемым профилем безопасности для применения в терапевтических целях. Например, путем перепрограммирования клеток при помощи РНК и среды согласно настоящему изобретению, отличающейся тем, что среда не содержит компонентов животного или человеческого происхождения, можно получить клетки, которые не подвергались действию аллогенных веществ. Определенные варианты реализации изобретения, следовательно, относятся к перепрограммированным клеткам, которые имеют необходимый профиль безопасности. В одном варианте реализации изобретения перепрограммированная клетка обладает нормальным кариотипом. В другом варианте реализации изобретения перепрограммированная клетка содержит менее чем около 5 вариаций числа копий (ВЧК) по сравнению с геномом пациента, например, менее чем около 3 вариаций числа копий по сравнению с геномом пациента, или не содержит вариаций числа копий по сравнению с геномом пациента. В другом варианте реализации изобретения перепрограммированная клетка обладает нормальным кариотипом и содержит менее чем около 100 одиночных нуклеотидных вариантов на кодирующих участках по сравнению с геномом пациента, или менее чем около 50 одиночных нуклеотидных вариантов на кодирующих участках по сравнению с геномом пациента, или менее чем около 10 одиночных нуклеотидных вариантов на кодирующих участках по сравнению с геномом пациента.

Эндотоксины и нуклеазы могут проходить совместную очистку и/или связываться с другими белками, такими как сывороточный альбумин. В частности, рекомбинантные белки могут содержать высокие уровни ассоциированных эндотоксинов и нуклеаз, частично из-за лизиса клеток, который может происходить во время их получения. Эндотоксины и нуклеазы можно уменьшить в количестве, удалить, заменить или каким-либо другим способом инактивировать при помощи многих способов настоящего изобретения, включая, например, ацетилирование, добавление стабилизатора, такого как октаноат натрия с последующей тепловой обработкой, добавление ингибиторов нуклеазы в раствор альбумина и/или среду, кристаллизацию, приведение в контакт с одной или более ионообменными смолами, приведение в контакт с древесным углем, препаративный электрофорез или аффинную хроматографию. Недавно было обнаружено, что частичное или полное уменьшение количества, удаление, замена или инактивация каким-либо другим способом эндотоксинов и/или нуклеаз в среде и/или в одном или более компонентах среды может повысить эффективность, с которой клетки могут быть трансфицированы и перепрограммированы. Определенные варианты реализации изобретения, следовательно, относятся к способу трансфекции клетки одной или более нуклеиновыми кислотами, в котором трансфекционную среду обрабатывают для того, чтобы частично либо полностью уменьшить в количестве, удалить, заменить или каким-либо другим способом инактивировать один или более эндотоксинов и/или нуклеаз. Другие варианты реализации изобретения относятся к среде, в которой происходит минимальная деградация нуклеиновых кислот. В одном варианте реализации изобретения данная среда содержит менее чем около 1 единицы эндотоксина на мЛ, или менее чем около 0,1 единицы эндотоксина на мЛ, или менее чем около 0,01 единицы эндотоксина на мЛ.

В определенных ситуациях липидные носители на белковой основе, такие как сывороточный альбумин, можно заменить липидными носителями на небелковой

основе, такими как метил-бета-циклодекстрин. Среду, являющуюся объектом настоящего изобретения, также можно применять без липидного носителя, например, когда трансфекцию проводят способом, который может не требовать или для которого может не быть выгодным присутствие липидного носителя, например, при использовании
 5 одного или более трансфекционных реагентов на полимерной основе или трансфекционных реагентов на белковой основе.

Многие ассоциированные с белком молекулы, такие как металлы, могут быть высокотоксичными для клеток. Эта токсичность может являться причиной сниженной жизнеспособности в культуре, а также появления мутаций. Определенные варианты
 10 реализации изобретения, следовательно, имеют дополнительное преимущество, состоящее в получении клеток, в которых отсутствуют токсичные молекулы.

Компонент белка, содержащий ассоциированные молекулы можно оценить путем растворения белка в растворе и измерения проводимости раствора. Определенные варианты реализации изобретения, следовательно, относятся к среде, содержащей белок,
 15 в которой приблизительно 10% раствор белка в воде имеет проводимость менее чем около 500 мкСм/см. В одном варианте реализации изобретения раствор имеет проводимость менее чем около 50 мкСм/см.

Окружающая среда с низким содержанием кислорода может быть благоприятной для культивирования многих типов клеток. Определенные варианты реализации
 20 изобретения, следовательно, относятся к способу культивирования, трансфекции, перепрограммирования и/или генного редактирования клеток, в котором клетки культивируют, трансфицируют, перепрограммируют и/или генетически редактируют в среде с низким содержанием кислорода. В одном варианте реализации изобретения среда с низким содержанием кислорода содержит между около 2% и около 10%
 25 кислорода или между около 4% и около 6% кислорода.

Количество доставленной в клетки нуклеиновой кислоты можно увеличить для того, чтобы увеличить необходимый эффект от нуклеиновой кислоты. При этом увеличение количества доставленной в клетки нуклеиновой кислоты выше определенной величины может привести к снижению жизнеспособности клеток, частично по причине токсичности
 30 трансфекционного реагента. Недавно было обнаружено, что когда нуклеиновую кислоту доставляют в клеточную популяцию в фиксированном объеме (например, клетки на участке ткани или клетки, выращенные в емкости для культивирования клеток), количество доставляемой в каждую клетку нуклеиновой кислоты может зависеть от общего количества нуклеиновой кислоты, доставляемой в клеточную популяцию, и от
 35 плотности клеток, когда более высокая плотность клеток приводит к меньшему количеству доставляемой в каждую клетку нуклеиновой кислоты. В определенных вариантах реализации изобретения клетку трансфицируют одной или более нуклеиновыми кислотами более одного раза. В определенных условиях, например, в случае пролиферации клеток, плотность клеток может изменяться от одной трансфекции
 40 к следующей. Определенные варианты реализации изобретения, следовательно, относятся к способу трансфекции клетки нуклеиновой кислотой, в котором клетку трансфицируют более одного раза, и в котором количество доставляемой в клетку нуклеиновой кислоты отличается для двух трансфекций. В одном варианте реализации изобретения клетка пролиферирует между двумя трансфекциями, а количество
 45 доставляемой в клетку нуклеиновой кислоты является большим для второй из двух трансфекций, чем для первой из двух трансфекций. В другом варианте реализации изобретения клетку трансфицируют более двух раз, а количество доставляемой в клетку нуклеиновой кислоты является большим для второй из трех трансфекций, чем для

первой из тех же трех трансфекций, и количество доставляемой в клетку нуклеиновой кислоты является большим для третьей из тех же трех трансфекций, чем для второй из тех же трех трансфекций. В другом варианте реализации изобретения клетку трансфицируют более одного раза, а максимальное количество доставляемой в клетку во время каждой трансфекции нуклеиновой кислоты является в достаточной мере низким для того, чтобы достичь приблизительно 80% жизнеспособности для по меньшей мере двух последовательных трансфекций.

Недавно было обнаружено, что изменение количества нуклеиновой кислоты, доставляемой в популяцию пролиферирующих клеток на протяжении ряда трансфекций, может привести как к повышенной эффективности нуклеиновой кислоты, так и повышенной жизнеспособности клеток. Дополнительно было обнаружено, что в некоторых ситуациях, когда клетки приводят в контакт с одной или более нуклеиновыми кислотами, кодирующими один или более перепрограммирующих факторов на протяжении ряда трансфекций, эффективность перепрограммирования можно повысить, если количество нуклеиновой кислоты, доставляемой во время более поздних трансфекций является большим, чем количество нуклеиновой кислоты, доставляемой во время более ранних трансфекций, по меньшей мере для части трансфекций.

Определенные варианты реализации изобретения, следовательно, относятся к способу перепрограммирования клеток, в котором одну или более нуклеиновых кислот неоднократно доставляют в клетку на протяжении ряда трансфекций, а количество доставляемой в клетку нуклеиновой кислоты является большим для по меньшей мере одной из более поздних трансфекций, чем для по меньшей мере одной из более ранних трансфекций. В одном варианте реализации изобретения клетку трансфицируют от около 2 до около 10 раз, или от около 3 до около 8 раз, или от около 4 до около 6 раз.

В другом варианте реализации изобретения одна или более нуклеиновых кислот включают по меньшей мере одну молекулу РНК, клетку трансфицируют от около 2 до около 10 раз, а количество нуклеиновой кислоты, доставляемой в клетку во время каждой трансфекции, является одинаковым или большим, чем количество нуклеиновой кислоты, доставляемой в клетку во время наиболее поздней из предыдущих трансфекций.

В другом варианте реализации изобретения количество нуклеиновой кислоты, доставляемой в клетку во время первой трансфекции, составляет между около 20 нг/см² и около 250 нг/см² или между около 100 нг/см² и около 600 нг/см². В другом варианте реализации изобретения клетку трансфицируют около 5 раз с интервалами, составляющими от около 12 до около 48 часов, а количество нуклеиновой кислоты, доставляемой в клетку, составляет около 25 нг/см² для первой трансфекции, около 50 нг/см² для второй трансфекции, около 100 нг/см² для третьей трансфекции, около 200 нг/см² для четвертой трансфекции и около 400 нг/см² для пятой трансфекции. В другом варианте реализации изобретения клетку дополнительно трансфицируют по меньшей мере один раз после пятой трансфекции, а количество нуклеиновой кислоты, доставляемой в клетку, составляет около 400 нг/см².

Определенные варианты реализации изобретения относятся к способу трансфекции клетки нуклеиновой кислотой, в котором количество нуклеиновой кислоты определяют, измеряя плотность клеток и выбирая количество нуклеиновой кислоты для трансфекции на основе измеренной плотности клеток. В одном варианте реализации изобретения клетка находится в *in vitro* культуре, а плотность клеток измеряют оптическими методами. В другом варианте реализации изобретения клетку трансфицируют неоднократно, плотность клеток увеличивается в промежутке между двумя

трансфекциями, а количество трансфицируемой нуклеиновой кислоты является большим для второй из двух трансфекций, чем для первой из двух трансфекций.

Недавно было обнаружено, что в некоторых ситуациях эффективность трансфекции и жизнеспособность клеток, культивируемых в среде согласно настоящему изобретению, можно повысить путем кондиционирования среды. Определенные варианты реализации изобретения, следовательно, относятся к способу кондиционирования среды. Другие варианты реализации изобретения относятся к среде, которую кондиционируют. В одном варианте реализации изобретения фидеры являются фибробластами, а среду кондиционируют приблизительно на протяжении 24 часов. Другие варианты реализации изобретения относятся к способу трансфекции клетки, в котором трансфекционную среду кондиционируют. Другие варианты реализации изобретения относятся к способу перепрограммирования и/или генного редактирования клетки, в котором среду кондиционируют. В одном варианте реализации изобретения фидеры являются митотически инактивированными, например, при помощи обработки химическим веществом, таким как митомицин-С, или при помощи радиоактивного облучения. В определенных вариантах реализации изобретения может быть более выгодным использование только аутологических материалов, частично для того, как можно привести в качестве примера и не ограничивая себя теорией, чтобы избежать риска передачи заболевания от фидеров к клетке. Определенные варианты реализации изобретения, следовательно, относятся к способу трансфекции клетки, в котором трансфекционную среду кондиционируют, и в котором фидеры получены из того же организма, что и трансфицируемая клетка. Другие варианты реализации изобретения относятся к способу перепрограммирования и/или генного редактирования клетки, в котором среду кондиционируют, и в котором фидеры получены из того же организма, что и перепрограммируемая и/или генетически редактируемая клетка.

Путем кондиционирования в среду можно добавить несколько молекул. Определенные варианты реализации изобретения, следовательно, относятся к среде, в которую добавлены одна или более молекул, которые присутствуют в кондиционированной среде. В одном варианте реализации изобретения в среду добавляют Wnt1, Wnt2, Wnt3, Wnt3a либо их биологически активный фрагмент, аналог, вариант, агонист или представителя семейства. В другом варианте реализации изобретения в среду добавляют TGF- β либо его биологически активный фрагмент, аналог, вариант, агонист или представителя семейства. В другом варианте реализации изобретения клетку перепрограммируют согласно способу настоящего изобретения, при этом в среду не добавляют TGF- β на протяжении от около 1 и до около 5 дней, а затем добавляют TGF- β на протяжении по меньшей мере около 2 дней. В другом варианте реализации изобретения в среду добавляют IL-6, IL-6R либо их биологически активный фрагмент, аналог, вариант, агонист или представителя семейства. В другом варианте реализации изобретения в среду добавляют сфинголипид или жирную кислоту. В другом варианте реализации изобретения сфинголипид является лизофосфатидной кислотой, лизосфингомиелином, сфингозин-1-фосфатом либо их биологически активным аналогом, вариантом или производным.

Дополнительно к митотической инактивации клеток в определенных условиях генную экспрессию клеток может изменить облучение, приводя к тому, что клетки вырабатывают меньшее количество определенных белков и большее количество других определенных белков, чем необлученные клетки, например, представителей семейства белков Wnt. Вдобавок, определенные представители семейства белков Wnt могут стимулировать рост и трансформацию клеток. Недавно было обнаружено, что в

некоторых ситуациях эффективность перепрограммирования РНК можно значительно повысить путем приведения клетки в контакт со средой, которая является кондиционированной при помощи облученных фидеров вместо фидеров, обработанных митомицином-с. Дополнительно было обнаружено, что повышение эффективности перепрограммирования, наблюдаемой при применении облученных фидеров, происходит частично по причине секретируемых фидерами белков Wnt. Определенные варианты реализации изобретения, следовательно, относятся к способу перепрограммирования клетки, в котором клетку приводят в контакт с Wnt1, Wnt2, Wnt3, Wnt3a либо их биологически активным фрагментом, аналогом, вариантом, представителем семейства или агонистом, включая агонистов низлежащих мишеней белков Wnt, и/или веществами, которые имитируют один или более биологических эффектов белков Wnt, например, 2-амино-4-[3,4-(метилэтилендиокси)бензиламино]-6-(3-метоксифенил)пиримидином.

Недавно было обнаружено, что среду, являющуюся объектом настоящего изобретения, можно использовать для поддержания жизнедеятельности клеток, включая фибробласты и человеческие полипотентные стволовые клетки, в культуре (т.е., в качестве "поддерживающей среды"). Определенные варианты реализации изобретения, следовательно, относятся к среде, которую используют в качестве поддерживающей среды. В одном варианте реализации изобретения данная среда не содержит каких-либо компонентов человеческого происхождения. В другом варианте реализации изобретения состав среды химически определен.

Из-за низкой эффективности многих способов перепрограммирования на основе ДНК эти способы могут быть трудно или невозможно применять к клеткам, полученным из образцов пациентов, в которых может содержаться лишь небольшое количество клеток. И наоборот, высокая эффективность определенных вариантов реализации настоящего изобретения может дать возможность надежного перепрограммирования небольшого количества клеток, начиная с одиночных клеток. Определенные варианты реализации изобретения, следовательно, можно применять для того, чтобы перепрограммировать клетки из биопсийного образца, в том числе без предварительного создания большой культуры. Перепрограммирование клеток прямо из биопсийного образца может быть необходимым в определенных ситуациях, например, при разработке индивидуального терапевтического препарата, частично из-за того, что создание большой культуры первичных клеток может требовать продолжительного времени, дополнительная обработка, требуемая для создания большой культуры, может нести повышенный риск загрязнения, а дополнительное время в процессе культивирования может нести повышенный риск геномной нестабильности и появления мутаций, включая точечные мутации, вариации числа копий и кариотипические нарушения. Определенные варианты реализации изобретения, следовательно, относятся к способу перепрограммирования клетки, включающему получение клетки от пациента или из биопсийного образца и последующее перепрограммирование клетки. В одном варианте реализации изобретения клетку перепрограммируют без предварительного создания большой культуры, а первую трансфекцию проводят предпочтительно до того, как культуру перевивают более двух раз. В другом варианте реализации изобретения клетку получают от пациента, а первую трансфекцию проводят не позднее, чем приблизительно через 14 дней после того, как клетка была высеяна в первый раз. В другом варианте реализации изобретения клетку получают из биопсийного образца, а первую трансфекцию проводят не позднее, чем приблизительно через 7 дней после того, как клетка была высеяна в первый раз. В другом варианте реализации изобретения биопсийный образец является полнослойным биопсийным образцом, полученным при

помощи дерматома, клетку получают из биопсийного образца путем обработки одним или более ферментами, клетку высеивают на поверхность, которая покрыта одной или более молекулами клеточной адгезии, и/или клетку высеивают в среду, которая содержит молекулу клеточной адгезии, клетку трансфицируют одной или более нуклеиновыми кислотами, содержащими по меньшей мере одну молекулу РНК, а первую трансфекцию проводят не позднее, чем приблизительно через 14 дней после того, как клетка была высеяна в первый раз. В другом варианте реализации изобретения фермент является коллагеназой. В другом варианте реализации изобретения коллагеназа не содержит компонентов животного происхождения. В другом варианте реализации изобретения коллагеназа присутствует в концентрации, составляющей между около 0,1 мг/мл и около 10 мг/мл или между около 0,5 мг/мл и около 5 мг/мл. В другом варианте реализации изобретения клетку получают из крови. В другом варианте реализации изобретения клетку высеивают в среду, содержащую один или более белков, которые получены из крови пациента. В другом варианте реализации изобретения клетку высеивают в среду, содержащую DMEM/F12+2 mM L-аланил-L-глутамин+от около 5% до около 25% полученной от пациента сыворотки, или от около 10% до около 20% полученной от пациента сыворотки, или около 20% полученной от пациента сыворотки.

Недавно было обнаружено, что в некоторых ситуациях трансфекция клеток, содержащих смесь РНК, кодирующей Oct4, Sox2, Klf4 и c-Myc, с применением среды, являющейся объектом настоящего изобретения, может привести к возрастанию скорости пролиферации клеток. Когда количество доставляемой в клетки РНК является слишком низким для гарантии того, что все клетки трансфицированы, повышенную скорость пролиферации может демонстрировать только часть клеток. В определенных ситуациях, например, при разработке индивидуального терапевтического препарата, повышение скорости пролиферации клеток может быть желательным, частично потому, что таким образом можно уменьшить время, необходимое для создания терапевтического препарата, и, следовательно, можно уменьшить стоимость терапевтического препарата. Определенные варианты реализации изобретения, следовательно, относятся к способу трансфекции клетки смесью РНК, кодирующей Oct4, Sox2, Klf4 и c-Myc, в котором клетка демонстрирует повышенную скорость пролиферации. В одном варианте реализации изобретения клетки, демонстрирующие повышенную скорость пролиферации, выделяют из культуры. В другом варианте реализации изобретения клетки, демонстрирующие повышенную скорость пролиферации, увеличивают в количестве и культивируют в среде, которая способствует росту одного или более типов клеток, и перепрограммируют в клетку, принадлежащую одному или более типам клеток.

Многие заболевания связаны с наличием одной или более мутаций. Мутации можно исправить путем приведения клетки в контакт с нуклеиновой кислотой, которая кодирует белок, который либо отдельно, либо в комбинации с другими молекулами исправляет мутацию (пример генного редактирования). Примеры таких белков включают: цинк-пальцевые нуклеазы и TALENs. Определенные варианты реализации изобретения, следовательно, относятся к способу трансфекции клетки нуклеиновой кислотой, в котором нуклеиновая кислота кодирует белок, который либо отдельно, либо в комбинации с другими молекулами, создает одноцепочечный или двухцепочечный разрыв в молекуле ДНК. В одном варианте реализации изобретения белок является цинк-пальцевой нуклеазой или TALEN. В другом варианте реализации изобретения нуклеиновая кислота является молекулой РНК. В другом варианте реализации изобретения одноцепочечный или двухцепочечный разрыв составляет около 5,000,000 оснований сайта инициации транскрипции гена, выбранного из группы: CCR5, CXCR4,

GAD1, GAD2, CFTR, HBA1, HBA2, HBB, HBD, FANCA, XPA, XPB, XPC, ERCC2, POLH, HTT, DMD, SOD1, APOE, PRNP, BRCA1 и BRCA2, его их аналога, варианта и представителя семейства. В другом варианте реализации изобретения клетку трансфицируют нуклеиновой кислотой, которая действует как репарационная матрица, обеспечивая инсерцию последовательности ДНК на участке одноцепочечного или двухцепочечного разрыва либо обеспечивая какое-либо другое изменение последовательности ДНК на участке одноцепочечного или двухцепочечного разрыва. В другом варианте реализации изобретения проводят перепрограммирование клетки и последовательное геномное редактирование. В другом варианте реализации изобретения проводят геномное редактирование клетки и последовательное перепрограммирование. В другом варианте реализации изобретения геномное редактирование и перепрограммирование проводят с интервалом между ними, составляющим около 7 дней. В другом варианте реализации изобретения геномное редактирование и перепрограммирование происходит одновременно или в один день. В другом варианте реализации изобретения клетка является клеткой кожи, клетку кожи генетически редактируют для того, чтобы разрушить ген CCR5, клетку кожи перепрограммируют в гемопоэтическую стволовую клетку, создавая, таким образом, терапевтический препарат против ВИЧ/СПИД, а терапевтический препарат вводят пациенту вместе с ВИЧ/СПИД. В другом варианте реализации изобретения клетка кожи получена от того же пациента, которому вводят терапевтический препарат.

Гены, которые можно редактировать согласно способам настоящего изобретения для того, чтобы создавать терапевтические препараты согласно настоящему изобретению, включают гены, которые можно редактировать так, чтобы сохранить их нормальную функцию, а также гены, которые можно редактировать так, чтобы снизить или элиминировать их функцию. Такие гены включают, но не ограничиваются этим, бета глобин (HBB), мутации в котором могут привести к серповидноклеточной анемии (СКА) и β -талассемии, ген рака груди 1 с ранним началом (BRCA1) и рака груди 2 с ранним началом (BRCA2), мутации в которых могут усилить подверженность раку груди, С-С хемокиновый рецептор типа 5 (CCR5) и С-Х-С хемокиновый рецептор типа 4 (CXCR4), мутации в которых могут придавать устойчивость к ВИЧ инфекции, муковисцидозный трансмембранный регулятор (CFTR), мутации в котором могут привести к кистозному фиброзу, дистрофин (DMD), мутации в котором могут привести к мышечной дистрофии, включая мышечную дистрофию Дюшенна и мышечную дистрофию Беккера, глутамат декарбоксилазу 1 и глутамат декарбоксилазу 2 (GAD1, GAD2), мутации в которых могут препятствовать аутоиммунному разрушению β -клеток, гемоглобин альфа 1, гемоглобин альфа 2 и гемоглобин дельта (HBA1, HBA2 и HBD), мутации в которых могут привести к талассемии, Хантингтон (HTT), мутации в котором могут привести к хорее Хантингтона, супероксиддисмутазу 1 (SOD1), мутации в котором могут привести к амиотрофическому боковому склерозу (ALS), XPA, XPB, XPC, XPD (ERCC6) и полимеразу (ДНК-направленную), эта (POLH), мутации в котором могут привести к пигментной ксеродерме, богатую лейцином повторную киназу 2 (LRRK2), мутации в котором могут привести к болезни Паркинсона и анемии Фанкони, комплементационные группы A, B, C, D1, D2, E, F, G, I, J, L, M, N, P (FANCA, FANCB, FANCC, FANCD1, FANCD2, FANCE, FANCF, FANCG, FANCI, FANCI, FANCL, FANCM, FANCN, FANCP), и гомолог RAD51 C (*S. cerevisiae*) (RAD51C), мутации в котором могут привести к анемии Фанкони.

Определенные варианты реализации изобретения относятся к терапевтическому препарату, содержащему нуклеиновую кислоту, которая кодирует один или более

редактирующих гены белков. Другие варианты реализации изобретения относятся к терапевтическому препарату, содержащему одну или более клеток, которые являются трансфицированными, перепрограммированными и/или генетически отредактированными согласно способам настоящего изобретения. В одном варианте реализации изобретения клетка является трансфицированной, перепрограммированной и/или генетически отредактированной, и трансфицированную, перепрограммированную и/или генетически отредактированную клетку вводят пациенту. В другом варианте реализации изобретения клетку получают от того же пациента, которому вводят трансфицированную, перепрограммированную и/или генетически отредактированную клетку. Примеры заболеваний, которые можно лечить при помощи терапевтических препаратов, являющихся объектами настоящего изобретения, включают, но не ограничиваются этим болезнь Альцгеймера, повреждение спинного мозга, амиотрофический боковой склероз, кистозный фиброз, сердечную недостаточность, включая ишемическую и дилатационную кардиомиопатию, макулярную дегенерацию, болезнь Паркинсона, болезнь Хантингтона, диабет, серповидноклеточную анемию, талассемию, анемию Фанкони, пигментную ксеродерму, мышечную дистрофию, тяжелый комбинированный иммунодефицит, радикулярную сенсорную наследственную невропатию, рак и ВИЧ/СПИД. В определенных вариантах реализации изобретения клетку получают от пациента, клетку перепрограммируют и смешивают с большим количеством жировых клеток, создавая, таким образом, косметическое средство, а косметическое средство вводят пациенту. В других вариантах реализации изобретения косметическое средство применяют для восстановления ткани.

Хотя приведенные в данном тексте детальные примеры описывают создание специфических типов клеток и создание терапевтических препаратов, содержащих специфические типы клеток, понятно, что способы согласно данному изобретению можно применять для того, чтобы создавать множество других типов клеток и терапевтических препаратов, содержащих одну или более из множества других типов клеток, например, путем перепрограммирования клеток согласно способам настоящего изобретения и культивирования клеток в условиях, которые повторяют один или более из аспектов получения, путем создания условий, которые схожи с условиями клеточной микросреды во время получения.

Определенные варианты реализации изобретения относятся к библиотеке клеток, содержащей множество типов антигенов лейкоцитов человека (HLA - от англ. "human leukocyte antigen") ("HLA-библиотеки"). HLA-библиотека может быть полезной, частично потому, что она может обеспечить быстрое создание и/или распространение терапевтических препаратов без ожидания пациентом создания терапевтического препарата из клетки пациента. Такая библиотека может быть частично полезной в лечении сердечной недостаточности и заболеваний крови и/или иммунной системы, так как возможность немедленного приобретения терапевтического препарата удобна для пациентов.

Определенные варианты реализации изобретения относятся к клетке, которая используется для моделирования ткани/органа или для моделирования заболевания. В одном варианте реализации изобретения клетку кожи перепрограммируют и смешивают с большим количеством сердечных клеток, а сердечные клетки используют для скрининга биоактивных молекул на предмет кардиотоксичности (пример испытания на безвредность). В другом варианте реализации изобретения клетку кожи от пациента с болезнью Альцгеймера перепрограммируют и смешивают с большим количеством кортикальных нейронов, а кортикальные нейроны используют для скрининга

биоактивных молекул на предмет снижения накопления нерастворимых бляшек (пример испытание на эффективность). Определенные варианты реализации изобретения, следовательно, полезны для испытаний на безвредность и/или испытаний на эффективность.

5 Определенные варианты реализации изобретения относятся к способу инкапсуляции клеток и/или высевания клеток на матрицу и к клеткам, которые инкапсулированы и/или высеяны на матрицу. В определенных ситуациях инкапсуляция клеток может быть выгодной, частично потому что инкапсулированные клетки могут оказаться менее иммуногенными, чем неинкапсулированные клетки. В одном варианте реализации
10 изобретения клетку перепрограммируют в глюкозозависимую инсулин-продуцирующую клетку, глюкозозависимую инсулин-продуцирующую клетку инкапсулируют в вещество, таком как альгинат, а инкапсулированную глюкозозависимую инсулин-продуцирующую клетку вводят пациенту с диабетом 1 типа. В другом варианте реализации изобретения введение осуществляется путем внутривенной инъекции или интрапортальной
15 инъекции. В определенных ситуациях высевание клеток на матрицу может быть выгодным, частично потому что матрица может обеспечить механическую устойчивость. В одном варианте реализации изобретения клетку перепрограммируют и смешивают с большим количеством фибробластов и кератиноцитов, фибробласты и кератиноциты высевают на матрицу, содержащую коллаген, а засеянную матрицу прикладывают к
20 ране, формируя искусственный кожный трансплантат. В другом варианте реализации изобретения клетку перепрограммируют, перепрограммированную клетку смешивают с матрицей в жидкой форме или форме суспензии, смесь вводят пациенту, а плотность матрицы увеличивается во время или после введения.

Определенные варианты реализации изобретения относятся к способу очищения
25 клеток. Трансфекция, перепрограммирование и геномное редактирование часто приводят к созданию клеточных популяций, которые содержат клетки с желательным фенотипом и клетки с одним или более нежелательными фенотипами. Определенные варианты реализации изобретения, следовательно, относятся к способу очищения трансфицированных, перепрограммированных и/или генетически отредактированных
30 клеток. В одном варианте реализации изобретения клетки очищают, используя градиент плотности. В другом варианте реализации изобретения клетки очищают путем приведения клеток в контакт с одним или более антителами, которые делают возможным отделение клеток, имеющих один или более из желательных фенотипов, от клеток, имеющих один или более из нежелательных фенотипов. В другом варианте реализации
35 изобретения антитело связано с субстратом, предпочтительно, с магнитным микроносителем. В другом варианте реализации изобретения антитело связано с флуоресцентной молекулой, а разделение проводят при помощи сортировки флуоресцентно-активированных клеток (СФАК) или подобных способов. В другом варианте реализации изобретения предупреждают пролиферацию клеток с
40 нежелательным фенотипом путем приведения клеток в контакт с одной или более молекулами, которые препятствуют делению клеток, предпочтительно, с митомицином-с, 5-аза-деоксцитидином, фторурацилом либо их биологически активным аналогом или производным. Другие варианты реализации изобретения относятся к терапевтическому препарату, содержащему клетки, которые были очищены для того,
45 чтобы увеличить долю клеток, имеющих один или более из желательных фенотипов.

Определенные варианты реализации изобретения относятся к способу создания животных моделей, включая модели мутаций и заболеваний. В одном варианте реализации изобретения животную клетку кожи генетически редактируют и

перепрограммируют в полипотентную стволовую клетку. В другом варианте реализации изобретения около 1-100 перепрограммированных и генетически отредактированных клеток вносят в бластоцисту, а бластоцисту имплантируют в рог матки животного. В одном варианте реализации изобретения животное выбрано из группы, включающей:

5 кота, собаку, мышь, свинью, лошадь, корову, цыпленка, овцу, козу, рыбу, примата и крысу. В другом варианте реализации изобретения животное является крысой.

Определенные неканонические нуклеотиды при инкорпорации в синтетическую молекулу РНК могут снизить токсичность синтетических молекул РНК, частично путем

10 препятствования связыванию белков, которые распознают экзогенные нуклеиновые кислоты, например, протеинкиназ R, Rtg-1 и семейства белков олигоаденилат синтазы. Неканонические нуклеотиды, о которых сообщалось, что они снижают токсичность синтетических молекул РНК при инкорпорации их в молекулы, включают: псевдоуридин, 5-метилуридин, 2-тиоуридин, 5-метилцитидин, N6-метиладенозин и их некоторые комбинации. При этом химические характеристики неканонических нуклеотидов,

15 которые дают им возможность снижения токсичности синтетических молекул РНК, до сих пор остаются неизвестными. Более того, инкорпорация в больших количествах большинства неканонических нуклеотидов, например, 5-метилуридина, 2-тиоуридина, 5-метилцитидина и N6-метиладенозина, может снизить эффективность, с которой молекулы синтетической РНК могут быть транслированы в белок, что ограничивает

20 полезность синтетических молекул РНК, содержащих эти нуклеотиды, в применениях, которые требуют экспрессии белка. Вдобавок, хотя в синтетических молекулах РНК уридин можно полностью заменить псевдоуридином без снижения эффективности, с которой молекулы синтетической РНК могут быть транслированы в белок, в определенных ситуациях, например, при проведении частых неоднократных трансфекций

25 избыточную токсичность могут демонстрировать синтетические молекулы РНК, содержащие только аденозин, гуанозин, цитидин и псевдоуридин.

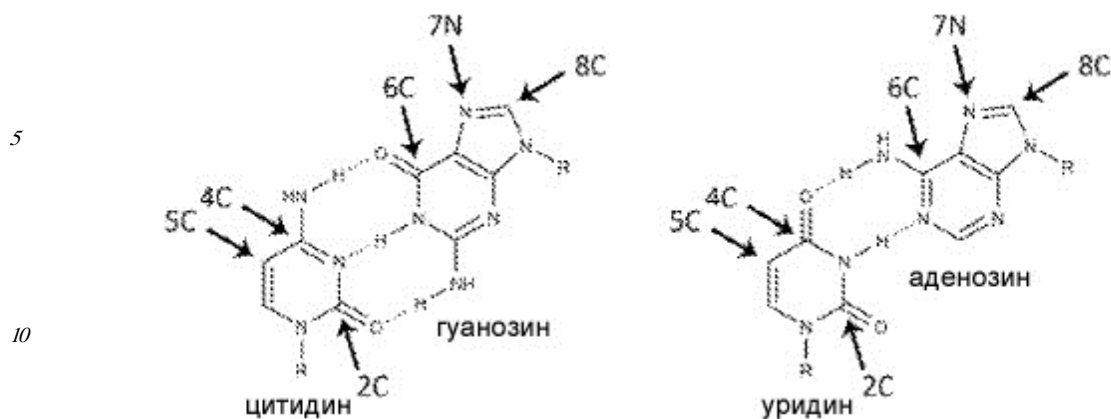
Недавно было обнаружено, что синтетические молекулы РНК, содержащие один или более неканонических нуклеотидов, которые содержат одну или более замен в 2С, и/или 4С, и/или 5С позициях в случае пиримидина или 6С, и/или 7N, и/или 8С позициях

30 в случае пурина, могут быть менее токсичными, чем синтетические молекулы РНК, содержащие только канонические нуклеотиды, частично благодаря способности замен в этих позициях препятствовать распознаванию синтетических молекул РНК белками, которые распознают экзогенные нуклеиновые кислоты, и, более того, замены в этих позициях могут оказывать минимальное влияние на эффективность, с которой молекулы

35 синтетической РНК могут быть транслированы в белок, частично благодаря небольшому влиянию замен в этих позициях на спаривание оснований и межплоскостное взаимодействие оснований.

40

45



Примеры неканонических нуклеотидов, которые содержат одну или более замен в 2С, и/или 4С, и/или 5С позициях в случае пиримидина или 6С, и/или 7N, и/или 8С позициях в случае пурина, включают, но не ограничиваются этим: 2-тиоуридин, 5-азауридин, псевдоуридин, 4-тиоуридин, 5-метилуридин, 5-аминоуридин, 5-гидроксиуридин, 5-метил-5-азауридин, 5-амино-5-азауридин, 5-гидрокси-5-азауридин, 5-метилпсевдоуридин, 5-аминопсевдоуридин, 5-гидроксипсевдоуридин, 4-тио-5-азауридин, 4-тиопсевдоуридин, 4-тио-5-метилуридин, 4-тио-5-аминоуридин, 4-тио-5-гидроксиуридин, 4-тио-5-метил-5-азауридин, 4-тио-5-амино-5-азауридин, 4-тио-5-гидрокси-5-азауридин, 4-тио-5-метилпсевдоуридин, 4-тио-5-гидроксипсевдоуридин, 2-тиоцитидин, 5-азацитидин, псевдоизоцитидин, N4-метилцитидин, N4-аминоцитидин, N4-гидроксицитидин, 5-метилцитидин, 5-аминоцитидин, 5-гидроксицитидин, 5-метил-5-азацитидин, 5-амино-5-азацитидин, 5-гидрокси-5-азацитидин, 5-метилпсевдоизоцитидин, 5-гидроксипсевдоизоцитидин, N4-метил-5-азацитидин, N4-метилпсевдоизоцитидин, 2-тио-5-азацитидин, 2-тиопсевдоизоцитидин, 2-тио-N4-метилцитидин, 2-тио-N4-аминоцитидин, 2-тио-N4-гидроксицитидин, 2-тио-5-метилцитидин, 2-тио-5-аминоцитидин, 2-тио-5-гидроксицитидин, 2-тио-5-метил-5-азацитидин, 2-тио-5-амино-5-азацитидин, 2-тио-5-гидрокси-5-азацитидин, 2-тио-5-метилпсевдоизоцитидин, 2-тио-5-аминопсевдоизоцитидин, 2-тио-5-гидроксипсевдоизоцитидин, 2-тио-N4-метил-5-азацитидин, 2-тио-N4-метилпсевдоизоцитидин, N4-метил-5-метилцитидин, N4-метил-5-аминоцитидин, N4-метил-5-гидроксицитидин, N4-метил-5-метил-5-азацитидин, N4-метил-5-амино-5-азацитидин, N4-метил-5-гидрокси-5-азацитидин, N4-метил-5-метилпсевдоизоцитидин, N4-метил-5-аминопсевдоизоцитидин, N4-метил-5-гидроксипсевдоизоцитидин, N4-амино-5-азацитидин, N4-аминопсевдоизоцитидин, N4-амино-5-метилцитидин, N4-амино-5-аминоцитидин, N4-амино-5-гидроксицитидин, N4-амино-5-метил-5-азацитидин, N4-амино-5-амино-5-азацитидин, N4-амино-5-гидрокси-5-азацитидин, N4-амино-5-метилпсевдоизоцитидин, N4-амино-5-аминопсевдоизоцитидин, N4-амино-5-гидроксипсевдоизоцитидин, N4-гидрокси-5-азацитидин, N4-гидроксипсевдоизоцитидин, N4-гидрокси-5-метилцитидин, N4-гидрокси-5-аминоцитидин, N4-гидрокси-5-гидроксицитидин, N4-гидрокси-5-метил-5-азацитидин, N4-гидрокси-5-амино-5-азацитидин, N4-гидрокси-5-метилпсевдоизоцитидин, N4-гидрокси-5-аминопсевдоизоцитидин, N4-гидрокси-5-гидроксипсевдоизоцитидин, 2-тио-N4-метил-5-метилцитидин, 2-тио-N4-метил-5-аминоцитидин, 2-тио-N4-метил-5-гидроксицитидин, 2-тио-N4-метил-5-метил-5-азацитидин, 2-тио-N4-метил-5-амино-5-азацитидин, 2-тио-N4-метил-5-метилпсевдоизоцитидин, 2-тио-N4-метил-5-аминопсевдоизоцитидин, 2-тио-N4-метил-5-гидроксипсевдоизоцитидин, 2-тио-N4-амино-

5-азацитидин, 2-тио-N4-аминопсевдоизоцитидин, 2-тио-N4-амино-5-метилцитидин, 2-тио-N4-амино-5-амиоцитидин, 2-тио-N4-амино-5-гидроксицитидин, 2-тио-N4-амино-5-метил-5-азацитидин, 2-тио-N4-амино-5-амино-5-азацитидин, 2-тио-N4-амино-5-гидрокси-5-азацитидин, 2-тио-N4-амино-5-метилпсевдоизоцитидин, 2-тио-N4-амино-5-аминопсевдоизоцитидин, 2-тио-N4-амино-5-гидроксипсевдоизоцитидин, 2-тио-N4-гидрокси-5-азацитидин, 2-тио-N4-гидроксипсевдоизоцитидин, 2-тио-N4-гидрокси-5-метилцитидин, 2-тио-N4-гидрокси-5-амиоцитидин, 2-тио-N4-гидрокси-5-гидроксицитидин, 2-тио-N4-гидрокси-5-метил-5-азацитидин, 2-тио-N4-гидрокси-5-амино-5-азацитидин, 2-тио-N4-гидрокси-5-гидрокси-5-азацитидин, 2-тио-N4-гидрокси-5-метилпсевдоизоцитидин, 2-тио-N4-гидрокси-5-аминопсевдоизоцитидин, 2-тио-N4-гидрокси-5-гидроксипсевдоизоцитидин, N6-метиладенозин, N6-аминоаденозин, N6-гидроксиаденозин, 7-дезааденозин, 8-азааденозин, N6-метил-7-дезааденозин, N6-метил-8-азааденозин, 7-деза-8-азааденозин, N6-метил-7-деза-8-азааденозин, N6-амино-7-дезааденозин, N6-амино-8-азааденозин, N6-амино-7-деза-8-азааденозин, N6-гидроксиаденозин, N6-гидрокси-7-дезааденозин, N6-гидрокси-8-азааденозин, N6-гидрокси-7-деза-8-азааденозин, 6-тиогуанозин, 7-дезагуанозин, 8-азагуанозин, 6-тио-7-дезагуанозин, 6-тио-8-азагуанозин, 7-деза-8-азагуанозин и 6-тио-7-деза-8-азагуанозин. Стоит отметить, что для некоторых неканонических нуклеотидов существуют альтернативные схемы наименований. Например, в некоторых ситуациях 5-метилпсевдоуридин может обозначаться как "3-метилпсевдоуридин" или "N3-метилпсевдоуридин".

Нуклеотиды, которые содержат приставку "амино" могут обозначать любой нуклеотид, который содержит атом азота, связанный с атомом в указанной позиции нуклеотида, например, 5-амиоцитидин может обозначаться как 5-амиоцитидин, 5-метиламиоцитидин и 5-нитроцитидин. Аналогично, нуклеотиды, которые содержат приставку "метил" могут обозначать любой нуклеотид, который содержит атом углерода, связанный с атомом в указанной позиции нуклеотида, например, 5-метилцитидин может обозначаться как 5-метилцитидин, 5-этилцитидин и 5-гидроксиметилцитидин, нуклеотиды, которые содержат приставку "тио" могут обозначать любой нуклеотид, который содержит атом серы, связанный с атомом в данной позиции нуклеотида, а нуклеотиды, которые содержат приставку "гидрокси" могут обозначать любой нуклеотид, который содержит атом кислорода, связанный с атомом в данной позиции нуклеотида.

Определенные варианты реализации изобретения, следовательно, относятся к молекуле синтетической РНК, содержащей один или более нуклеотидов, которые содержат одну или более замен в 2С, и/или 4С, и/или 5С позициях в случае пиримидина или 6С, и/или 7N, и/или 8С позициях в случае пурина. Другие варианты реализации изобретения относятся к терапевтическому препарату, при этом терапевтический препарат содержит одну или более синтетических молекул РНК, а одна или более из синтетических молекул РНК содержит один или более нуклеотидов, которые содержат одну или более замен в 2С, и/или 4С, и/или 5С позициях в случае пиримидина или 6С, и/или 7N, и/или 8С позициях в случае пурина. В одном варианте реализации изобретения терапевтический препарат содержит трансфекционный реагент. В другом варианте реализации изобретения трансфекционный реагент содержит катионный липид, липосому или мицеллу. В другом варианте реализации изобретения липосома или мицелла содержит фолат, а терапевтический состав обладает противораковой активностью. В другом варианте реализации изобретения один или более нуклеотидов содержат по меньшей мере одно из следующих соединений: псевдоуридин, 2-тиоуридин, 4-тиоуридин, 5-

азауридин, 5-гидроксиуридин, 5-метилуридин, 5-аминоуридин, 2-тиопсевдоуридин, 4-тиопсевдоуридин, 5-гидроксипсевдоуридин, 5-метилпсевдоуридин, 5-аминопсевдоуридин, псевдоизоцитидин, N4-метилцитидин, 2-тиоцитидин, 5-азацитидин, 5-гидроксицитидин, 5-аминоцитидин, 5-метилцитидин, N4-метилпсевдоизоцитидин, 2-тиопсевдоизоцитидин, 5-гидроксипсевдоизоцитидин, 5-аминопсевдоизоцитидин, 5-метилпсевдоизоцитидин, 7-деазааденозин, 7-деазагуанозин, 6-тиогуанозин и 6-тио-7-деазагуанозин. В другом варианте реализации изобретения один или более нуклеотидов содержат по меньшей мере одно из следующих соединений: псевдоуридин, 2-тиоуридин, 4-тиоуридин, 5-азауридин, 5-гидроксиуридин, 5-метилуридин, 5-аминоуридин, 2-тиопсевдоуридин, 4-тиопсевдоуридин, 5-гидроксипсевдоуридин, 5-метилпсевдоуридин и 5-аминопсевдоуридин, и по меньшей мере одно из следующих соединений: псевдоизоцитидин, N4-метилцитидин, 2-тиоцитидин, 5-азацитидин, 5-гидроксицитидин, 5-аминоцитидин, 5-метилцитидин, N4-метилпсевдоизоцитидин, 2-тиопсевдоизоцитидин, 5-гидроксипсевдоизоцитидин, 5-аминопсевдоизоцитидин и 5-метилпсевдоизоцитидин.

В другом варианте реализации изобретения один или более нуклеотидов содержат по меньшей мере одно из следующих соединений: псевдоуридин, 2-тиоуридин, 4-тиоуридин, 5-азауридин, 5-гидроксиуридин, 5-метилуридин, 5-аминоуридин, 2-тиопсевдоуридин, 4-тиопсевдоуридин, 5-гидроксипсевдоуридин и 5-метилпсевдоуридин, 5-аминопсевдоуридин, и по меньшей мере одно из следующих соединений: псевдоизоцитидин, N4-метилцитидин, 2-тиоцитидин, 5-азацитидин, 5-гидроксицитидин, 5-аминоцитидин, 5-метилцитидин, N4-метилпсевдоизоцитидин, 2-тиопсевдоизоцитидин, 5-гидроксипсевдоизоцитидин, 5-аминопсевдоизоцитидин и 5-метилпсевдоизоцитидин, и по меньшей мере одно из следующих соединений: 7-деазагуанозин, 6-тиогуанозин и 6-тио-7-деазагуанозин. В другом варианте реализации изобретения один или более нуклеотидов включают: 5-метилцитидин и 7-деазагуанозин. В другом варианте реализации изобретения один или более нуклеотидов также содержат псевдоуридин или 4-тиоуридин, или 5-метилуридин, или 5-аминоуридин, или 4-тиопсевдоуридин, или 5-метилпсевдоуридин, или 5-аминопсевдоуридин. В другом варианте реализации изобретения один или более нуклеотидов также содержит 7-деазагуанозин. В другом варианте реализации изобретения один или более нуклеотидов содержат: псевдоизоцитидин или 7-деазагуанозин и псевдоуридин. В другом варианте реализации изобретения один или более нуклеотидов содержат: 5-метилуридин и 5-метилцитидин, и 7-деазагуанозин. В дополнительном варианте реализации изобретения один или более нуклеотидов содержат: псевдоуридин или 5-метилпсевдоуридин и 5-метилцитидин, и 7-деазагуанозин. В другом варианте реализации изобретения один или более нуклеотидов содержат: псевдоизоцитидин и 7-деазагуанозин, и псевдоуридин.

Определенные неканонические нуклеотиды могут быть включены в состав синтетических молекул РНК более эффективно, чем другие неканонические нуклеотиды, при помощи РНК полимераз, которые обычно применяют для *in vitro* транскрипции, частично благодаря свойству этих определенных неканонических нуклеотидов принимать участие в стандартных взаимодействиях спаривания оснований и межплоскостных взаимодействиях оснований, и взаимодействовать с РНК полимеразой способом, аналогичным тому, которым соответствующие канонические нуклеотиды взаимодействуют с РНК полимеразой. Следовательно, определенные смеси нуклеотидов, содержащие один или более неканонических нуклеотидов, могут являться целесообразными, частично потому, что при помощи реакций *in vitro* транскрипции с

участием данных смесей нуклеотидов можно получить большое количество синтетической РНК. Определенные варианты реализации изобретения, следовательно, относятся к смеси нуклеотидов, содержащей один или более нуклеотидов, которые содержат одну или более замен в 2С, и/или 4С, и/или 5С позициях в случае пиримидина или 6С, и/или 7N, и/или 8С позициях в случае пурина. Смесии нуклеотидов включают, но не ограничиваются этим (цифры перед каждым нуклеотидом указывают на приведенную в качестве примера долю трифосфата неканонического нуклеотида в реакции *in vitro* транскрипции, например, 0,2 псевдоизоцитидина относится к реакции с участием аденозин-5'-трифосфата, гуанозин-5'-трифосфата, уридин-5'-трифосфата, цитидин-5'-трифосфата и псевдоизоцитидин-5'-трифосфата, в которой псевдоизоцитидин-5'-трифосфат присутствует в реакции в количестве, приблизительно равном 0,2 части от общего количества, в котором в реакции присутствуют псевдоизоцитидин-5'-трифосфат+цитидин-5'-трифосфат, при этом количества рассчитаны на основе молярной массы или массы, а наличие более чем одной цифры перед нуклеотидом указывает на диапазон приведенных в качестве примера долей): 1,0 псевдоуридина, 0,1-0,8 2-тиоуридина, 0,1 0,8 5-метилуридина, 0,2-1,0 5-гидроксиуридина, 0,1-1,0 5-аминоуридина, 0,1-1,0 4-тиоуридина, 0,1-1,0 2-тиопсевдоуридина, 0,1-1,0 4-тиопсевдоуридина, 0,1-1,0 5-гидроксипсевдоуридина, 0,2-1,5-метилпсевдоуридина, 0,1-1,0 5-аминопсевдоуридина, 0,2-1,0 2-тиоцитидина, 0,1-0,8 псевдоизоцитидина, 0,2-1,0 5-метилцитидина, 0,2-1,0 5-гидроксицитидина, 0,1-1,0 5-аминоцитидина, 0,2-1,0 N4-метилцитидина, 0,2-1,0 5-метилпсевдоизоцитидина, 0,2-1,0 5-гидроксипсевдоизоцитидина, 0,2-1,0 5-аминопсевдоизоцитидина, 0,2-1,0 N4- метилпсевдоизоцитидина, 0,2-1,0 2-тиопсевдоизоцитидина, 0,2-1,0 7-деазагуанозина, 0,2-1,0 6-тиогуанозина, 0,2-1,0 6-тио-7-деазагуанозина, 0,2-1,0 8-азагуанозина, 0,2-1,0 7-деаза-8-азагуанозина, 0,2-1,0 6-тио-8-азагуанозина, 0,1-0,5 7-деазааденозина и 0,1-0,5 N6-метиладенозина.

Недавно было обнаружено, что комбинирование определенных неканонических нуклеотидов может являться целесообразным, частично потому, что вклад неканонических нуклеотидов в снижение токсичности синтетических молекул РНК может быть кумулятивным. Определенные варианты реализации изобретения, следовательно, относятся к нуклеотидной смеси, при этом нуклеотидная смесь содержит более одного неканонического нуклеотида из вышеперечисленных, например, нуклеотидная смесь содержит как псевдоизоцитидин, так и 7-деазагуанозин, или нуклеотидная смесь содержит как N4- метилцитидин, так и 7-деазагуанозин, и т.д. В одном варианте реализации изобретения нуклеотидная смесь содержит более одного неканонического нуклеотида из вышеперечисленных, а доля каждого из неканонических нуклеотидов, присутствующих в смеси, составляет одно из вышеперечисленных значений, например, нуклеотидная смесь содержит 0,1-0,8 псевдоизоцитидина и 0,2-1,0 7-деазагуанозина или нуклеотидная смесь содержит 0,2-1,0 N4- метилпсевдоизоцитидина и 0,2-1,0 7-деазагуанозина и т.д.

В определенных ситуациях, например, когда может быть необязательным или нежелательным максимизировать выход реакции *in vitro* транскрипции, можно использовать доли нуклеотидов, отличные от вышеперечисленных. Приведенные в качестве примеров вышеперечисленные доли и диапазоны долей относятся к растворам нуклеотид-трифосфатов стандартной степени чистоты (более чем 90% чистоты). Большие доли этих и других нуклеотидов можно применять путем применения растворов нуклеотид-трифосфатов большей степени чистоты, например, более чем около 95% чистоты, или более чем около 98% чистоты, или более чем около 99% чистоты, более чем около 99,5% чистоты, которой можно достичь, например, путем очищения раствора

нуклеотид-трифосфатов при помощи существующих методов химической очистки, таких как жидкостная хроматография при высоких давлениях (ЖХВД) или других способов. В одном варианте реализации изобретения нуклеотиды с множественными изомерами очищают для того, чтобы увеличить долю необходимого изомера.

5 Другие варианты реализации изобретения относятся к способу индукции экспрессии клеткой представляющего интерес белка путем приведения клетки в контакт с синтетической молекулой РНК, которая содержит один или более неканонических нуклеотидов, которые содержат одну или более замен в 2С, и/или 4С, и/или 5С позициях в случае пиримидина или 6С, и/или 7N, и/или 8С позициях в случае пурина. Другие
10 варианты реализации изобретения относятся к способу трансфекции, перепрограммирования и генного редактирования клетки путем приведения клетки в контакт с синтетической молекулой РНК, которая содержит один или более неканонических нуклеотидов, которые содержат одну или более замен в 2С, и/или 4С, и/или 5С позициях в случае пиримидина или 6С, и/или 7N, и/или 8С позициях в случае
15 пурина. В одном варианте реализации изобретения синтетическую молекулу РНК получают путем *in vitro* транскрипции. В другом варианте реализации изобретения один или более из перепрограммирующих факторов содержит белок Oct4. В другом варианте реализации изобретения клетку также приводят в контакт с синтетической молекулой РНК, которая кодирует белок Sox2. В другом варианте реализации изобретения клетку
20 также приводят в контакт с синтетической молекулой РНК, которая кодирует белок Klf4. В другом варианте реализации изобретения клетку также приводят в контакт с синтетической молекулой РНК, которая кодирует белок с-Мус. В другом варианте реализации изобретения клетку также приводят в контакт с синтетической молекулой РНК, которая кодирует белок Lin28.

25 Ферменты, такие как T7 РНК полимеразы могут преимущественно инкорпорировать канонические нуклеотиды в реакции *in vitro* транскрипции с участием как канонических, так и неканонических нуклеотидов. Следовательно, реакция *in vitro* транскрипции с участием определенной доли неканонического нуклеотида может давать на выходе РНК, содержащую отличную, часто более низкую, долю неканонического нуклеотида,
30 чем та доля, в которой неканонический нуклеотид присутствовал в реакции. В определенных вариантах реализации изобретения ссылки на доли инкорпорации нуклеотида (например, "синтетическая молекула РНК, содержащая 50% псевдоизоцитидина" или "0,1-0,8 псевдоизоцитидина"), таким образом, могут относиться как к молекулам РНК, содержащим указанную долю нуклеотида, и к молекулам РНК,
35 синтезированным в реакции, содержащей указанную долю нуклеотида (или производного нуклеотида, например, нуклеотид-трифосфата), не смотря даже на то, что такая реакция может дать на выходе РНК, содержащую долю нуклеотида, отличную от доли, в которой неканонический нуклеотид присутствовал в реакции.

Разные нуклеотидные последовательности могут кодировать один и тот же белок,
40 путем использования альтернативных кодонов. В определенных вариантах реализации изобретения ссылки на доли инкорпорации нуклеотида, таким образом, могут относиться как к молекулам РНК, содержащим указанную долю нуклеотида, и к молекулам РНК, кодирующим тот же самый белок в качестве отличной молекулы РНК, при этом отличная молекула РНК содержит указанную долю нуклеотида.

45 Определенные варианты реализации изобретения относятся к набору инструментов, содержащему один или более материалов, необходимых для осуществления настоящего изобретения на практике. В одном варианте реализации изобретения набор инструментов содержит синтетические молекулы РНК. В одном варианте реализации изобретения

набор инструментов содержит синтетические молекулы РНК, которые кодируют один или более перепрограммирующих факторов и/или редактирующих гены белков. В другом варианте реализации изобретения синтетические молекулы РНК содержат один или более неканонических нуклеотидов, которые содержат одну или более замен в 2С, и/или 4С, и/или 5С позициях в случае пиримидина или 6С, и/или 7N, и/или 8С позициях в случае пурина. В другом варианте реализации изобретения набор инструментов содержит один или более следующих элементов: трансфекционную среду, трансфекционный реагент, среду для комплексования и раствор для покрытия. В одном варианте реализации изобретения раствор для покрытия содержит фибронектин и/или витронектин, предпочтительно, рекомбинантный фибронектин и/или рекомбинантный витронектин. В одном варианте реализации изобретения один или более из компонентов набора инструментов присутствуют в виде множества аликвот. В одном варианте реализации изобретения набор инструментов содержит аликвоты комплексов трансфекционного реагента и нуклеиновой кислоты. В другом варианте реализации изобретения набор инструментов содержит аликвоты комплексов трансфекционного реагента и нуклеиновой кислоты, которые находятся в твердой форме, например, в виде замороженных или высушенных заморозкой таблеток. В другом варианте реализации изобретения набор инструментов содержит аликвоты среды, при этом каждая аликвота содержит комплексы трансфекционного реагента и нуклеиновой кислоты, которые стабилизированы либо путем химической обработки, либо путем заморозки.

Трансфекция в общем случае и перепрограммирование в частности могут представлять собой трудоемкие и требующие больших затрат времени методы, которые могут быть повторяемыми и предрасположенными к ошибке. При этом эти методы часто осуществляются вручную из-за недостатка автоматического оборудования для трансфекции. Определенные варианты реализации изобретения, следовательно, относятся к устройству, которое может трансфицировать, перепрограммировать и/или генетически редактировать клетки в автоматическом или полуавтоматическом режиме.

С учетом фигур от ФИГ. 9А до ФИГ. 11, определенные варианты реализации изобретения относятся к устройству (1), при помощи которого можно проводить трансфекцию клеток в многолуночных планшетах (2). В одном варианте реализации изобретения планшет помещают в лоток (3), который выдвигается из устройства. В другом варианте реализации изобретения в устройстве рассчитано на размещение нескольких планшетов (12). В другом варианте реализации изобретения устройство содержит приспособления (4) для хранения среды при определенной температуре, предпочтительно, между 2°C и 6°C. В одном варианте реализации изобретения устройство содержит приспособления (5) для хранения жидкости, отходов и/или клеток, удаленных их лунок. В другом варианте реализации изобретения устройство содержит соединение для подачи питания (6). В другом варианте реализации изобретения устройство содержит порт (33) для подключения к компьютеру (34). В одном варианте реализации изобретения порт является USB портом. В одном варианте реализации изобретения устройство содержит вентилятор (7). В другом варианте реализации изобретения устройство содержит соединение для создания вакуума (8).

На жизнеспособность клеток может благоприятно влиять регулирование окружающих условий, в которых находятся клетки. Определенные варианты реализации изобретения, следовательно, относятся к устройству, содержащему приспособления для инкубации клеток при установленной или необходимой температуре. В одном варианте реализации изобретения клетки инкубируют при одной или более температурах, составляющих

между 35С и 39С. В одном варианте реализации изобретения клетки инкубируют при температуре, составляющей около 37С. Другие варианты реализации изобретения относятся к устройству, содержащему приспособления для регулирования атмосферы, в которой инкубируют клетки. В одном варианте реализации изобретения устройство
5 содержит приспособления для регулирования концентрации углекислого газа в атмосфере. В одном варианте реализации изобретения концентрация углекислого газа составляет между 3% и 7%, предпочтительно, около 5%. В другом варианте реализации изобретения устройство содержит приспособления для регулирования концентрации кислорода в атмосфере. В одном варианте реализации изобретения устройство
10 регулирует концентрацию кислорода при помощи подачи азота. В другом варианте реализации изобретения концентрация кислорода составляет от около 3% до около 7%, например, около 5%. В одном варианте реализации изобретения устройство содержит приспособления для регулирования концентраций как кислорода, так и углекислого газа в атмосфере, в которой инкубируют клетки. В другом варианте реализации
15 изобретения устройство содержит соединение для подачи углекислого газа (9). В другом варианте реализации изобретения устройство содержит соединение для подачи азота (10). В другом варианте реализации изобретения устройство содержит соединение для подачи кислорода (11).

Определенные варианты реализации изобретения относятся к устройству,
20 содержащему приспособления для подачи комплексов из нуклеиновой кислоты и трансфекционного реагента и/или среды (24). В одном варианте реализации изобретения устройство содержит одну или более пипеток с фронтальной загрузкой, которые могут подавать комплексы и/или среду. Примеры других приспособлений для подачи комплексов включают, но не ограничиваются этим: пипетку с задней загрузкой,
25 перистальтический насос, микроструйное устройство, электрораспылительную форсунку, пьезоэлектрический эжектор и акустический капельный эжектор. Определенные варианты реализации изобретения относятся к устройству, содержащему приспособления для создания комплексов из нуклеиновой кислоты и трансфекционного реагента (13). В одном варианте реализации изобретения устройство содержит приспособления для
30 комбинирования одного или более трансфекционных реагентов (14) и одной или более нуклеиновых кислот (15). В одном варианте реализации изобретения приспособления для комбинирования содержат одну или более пипеток с фронтальной загрузкой. Примеры других приспособлений, которые можно использовать для комбинирования включают, но не ограничиваются этим: пипетку с задней загрузкой, перистальтический
35 насос, микроструйное устройство, электрораспылительную форсунку, пьезоэлектрический эжектор и акустический капельный эжектор. В одном варианте реализации изобретения устройство содержит один или более съемных наконечников. В другом варианте реализации изобретения один или более съемных наконечников можно стерилизовать. В другом варианте реализации изобретения один или более
40 съемных наконечников являются одноразовыми. В другом варианте реализации изобретения один или более съемных наконечников выполнены из пластика или стекла. В другом варианте реализации изобретения пластик является полипропиленом. В одном варианте реализации изобретения устройство содержит приспособления для инкубации одной или более нуклеиновых кислот с одним или более трансфекционными реагентами
45 в одной или более средах для комплексования (16). В одном варианте реализации изобретения устройство содержит приспособления для хранения одной или более нуклеиновых кислот, одного или более трансфекционных реагентов и одной или более сред для комплексования. В одном варианте реализации изобретения

комплексирование происходит при комнатной температуре. В одном варианте реализации изобретения устройство содержит приспособления для нагревания среды перед приведением клетки в контакт со средой, например, до между около 20°C и около 39°C или до между около 30°C и около 39°C. В одном варианте реализации изобретения 5 среду нагревают при помощи нагревательного элемента (25). В одном варианте реализации изобретения устройство содержит приспособления для хранения и/или подачи нескольких культуральных сред.

Определенные варианты реализации изобретения относятся к способу хранения комплексов из нуклеиновой кислоты и трансфекционного реагента. В одном варианте 10 реализации изобретения одну или более нуклеиновых кислот и один или более трансфекционных реагентов соединяют с одной или более средами для комплексирования и охлаждают для получения таблетки из нуклеиновой кислоты и трансфекционного реагента. В одном варианте реализации изобретения охлаждение проводят путем приведения в контакт с жидким азотом. Другие способы охлаждения 15 включают, но не ограничиваются этим, приведение в контакт с: охлаждающим элементом Пельтье, охлажденным жидким пропаном, охлажденным жидким этаном и охлажденной полированной металлической поверхностью. В одном варианте реализации изобретения данный способ является в значительной степени свободным от РНКазы. Определенные варианты реализации изобретения относятся к способу трансфицирования 20 клеток с применением таблетки из нуклеиновой кислоты и трансфекционного реагента. В одном варианте реализации изобретения таблетку нагревают перед тем, как добавить в трансфекционную среду. В одном варианте реализации изобретения таблетку нагревают путем помещения таблетки в небольшой объем теплой трансфекционной среды, которую затем приводят в контакт с клетками, предназначенными для 25 трансфекции. В другом варианте реализации изобретения таблетку добавляют прямо в трансфекционную среду. Определенные варианты реализации изобретения относятся к устройству, при помощи которого можно осуществить трансфекцию с применением таблеток из нуклеиновой кислоты и трансфекционного реагента. В одном варианте реализации изобретения устройство содержит приспособления для хранения таблеток 30 (17) в определенном диапазоне температур. В одном варианте реализации изобретения диапазон температур составляет между около -90°C и около 0°C, предпочтительно, между около -30°C и около -4°C. В одном варианте реализации изобретения устройство содержит приспособления для распределения таблеток. В одном варианте реализации изобретения таблетки распределяют при помощи плунжера (19). В другом варианте 35 реализации изобретения таблетки распределяют при помощи вращающегося диска (20), в котором находится отверстие (21), через которое подаются таблетки. В одном варианте реализации изобретения устройство содержит приспособления для разогревания таблетки перед добавлением таблетки в трансфекционную среду. В одном варианте реализации изобретения таблетку разогревают, помещая таблетку в небольшой 40 контейнер (22), содержащий теплую трансфекционную среду, которую затем приводят в контакт с трансфицируемыми клетками. В другом варианте реализации изобретения устройство содержит приспособления для подачи таблеток прямо в трансфекционную среду. В другом варианте реализации изобретения таблетки хранят в картридже (16). В одном варианте реализации изобретения устройство содержит приспособления для 45 смены картриджей (36).

Во время культивирования клеток может быть целесообразной замена, либо полная либо частичная, культуральной среды или дополнение культуральной среды добавочным количеством среды или другой добавки с целью добавить питательные вещества и/или

уменьшить, удалить или инактивировать другим способом клеточные отходы или другие нежелательные компоненты, которые могут присутствовать в среде, включая остаточные комплексы. Определенные варианты реализации изобретения, следовательно, относятся к устройству, содержащему приспособления (23) для удаления, 5 полного либо частичного, культуральной среды от клеток. В одном варианте реализации изобретения устройство содержит аспиратор.

Определенные варианты реализации изобретения относятся к устройству, содержащему приспособления для удаления крышки с луночного планшета. В одном варианте реализации изобретения устройство содержит приспособления для удаления 10 крышки с луночного планшета (26) путем присасывания (27). Другие приспособления для удаления крышки с луночного планшета включают, но не ограничиваются этим: клейкий материал, шарнирный элемент (28), зажим, магнит и электромагнит. В определенных вариантах реализации изобретения устройство содержит приспособления для визуализации клеток (29). В одном варианте реализации изобретения плотность 15 клеток определяют путем измерения оптической плотности емкости, в которой содержатся клетки. В другом варианте реализации изобретения плотность клеток определяют при помощи визуализации клеток.

Определенные варианты реализации изобретения относятся к устройству, которое применяют в рабочей комбинации с другим оборудованием, например, оборудованием 20 для культивирования, визуализации или каких-либо других манипуляций с клетками. В одном варианте реализации изобретения устройство (1) загружают при помощи роботизированной руки (30). В другом варианте реализации изобретения роботизированную руку используют для помещения планшетов в и/или извлечения планшетов из инкубатора (31). В другом варианте реализации изобретения для 25 визуализации клеток используют плоское устройство для визуализации (32). В другом варианте реализации изобретения устройством управляют через компьютер (34). В одном варианте реализации изобретения устройство используют для трансфекции, перепрограммирования и/или генного редактирования клеток.

Цель настоящего изобретения, следовательно, состоит в обеспечении продуктов для 30 применения, как в исследованиях, так и для терапевтического применения.

Детали данного изобретения изложены в прилагающемся ниже описании. Хотя способы и материалы, схожие либо одинаковые с теми, которые описаны в данном тексте, можно применять при практическом осуществлении или тестировании 35 настоящего изобретения, ниже будут описаны иллюстративные способы и материалы. Другие отличительные признаки, объекты и преимущества данного изобретения станут понятны из описания и формулы изобретения. В описании изобретения и прилагающейся формуле изобретения формы единственного числа часто включают в себя множественное число, если другое четко не предусмотрено контекстом. Если не указано иное, все употребляемые в данном тексте технические и научные термины имеют те же значения, 40 которые обычно подразумеваются специалистами в данной области техники, которым принадлежит данное изобретение.

ПРИМЕРЫ

Пример 1 Синтез РНК

РНК, кодирующие человеческие белки Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc-2 (T58A) и Lin28 и 45 содержащие различные комбинации канонических и неканонических нуклеотидов, синтезировали с ДНК матриц (Таблица 1). Образцы РНК анализировали при помощи электрофореза в агарозном геле для того, чтобы оценить качество РНК (ФИГ. 1). Затем РНК разводили до концентрации между 100 нг/мкл и 500 нг/мкл. Для определенных

экспериментов добавляли ингибитор РНКазы (Superase-In™, Life Technologies Corporation) в концентрации 1 мкЛ/100мкг РНК. Растворы РНК хранили при 4С. Для определенных экспериментов со смесями РНК, РНК, кодирующие Oct4, Sox2, Klf4, c-Мyc-2 (T58A) и Lin28 смешивали в мольном отношении 3:1:1:1:1.

5 Таблица 1.

	Матрица	Нуклеотиды	Объем реакции/мкЛ	Выход in vitro транскрипции/мкг
10	Oct4	А, Г, псУ, 5мЦ	210	1976,0
	Sox2	А, Г, псУ, 5мЦ	70	841,7
	Klf4	А, Г, псУ, 5мЦ	70	950,0
	c-Мyc-2 (T58A)	А, Г, псУ, 5мЦ	70	535,8
	Lin28	А, Г, псУ, 5мЦ	70	551,0
15	Oct4	А, Г, псУ, 5мЦ	105	1181,8
	Sox2	А, Г, псУ, 5мЦ	35	533,9
	Klf4	А, Г, псУ, 5мЦ	35	552,9
	c-Мyc-2 (T58A)	А, Г, псУ, 5мЦ	35	471,2
	Lin28	А, Г, псУ, 5мЦ	35	440,8
20	Oct4	А, Г, псУ, 5мЦ	105	1155,2
	Sox2	А, Г, псУ, 5мЦ	35	526,3
	Klf4	А, Г, псУ, 5мЦ	35	494,0
	c-Мyc-2 (T58A)	А, Г, псУ, 5мЦ	35	446,5
	Lin28	А, Г, псУ, 5мЦ	35	389,5
25	Sox2	А, Г, псУ, 5мЦ	20	143,8
	Sox2	А, Г, У, псизоЦ	20	114,1
	Sox2	А, Г, 0,25 2сУ, псизоЦ	20	78,0
	Sox2	А, Г, 0,25 2сУ, 0,25 псизоЦ	20	140,1
	Sox2	А, Г, 5мУ, псизоЦ	20	30,6
	Sox2	А, Г, 0,5 5мУ, псизоЦ	20	65,9
30	Oct4	А, Г, У, псизоЦ	30	191,6
	Sox2	А, Г, У, псизоЦ	10	50,7
	Klf4	А, Г, У, псизоЦ	10	74,5
	c-Мyc-2 (T58A)	А, Г, У, псизоЦ	10	87,2
	Lin28	А, Г, У, псизоЦ	10	86,8
35	Oct4	А, Г, 0,25 5мУ, псизоЦ	30	195,8
	Sox2	А, Г, 0,25 5мУ, псизоЦ	10	36,2
	Klf4	А, Г, 0,25 5мУ, псизоЦ	10	33,6
	c-Мyc-2 (T58A)	А, Г, 0,25 5мУ, псизоЦ	10	63,0
	Lin28	А, Г, 0,25 5мУ, псизоЦ	10	77,2
40	Oct4	А, Г, У, Ц	30	165,2
	Sox2	А, Г, У, Ц	10	94,7
	Klf4	А, Г, У, Ц	10	91,4
	c-Мyc-2 (T58A)	А, Г, У, Ц	10	84,9
	Lin28	А, Г, У, Ц	10	104,4
45	Oct4	А, Г, У, 0,25 псизоЦ	30	161,2
	Sox2	А, Г, У, 0,25 псизоЦ	10	83,8
	Klf4	А, Г, У, 0,25 псизоЦ	10	85,1
	c-Мyc-2 (T58A)	А, Г, У, 0,25 псизоЦ	10	89,3
	Lin28	А, Г, У, 0,25 псизоЦ	10	94,9
	Oct4	А, Г, У, 0,5 псизоЦ	30	150,8
	Sox2	А, Г, У, 0,5 псизоЦ	10	79,3

5	Klf4	A, Г, У, 0,5 псизоЦ	10	83,8
	c-Myc-2 (T58A)	A, Г, У, 0,5 псизоЦ	10	94,7
	Lin28	A, Г, У, 0,5 псизоЦ	10	78,6
	Oct4	0,25 7дА, Г, У, Ц	10	29,7
10	Oct4	0,5 7дА, Г, У, Ц	10	44,7
	Oct4	A, 0,25 7дГ, У, Ц	10	45,2
	Oct4	A, 0,5 7дГ, У, Ц	10	31,7
	Oct4	0,25 7дА, 0,25 7дГ, У, Ц	10	13,2
	Oct4	0,25 7дА, Г, У, 0,25 псизоЦ	10	47,6
15	Oct4	A, 0,25 7дГ, У, 0,25 псизоЦ	10	10,5
	Oct4	A, 0,5 7дГ, У, 0,25 псизоЦ	30	125,3
	Sox2	A, 0,5 7дГ, У, 0,25 псизоЦ	10	20,5
	Klf4	A, 0,5 7дГ, У, 0,25 псизоЦ	10	18,4
20	c-Myc-2 (T58A)	A, 0,5 7дГ, У, 0,25 псизоЦ	10	22,1
	Lin28	A, 0,5 7дГ, У, 0,25 псизоЦ	10	39,7
	Oct4	A, 0,5 7дГ, У, 0,5 псизоЦ	30	92,3
	Sox2	A, 0,5 7дГ, У, 0,5 псизоЦ	10	20,1
	Klf4	A, 0,5 7дГ, У, 0,5 псизоЦ	10	17,7
25	c-Myc-2 (T58A)	A, 0,5 7дГ, У, 0,5 псизоЦ	10	95,4
	Lin28	A, 0,5 7дГ, У, 0,5 псизоЦ	10	26,0
	Oct4	0,25 7дА, 7дГ, У, 0,25 псизоЦ	20	3,8
	Sox2	0,25 7дА, 7дГ, У, 0,25 псизоЦ	20	5,4
30	Klf4	0,25 7дА, 7дГ, У, 0,25 псизоЦ	20	5,9
	c-Myc-2 (T58A)	0,25 7дА, 7дГ, У, 0,25 псизоЦ	20	5,9
	Lin28	0,25 7дА, 7дГ, У, 0,25 псизоЦ	20	5,1
	Oct4	0,25 7дА, 7дГ, У, 0,5 псизоЦ	20	3,0
	Sox2	0,25 7дА, 7дГ, У, 0,5 псизоЦ	20	3,3
35	Klf4	0,25 7дА, 7дГ, У, 0,5 псизоЦ	20	4,1
	c-Myc-2 (T58A)	0,25 7дА, 7дГ, У, 0,5 псизоЦ	20	4,5
	Lin28	0,25 7дА, 7дГ, У, 0,5 псизоЦ	20	5,0
	Oct4 (2ч инкубации)	A, 0,75 7дГ, У, Ц	10	40,8
40	Oct4 (2ч инкубации)	A, 7дГ, У, Ц	10	14,1
	Oct4 (20ч инкубации)	A, 0,75 7дГ, У, Ц	10	42,9
	Oct4 (20 ч инкубации)	A, 7дГ, У, Ц	10	24,4
45	Oct4	A, Г, У, 0,25 N4мЦ	10	73,1
	Oct4	A, Г, У, 0,5 N4мЦ	10	66,2
	Oct4	A, Г, У, 0,75 N4мЦ	10	55,1
	Oct4	A, Г, У, N4мЦ	10	32,7
	Oct4	A, 0,75 7дГ, У, Ц	10	35,6

"А" обозначает аденозин-5'-трифосфат, "Г" обозначает гуанозин-5'-трифосфат, "У" обозначает уридин-5'-трифосфат, "Ц" обозначает цитидин-5'-трифосфат, "псУ" обозначает псевдоуридин-5'-трифосфат, "5мЦ" обозначает 5-метилцитидин-5'-трифосфат, "2сУ" обозначает 2-тиоуридин-5'-трифосфат, "псизоЦ" обозначает псевдоизоцитидин-5'-трифосфат, "5мУ" обозначает 5-метилуридин-5'-трифосфат, "7дА" обозначает 7-дезааденозин-5'-трифосфат, "7дГ" обозначает 7-дезагуанозин-5'-трифосфат и "N4мЦ" обозначает N4-метилцитидин-5'-трифосфат.

Пример 2 Приготовление трансфекционной среды

Состав среды разрабатывали таким образом, чтобы она способствовала эффективной

трансфекции, перепрограммированию и генному редактированию клеток: DMEM/F12+10 мкг/мЛ инсулина+5,5 мкг/мЛ трансферрина+6,7 нг/мЛ селенита натрия+20 нг/мЛ bFGF+5 мг/мЛ обработанного человеческого сывороточного альбумина.

Также были разработаны варианты этой среды для того, чтобы обеспечить
 5 улучшенные показатели при применении определенных трансфекционных реагентов, определенных нуклеиновых кислот и определенных типов клеток: DMEM/F12+10 мкг/мЛ инсулина+5,5 мкг/мЛ трансферрина+6,7 нг/мЛ селенита натрия+4,5 мкг/мЛ холестерина+20 нг/мЛ bFGF+5 мг/мЛ обработанного человеческого сывороточного альбумина, DMEM/F12+10 мкг/мЛ инсулина+5,5 мкг/мЛ трансферрина+6,7 нг/мЛ селенита натрия+1 мкг/мЛ гидрокортизона+20 нг/мЛ bFGF+5 мг/мЛ обработанного человеческого сывороточного альбумина и DMEM/F12+10 мкг/мЛ инсулина+5,5 мкг/мЛ трансферрина+6,7 нг/мЛ селенита натрия+4,5 мкг/мЛ холестерина +1 мкг/мЛ гидрокортизона+20 нг/мЛ bFGF+5 мг/мЛ обработанного человеческого сывороточного альбумина.

15 Примеры дополнительных компонентов, которые добавляли в клеточную культуральную среду в определенных экспериментах (перечисленные с приведенными в качестве примера концентрациями), включают: 15 мМ ГЭПЭС, 2 мМ L-аланил-L-глутамина, 2 мкг/мЛ этаноламина, 10 мкг/мЛ жирных кислот, 10 мкг/мЛ жирных кислот из рыбьего жира (метил эфиров), 25 мкг/мЛ полиоксиэтиленсорбитан моноолеата, 2
 20 мкг/мЛ D-альфа-токоферол ацетата, 1-50 мкг/мЛ L-аскорбиновой кислоты 2-фосфат сесквимагний соль гидрата, 200 нг/мЛ B18R и 0,1% плюроники F-68.

Для определенных экспериментов, в которых среду кондиционировали, применяли следующий вариант:

DMEM/F12+15 мМ ГЭПЭС+2 мМ L-аланил-L-глутамина+10 мкг/мЛ инсулина+5,5
 25 мкг/мЛ трансферрина+6,7 нг/мЛ селенита натрия+2 мкг/мЛ этаноламина+4,5 мкг/мЛ холестерина+10 мкг/мЛ жирных кислот из рыбьего жира (метил эфиров)+25 мкг/мЛ полиоксиэтиленсорбитан моноолеата+2 мкг/мЛ D-альфа-токоферол ацетата+1 мкг/мЛ L-аскорбиновой кислоты 2-фосфат сесквимагний соль гидрата+0,1% плюроники F-68+20 нг/мЛ bFGF+5 мг/мЛ обработанного человеческого сывороточного альбумина.

30 Для определенных экспериментов, в которых среду не кондиционировали, применяли следующий вариант:

DMEM/F12+15 мМ ГЭПЭС+2 мМ L-аланил-L-глутамина+10 мкг/мЛ инсулина+5,5 мкг/мЛ трансферрина+6,7 нг/мЛ селенита натрия+2 мкг/мЛ этаноламина+4,5 мкг/мЛ холестерина+1 мкг/мЛ гидрокортизона+0-25 мкг/мЛ полиоксиэтиленсорбитан
 35 моноолеата+2 мкг/мЛ D-альфа-токоферол ацетата+50 мкг/мЛ L-аскорбиновой кислоты 2-фосфат сесквимагний соль гидрата+20 нг/мЛ bFGF+5 мг/мЛ обработанного человеческого сывороточного альбумина.

Для приготовления этих вариантов обработанный человеческий сывороточный альбумин обрабатывали путем добавления 32 мМ октаноата натрия с последующим
 40 нагреванием при 6°C на протяжении 4 ч, с последующей обработкой ионообменной смолой (AG501-X8(D)) на протяжении 6 ч при комнатной температуре, с последующей обработкой покрытым декстраном активированным древесным углем (C6241, Sigma-Aldrich Co. LLC.) на протяжении ночи при комнатной температуре, с последующими центрифугированием, фильтрацией, доведением до 10% раствора не содержащей
 45 нуклеазы водой, с последующим добавлением к другим компонентам среды. Для определенных экспериментов, в которых среду кондиционировали, среду кондиционировали на протяжении 24 ч на облученных фидерах их человеческих неонатальных фибробластов. Клетки высевали на покрытые фибронектином планшеты

или покрытые фибронектином и витронектином планшеты, если не указано иное.

Состав среды может быть адаптирован к требованиям определенных типов культивируемых клеток. Более того, в определенных ситуациях, обработанный человеческий сывороточный альбумин можно заменить другим обработанным альбумином, например, обработанным бычьим сывороточным альбумином, вместо или дополнительно к L-аланил-L-глутамину можно использовать другие источники глутамина, например, L-глутамин, вместо или дополнительно к ГЭПЕС можно использовать другие буферные системы, например, фосфатные, бикарбонатные и т.д., вместо или дополнительно к селениту натрия селен может присутствовать в других формах, например, селенистой кислоты, вместо или дополнительно к L-аскорбиновой кислоте 2-фосфат сесквимагний соль гидрату и/или D-альфа-токоферол ацетату можно использовать другие антиоксиданты, например L-аскорбиновую кислоту, вместо или дополнительно к полиоксиэтиленсорбитан моноолеату и/или плюронику F-68 можно использовать другие поверхностно активные вещества, например, плюроник F-127, вместо или дополнительно к DMEM/F12 можно использовать другие базальные среды, например, MEM, DMEM и т.д., а компоненты культуральной среды можно менять со временем, например, путем применения среды TGF- β , начиная с 0-го дня до 5-го дня, затем применяя среду, содержащую 2 нг/мЛ TGF- β после 5-го дня. В некоторых ситуациях можно добавлять другие ингредиенты, например, жирные кислоты, лизофосфатидную кислоту, лизосфингомиелин, сфингозин-1-фосфат, другие сфинголипиды, представителей семейства белков TGF- β /NODAL, IL-6, представителей семейства белков Wnt и т.д. в подходящих концентрациях, а ингредиенты, для которых известно, что они стимулируют или подавляют рост определенных типов клеток, и/или агонисты, и/или антагонисты белков либо другие молекулы, для которых известно, что они стимулируют или подавляют рост определенных типов клеток, можно добавлять в среду в подходящих концентрациях при применении с этими типами клеток, например, сфингозин-1-фосфат и полипотентные стволовые клетки. Ингредиенты могут находиться в форме очищенных соединений, частей смесей с точно определенным составом, частей сложных смесей или смесей с неопределенным составом, например, животных и растительных масел, и могут быть добавлены при помощи биологических процессов, например, кондиционирования. Концентрации компонентов могут отличаться от перечисленных значений в границах диапазонов, которые очевидны для специалистов в данной области техники.

Пример 3 Трансфекция клеток синтетической РНК

Для трансфекции в 6-луночных планшетах 2 мкг РНК и 6 мкЛ трансфекционного реагента (Липофектамин™ RNAiMAX, Life Technologies Corporation) разводили сначала раздельно в среде для комплексования (Опти-MEM®, Life Technologies Corporation) до общего объема, составляющего 60 мкЛ для каждого компонента. Затем разведенные РНК и трансфекционный реагент смешивали и инкубировали на протяжении 15 мин при комнатной температуре согласно инструкциям производителя трансфекционного реагента. Затем комплексы добавляли к клеткам в культуре. От 30 мкЛ до 240 мкЛ комплексов добавляли в каждую лунку 6-луночного планшета, в которых уже находилось по 2 мЛ трансфекционной среды. Затем планшеты аккуратно встряхивали для того, чтобы распределить комплексы по объему лунки. Клетки инкубировали вместе с комплексами от 2 часов до ночи перед тем, как сменить среду свежей трансфекционной средой (2 мЛ/лунку). Объемы устанавливали для трансфекции в 24-луночных и 96-луночных планшетах. Клетки фиксировали и окрашивали через 20-24 ч после трансфекции с использованием антитела к Oct4 (ФИГ. 2А). Ядра окрашивали

и пересчитывали, чтобы определить относительную токсичность РНК (ФИГ. 2Б).

Пример 4 Анализ способности препаратов необработанного человеческого сывороточного альбумина способствовать трансфекции нуклеиновой кислоты и перепрограммированию РНК

- 5 Первичные человеческие неонатальные фибробласты культивировали в среде с или без 5 мг/мл ЧСА. Исследовали фракцию Кона V (A6784, Sigma-Aldrich Co. LLC.) и четыре различных препарата рекомбинантного ЧСА (A6608, A7736, A9731 и A9986, все от Sigma-Aldrich Co. LLC.). Клетки трансфицировали согласно Примеру 3 РНК, синтезированной согласно Примеру 1. В то время как нетрансфицированные клетки
10 хорошо росли в средах, содержащих любой из препаратов ЧСА, в трансфицированных лунках для каждого из препаратов ЧСА наблюдали существенные различия в морфологии клеток и плотности клеток, и ни один из препаратов не привел к морфологическим изменениям, которые указывали бы на перепрограммирование.

- Пример 5 Получение человеческого сывороточного альбумина, обработанного октаноатом*

15 10% раствор ЧСА предварительно инкубировали с 22 мМ хлорида натрия и 16 мМ октаноата натрия (Sigma-Aldrich Co. LLC), а затем инкубировали при 37°C на протяжении 3 часов до образования конечной среды.

- Пример 6 Обработка человеческого сывороточного альбумина при помощи ионообменной хроматографии*

- 20 20% раствор рекомбинантного ЧСА, синтезированного в *Pichia pastoris* (A7736, Sigma-Aldrich Co. LLC.), готовили путем растворения 2 г ЧСА в 10 мл не содержащей нуклеаз воды и аккуратного перемешивания при комнатной температуре. Затем раствор ЧСА деионизировали, добавляя сначала 1 г смешанной деионизирующей смолы (AG 501-X8 (D), Bio-Rad Laboratories, Inc.), и встряхивая на протяжении 1 ч при комнатной
25 температуре. Затем раствор ЧСА переливали в пробирку, содержащую 5 г свежей смолы, и встряхивали на протяжении 4 ч при комнатной температуре. В конце деионизированный раствор ЧСА переливали, довели до не содержащей нуклеаз водой до общего содержания белка в 10%, стерилизовали посредством фильтрации, используя
30 0,2 мкм мембранный фильтриз полиэфирсульфона, и хранили при 4°C.

Пример 7 Анализ эффективности трансфекции и жизнеспособности клеток, культивированных в среде, содержащей обработанный октаноатом человеческий сывороточный альбумин

- Первичные человеческие неонатальные фибробласты культивировали в среде,
35 содержащей рекомбинантный ЧСА, обработанный согласно Примеру 4, или обработанный ЧСА, полученный из крови (Bio-Pure HSA, Biological Industries). Клетки трансфицировали ежедневно согласно Примеру 3 РНК, синтезированной согласно Примеру 1, начиная с 0-го дня. Снимки делали на 3-й день. В лунках, содержащих октаноат, наблюдали несколько небольших участков, на которых клетки претерпевали
40 морфологические изменения, схожие с мезенхимально-эпителиальным переходом, что указывает на повышенную эффективность трансфекции. Для образцов, содержащих обработанный ЧСА, полученный из крови, наблюдали много крупных участков морфологических изменений, схожих с мезенхимально-эпителиальным переходом. В обоих случаях морфологические изменения были характерны для
45 перепрограммирования.

Пример 8 Перепрограммирование человеческих фибробластов с использованием среды, содержащей обработанный октаноатом человеческий сывороточный альбумин

Первичные человеческие неонатальные фибробласты высевали на 6-луночные

планшеты при плотности в 5000 клеток/лунку в среду для фибробластов (DMEM+10% фетальная бычья сыворотка). Через 6 ч среду меняли на трансфекционную среду, содержащую обработанный октаноатом ЧСА. Клетки трансфицировали ежедневно согласно Примеру 3 РНК, синтезированной согласно Примеру 1, начиная с 0-го дня.

К 5-му дню лунка содержала несколько участков клеток, демонстрирующих морфологию, которая соответствует перепрограммированию. В этом эксперименте не использовали фидеры или иммунодепрессанты.

Пример 9 Анализ эффективности трансфекции и жизнеспособности клеток, культивированных в среде, содержащей обработанный ионообменной смолой

Первичные человеческие неонатальные фибробласты трансфицировали согласно Примеру 3 РНК, синтезированной согласно Примеру 1, начиная с 0-го дня. Снимки делали на 2-й день. Клетки в лунке, содержащей необработанный ЧСА демонстрировали низкую жизнеспособность по сравнению с лункой, содержащей обработанный ЧСА, полученный из крови, или обработанный ионообменной смолой ЧСА.

Пример 10 Перепрограммирование человеческих фибробластов с использованием обработанного ионообменной смолой человеческого сывороточного альбумина

Первичные человеческие неонатальные фибробласты высевали на 6-луночные планшеты при плотности в 10,000 клеток/лунку в среду для фибробластов (DMEM+10% фетальная бычья сыворотка). Клетки трансфицировали ежедневно согласно Примеру 3 РНК, синтезированной согласно Примеру 1, начиная с 0-го дня. На 4-й день проводили пересев клеток с индексом разведения 1:20. Снимки делали на 10-й день. Лунка содержала много крупных колоний клеток, демонстрирующих морфологию, которая соответствует перепрограммированию. В лунках, в которых находилась клеточная культуральная среда, содержащая необработанный ЧСА, колоний не наблюдали.

Пример 11 Перепрограммирование человеческих фибробластов без использования фидеров или иммунодепрессантов

Первичные человеческие фибробласты высевали на 6-луночные планшеты при плотности в 20,000 клеток/лунку в среду для фибробластов (DMEM+10% фетальная бычья сыворотка). Через 6 ч среду меняли на трансфекционную среду, содержащую обработанный ЧСА и не содержащую иммунодепрессантов, а клетки трансфицировали ежедневно согласно Примеру 3 РНК, синтезированной согласно Примеру 1, за исключением того, что дозу РНК уменьшили до 1 мкг/лунку, при этом было проведено всего 5 трансфекций. Снимки делали на 7-й день. К 5-му дню можно было видеть небольшие колонии клеток, демонстрирующих морфологию, которая соответствует перепрограммированию. На 7-й день среду меняли на DMEM/F12+20% Knockout™ Serum Replacement (Life Technologies Corporation)+1X заменимых аминокислот+2 мМ L-глутамин, кондиционировали на облученных мышинных эмбриональных фибробластах на протяжении 24 часов, а затем добавляли 20 нг/мЛ bFGF и 10 мкМ Y-27632. К 8-му дню можно было видеть крупные колонии с перепрограммированной морфологией. Колонии собирали на 10-й день и высевали в лунки, покрытые экстрактом базальной мембраны (Cultrex® Human BME Pathclear®, Trevigen Inc.) (ФИГ. 3А). Клетки быстро росли, их пересевали для того, чтобы получить стабильные линии. Стабильные линии демонстрировали положительное окрашивание в отношении маркеров полипотентных стволовых клеток Oct4 и SSEA4 (ФИГ. 3Б). После повторного проведения полного протокола действий наблюдали аналогичные результаты (ФИГ. 3В).

Пример 12 Эффективное быстрое получение и перепрограммирование клеток из биопсийного образца человеческой кожи

Полнослойным биопсийный образец брали при помощи дерматомы у здорового 31-летнего добровольца согласно утвержденному протоколу. Вкратце, участок кожи на левом плече обезболивали при помощи местного применения 2,5% лидокаина. Участок дезинфицировали 70% изопропанолом и проводили взятие полнослойного биопсийного образца кожи при помощи дерматомы диаметром 1,5 мм (ФИГ. 4А). Ткань промывали в фосфатно-солевом буферном растворе (ФСР) и помещали в 1,5 мл пробирку, содержащую 250 мкл TrypLE™ Select CTS™ (Life Technologies Corporation), и инкубировали при 37°C на протяжении 30 мин. Затем ткань перемещали в 1,5 мл пробирку, содержащую 250 мкл DMEM/F12-CTS™ (Life Technologies Corporation)+5 мг/мл коллагеназы, и инкубировали при 37°C на протяжении 2 ч (ФИГ. 4Б). Эпидермис удаляли при помощи щипцов, а ткань механически разделяли. Клетки дважды промывали в DMEM/F12-CTS™ и высевали в покрытые фибронектином лунки 24-луночных и 96-луночных планшетов. Тому же добровольцу проводили флеботомию и собирали венозную кровь в пробирки Vacutainer® SST™ (Becton, Dickinson and Company). Сыворотку выделяли согласно протоколу производителя. Изогенную среду для высевания готовили путем смешивания DMEM/F12-CTS™+2 мМ L-аланил-L-глутамин (Sigma-Aldrich Co. LLC.)+20% человеческой сыворотки. Клетки из образца кожной ткани высевали как в трансфекционную среду, так и в изогенную среду для высевания. Через 2 дня лунки промывали, а среду меняли на трансфекционную среду. Много клеток с морфологией фибробластов прикрепились и начали делиться на 2-й день (ФИГ. 4В). Клетки трансфицировали согласно Примеру 3 РНК, синтезированной согласно Примеру 1, начиная со 2-го дня, при этом все объемы были установлены так, чтобы соответствовать более маленьким лункам. К 5-му дню наблюдали участки клеток с морфологией, которая соответствует перепрограммированию.

Пример 13 Перепрограммирование человеческих фибробластов с использованием синтетической РНК, содержащей неканонические нуклеотиды

Первичные человеческие фибробласты высевали на 6-луночные планшеты, покрытые рекомбинантным человеческим фибронектином и рекомбинантным человеческим витронектином (каждый разводили в DMEM/F12 до концентрации 1 мкг/мл, 1 мл/лунку, и инкубировали при комнатной температуре на протяжении 1 ч) при плотности в 20,000 клеток/лунку в трансфекционную среду. На следующий день клетки трансфицировали как в Примере 3 РНК, синтезированной согласно Примеру 1, за исключением того, что доза РНК составляла 0,5 мкг/лунку в 1-й день, 0,5 мкг/лунку во 2-й день и 2 мкг/лунку на 3-й день. Снимки делали на 4-й день. На 4-й день можно было видеть небольшие колонии клеток, демонстрирующих морфологию, которая соответствует перепрограммированию.

Пример 14 Перепрограммирование человеческих фибробластов при помощи некондиционированной трансфекционной среды

Первичные человеческие фибробласты высевали на 6-луночные планшеты, покрытые рекомбинантным человеческим фибронектином и рекомбинантным человеческим витронектином (каждый разводили в DMEM/F12 до концентрации 1 мкг/мл, 1 мл/лунку, и инкубировали при комнатной температуре на протяжении 1 ч) при плотности в 20,000 клеток/лунку в трансфекционную среду. На следующий день клетки трансфицировали как в Примере 3 РНК, синтезированной согласно Примеру 1, за исключением того, что доза РНК составляла 0,5 мкг/лунку в 1-й день, 0,5 мкг/лунку во 2-й день и 2 мкг/лунку на 3-й день, 2 мкг/лунку на 4-й день и 4 мкг/лунку на 5-й день. К 5-му дню можно было видеть небольшие колонии клеток, демонстрирующих морфологию, которая соответствует перепрограммированию. На 7-й день среду меняли на DMEM/F12+20%

Knockout™ Serum Replacement (Life Technologies Corporation)+1X заменимых аминокислот+2 мМ L-глутамин, кондиционировали на облученных мышинных эмбриональных фибробластах на протяжении 24 часов, а затем добавляли 20 нг/мЛ bFGF и 10 мкМ Y-27632. К 8-му дню можно было видеть крупные колонии с перепрограммированной морфологией. Колонии собирали на 10-й день и высевали в лунки, покрытые экстрактом базальной мембраны (Cultrex® Human BME Pathclear®, Trevigen Inc.). Клетки быстро росли, их пересевали для того, чтобы получить стабильные линии.

Пример 15 Получение глюкозозависимых инсулин-продуцирующих клеток

Клетки перепрограммировали согласно Примеру 11 или Примеру 12, а затем культивировали в DMEM/F12+0,2% ЧСА+0,5X N2 добавки+0,5X B27 добавки+100 нг/мЛ активина А+1 мкМ вортманнина на протяжении 4 дней, затем в 1:1 F12/IMDM+0,5% ЧСА+0,5% ITS добавки+0,5X B27 добавки+2 мкМ ретиноевой кислоты+20 нг/мЛ FGF7+50 нг/мЛ NOGGIN на протяжении 4 дней, затем в DMEM+0,5% ЧСА+1% ITS добавки+1X N2 добавки+50 нг/мЛ EGF на протяжении 5 дней, затем в DMEM/F12+1% ITS добавки+10 нг/мЛ bFGF+10 мМ никотинамида+50 нг/мЛ эксендина-4+10 нг/мЛ BMP4 на протяжении 7-9 дней для того, чтобы получить глюкозозависимые инсулин-продуцирующие клетки. В альтернативном варианте клетки перепрограммировали согласно Примеру 11 или Примеру 12, а затем культивировали в 1:1 F12/IMDM+0,5% ЧСА+0,5% ITS добавки+0,5X B27 добавки+2 мкМ ретиноевой кислоты+20 нг/мЛ FGF7+50 нг/мЛ NOGGIN на протяжении 4 дней, затем в DMEM+0,5% ЧСА+1% ITS добавки+1X N2 добавки+50 нг/мЛ EGF на протяжении 5 дней, затем в DMEM/F12+1% ITS добавки+10 нг/мЛ bFGF+10 мМ никотинамида+50 нг/мЛ эксендина-4+10 нг/мЛ BMP4 на протяжении 7-9 дней для того, чтобы получить глюкозозависимые инсулин-продуцирующие клетки без получения зрелых эндодермальных клеток. В альтернативном варианте клетки перепрограммировали согласно Примеру 11 или Примеру 12, а затем культивировали в 1:1 F12/IMDM+0,5% ЧСА+0,5% ITS добавки+0,5X B27 добавки+2 мкМ ретиноевой кислоты+20 нг/мЛ FGF7+50 нг/мЛ NOGGIN на протяжении 4 дней, затем в DMEM/F12+1% ITS добавки+10 нг/мЛ bFGF+10 мМ никотинамида+50 нг/мЛ эксендина-4+10 нг/мЛ BMP4 на протяжении 7-9 дней для того, чтобы получить глюкозозависимые инсулин-продуцирующие клетки без получения зрелых эндодермальных клеток и без роста клеток-предшественниц. Хотя эндодермальные клетки или инсулин-продуцирующие клетки можно отделить от других присутствующих в культуре клеток, при помощи данного способа получают достаточно высокое процентное содержание глюкозозависимых инсулин-продуцирующих клеток, поэтому в общем случае такое отделение не является необходимым. Полученные клетки затем можно использовать *in vitro* или *in vivo* для скрининга биоактивных молекул для исследования диабета или для разработки терапевтических препаратов от диабета.

Пример 16 Получение глюкозозависимых инсулин-продуцирующих клеток с использованием рекомбинантных белков

Клетки перепрограммировали согласно Примеру 11, а затем культивировали в DMEM/F12, 100 нг/мл активина А, 25 нг/мл Wnt3a, 0,01% рекомбинантном ЧСА, 1X ITSE на протяжении 1 дня, затем в DMEM/F12, 100 нг/мл активина А, 0,01% рекомбинантном ЧСА, 1X ITSE на протяжении 2 дней, затем в DMEM/F12, 50 нг/мл FGF10, 0,25 мкМ KAAD-циклопамина, 0,01% рекомбинантном ЧСА, 1X ITSE на протяжении 3 дней, затем в DMEM/F12, 1% B27, 2 мкМ полностью транс-ретиноевой кислоты, 50 нг/мл FGF10, 0,25 мкМ KAAD-циклопамина на протяжении 4 дней, затем в DMEM/F12, 1% B27, 1 мкМ ингибитора γ-секретазы DAPT, 50 нг/мл эксендина-4, 10

нМ бетацеллюлина, 10 мМ никотинамида на протяжении 2 дней, затем в DMEM/F12, 50 мг/л аскорбиновой кислоты-2-фосфата, 1% B27, 1 мкМ ингибитора γ -секретазы DAPT, 50 нг/мл эксендина-4, 50 нг/мл IGF-1, 50 нг/мл HGF, 10 нМ бетацеллюлина, 10 мМ никотинамида на протяжении 6 дней для того, чтобы получить глюкозозависимые

инсулин-продуцирующие клетки (ФИГ. 5А). Полученные клетки затем можно использовать *in vitro* или *in vivo* для скрининга биоактивных молекул для исследования диабета или для разработки терапевтических препаратов от диабета.

Пример 17 Индивидуальная заместительная клеточная терапия диабета I типа, включающая применение перепрограммированных клеток

Клетки кожи пациента перепрограммировали в глюкозозависимые инсулин-продуцирующие клетки согласно Примеру 12 и Примеру 14. Затем клетки ферментативным способом извлекали из емкости для культивирования и во внутрибрюшинное пространство или в воротную вену вводили от около 1×10^6 до около 1×10^7 клеток. В случае внутрибрюшинной инъекции клетки предварительно смешивали с белками внеклеточного матрикса, чтобы предотвратить избыточную миграцию. Клетки приживались и начинали вырабатывать инсулин. Отслеживали уровни инсулина/С-пептида и в случае необходимости проводили дополнительные инъекции.

Пример 18 Синтез РНК TALEN

РНК, кодирующую совпадающие по 20 п.о. TALEN, синтезировали с ДНК матрицы как в Примере 1 (ФИГ. 6А-В и ФИГ. 7) (Таблица 2). Полученные РНК анализировали при помощи электрофореза в агарозном геле для того, чтобы оценить качество РНК. Затем РНК разводили до 200 нг/мкл и добавляли ингибитор РНКазы (Superase-In™, Life Technologies Corporation) в концентрации 1 мкл/100мкг РНК. Растворы РНК хранили при 4°C. РНК, кодирующие каждую половину из пары TALEN смешивали в мольном отношении 1:1.

Таблица 2.

Матрица	Нуклеотиды	Объем реакции/мкл	Выход <i>in vitro</i> транскрипции/мкг
ХРА-L1	А, Г, псУ, 5мЦ	20	120,0
ХРА-L2	А, Г, псУ, 5мЦ	20	114,0
ХРА-R1	А, Г, псУ, 5мЦ	20	159,6
CCR5-L1	А, Г, псУ, 5мЦ	20	170,4
CCR5-L2	А, Г, псУ, 5мЦ	20	142,8
CCR5-R1	А, Г, псУ, 5мЦ	20	132,0
CCR5-R2	А, Г, псУ, 5мЦ	20	154,8
CCR5-L1	А, Г, псУ, 5мЦ	10	56,6
CCR5-L2	А, Г, псУ, 5мЦ	10	58,5
CCR5-R1	А, Г, псУ, 5мЦ	10	56,8
CCR5-R2	А, Г, псУ, 5мЦ	10	58,7

Пример 19 Синтез РНК TALEN, нацеленных на ген CCR5

РНК, кодирующую TALEN L1: TCATTTTCCATACAGTCAGT, L2: TTTTCCATACAGTCAGTATC, R1: TGACATCTTTAATGTCTGG, и R2: TATCTTTAATGTCTGGAAAT синтезировали согласно Примеру 18. Эти TALEN нацелены на участки в 20 п.о. гена CCR5, находящиеся на смысловой (L1 и L2) или антисмысловой (R1 и R2) цепи. Готовили следующие пары TALEN: L1 и R1, L1 и R2, L2 и R1 и L2 и R2.

Пример 20 Генное редактирование гена CCR5 с использованием РНК TALEN и перепрограммирование человеческих фибробластов без ДНК, фидеров,

иммунодепрессантов и кондиционирования

Первичные человеческие фибробласты высевали на 6-луночные планшеты, покрытые рекомбинантным человеческим фибронектином и рекомбинантным человеческим витронектином (каждый разводили в DMEM/F12 до концентрации 1 мкг/мл, 1 мл/лунку, и инкубировали при комнатной температуре на протяжении 1 ч) при плотности в 10,000 клеток/лунку в трансфекционную среду. На следующий день клетки трансфицировали как в Примере 3 РНК, за исключением того, что доза РНК составляла 0,5 мкг/лунку, а РНК синтезировали согласно Примеру 19. Начиная со следующего дня клетки перепрограммировали согласно Примеру 11. Как и в Примере 11 было видно крупные колонии клеток, демонстрирующих морфологию, которая соответствует перепрограммированию. Снимки делали на 9-й день (ФИГ. 8).

Пример 21 Трансфекция клеток РНК TALEN и матрицей для репарации ДНК

0,5 мкг РНК+0,5 мкг ДНК, содержащей участок в 1001 п.о., простирающийся от 500 п.о. выше целевого месторасположения двухцепочечного разрыва до 500 п.о. ниже целевого месторасположения двухцепочечного разрыва, и 6 мкл трансфекционного реагента (Липофектамин™ 2000, Life Technologies Corporation) сначала разводили отдельно в среде для комплексирования (Опти-MEM®) до общего объема, составляющего около 60 мкл для каждого компонента. Затем разведенные РНК+ДНК и трансфекционный реагент смешивали и инкубировали на протяжении 15 мин при комнатной температуре согласно инструкциям производителя трансфекционного реагента. Затем комплексы добавляли к клеткам в культуре. От 60 мкл до 120 мкл комплексов добавляли в каждую лунку 6-луночного планшета, в которых уже находилось по 2 мл трансфекционной среды. Затем планшеты аккуратно встряхивали для того, чтобы распределить комплексы по объему лунки. Клетки инкубировали вместе с комплексами от 2 часов до ночи перед тем, как сменить среду свежей трансфекционной средой (2 мл/лунку).

Пример 22 Генное редактирование с использованием РНК TALEN и матрицы для репарации ДНК и перепрограммирование человеческих фибробластов без ДНК, фидеров, иммунодепрессантов и кондиционирования

Первичные человеческие фибробласты высевали на 6-луночные планшеты при плотности в 10,000 клеток/лунку в среду для фибробластов (DMEM+10% фетальная бычья сыворотка). Через 6 ч среду меняли на трансфекционную среду, содержащую обработанный ЧСА и не содержащую иммунодепрессантов, а клетки трансфицировали согласно Примеру 21. Начиная со следующего дня клетки перепрограммировали согласно Примеру 11 или Примеру 12, за исключением того, что этапы первичного высевания и замены среды были опущены.

Пример 23 Получение гемопоэтических клеток

Клетки перепрограммировали согласно Примеру 11, а затем культивировали в IMDM+0,5% ЧСА+1х ITS добавки+450 мкМ монотиоглицерола+2 мМ L-глутамин+1X заменимых аминокислот+50 нг/мл BMP4+50 нг/мл VEGF+50 нг/мл bFGF на протяжении 6 дней для того, чтобы получить гемопоэтические клетки (ФИГ. 5Б). В альтернативном варианте клетки перепрограммировали согласно Примеру 11, или Примеру 12, или Примеру 20, или Примеру 22, а затем культивировали в IMDM+0,5% ЧСА+1х ITS добавки+450 мкМ монотиоглицерола+2 мМ L-глутамин+1X заменимых аминокислот+50 нг/мл BMP4+50 нг/мл VEGF+50 нг/мл bFGF на протяжении 6 дней, затем в IMDM+0,5% ЧСА+1х ITS добавки+0,1 мМ 2-меркаптоэтанола+5 ед./мл гепарина+ 10 нг/мл ТПО+25 нг/мл ФСК+25 нг/мл FLT3L+10 нг/мл IL-3+10 нг/мл IL-6 на протяжении 8 дней для того, чтобы получить гемопоэтические клетки. В альтернативном варианте

клетки перепрограммировали согласно Примеру 11, или Примеру 12, или Примеру 20, или Примеру 22, а затем повторно высевали в коллаген IV и культивировали в IMDM+0,5% ЧСА+1х ITS добавки+450 мкМ монотиоглицерола+2 мМ L-глутамин+1х заменимых аминокислот+50 нг/мЛ BMP4+50 нг/мЛ VEGF+50 нг/мЛ bFGF на протяжении 6 дней, затем в IMDM+0,5% ЧСА+1х ITS добавки+0,1 мМ 2-меркаптоэтанол+5 ед./мЛ гепарина+10 нг/мЛ ТПО+25 нг/мЛ ФСК+25 нг/мЛ FLT3L+10 нг/мЛ IL-3+10 нг/мЛ IL-6 на протяжении 8 дней для того, чтобы получить гемопоэтические клетки. В альтернативном варианте клетки перепрограммировали согласно Примеру 11, или Примеру 12, или Примеру 20, или Примеру 22, а затем культивировали в 1:1 F12/IMDM+0,5% ЧСА+1х ITS добавки+4,5 мкг/мЛ холестерина+10 мкг/мЛ жирных кислот из рыбьего жира (метил эфиров)+25 мкг/мЛ полиоксиэтиленсорбитан моноолеата+2 мкг/мЛ D-α-токоферол ацетата+450 мкМ монотиоглицерола+2 мМ L-глутамин+25 нг/мЛ BMP4+25 нг/мЛ VEGF+25 нг/мЛ bFGF+20 нг/мЛ ФСК на протяжении 10 дней для того, чтобы получить гемопоэтические клетки.

Пример 24 Индивидуальная заместительная клеточная терапия заболевания крови, включающая применение перепрограммированных клеток

Клетки кожи пациента перепрограммировали в гемопоэтические клетки согласно Примеру 23. Затем клетки извлекали из емкости для культивирования, и за период времени, составляющий несколько часов, в главную вену вводили от около 1×10^6 до около 1×10^7 клеток/кг массы тела пациента.

Пример 25 Индивидуальная заместительная клеточная терапия ВИЧ/СПИД, включающая применение генетически отредактированных и перепрограммированных клеток

Клетки кожи пациента генетически редактировали и перепрограммировали в гемопоэтические клетки согласно Примеру 23. Затем клетки ферментативным способом извлекали из емкости для культивирования, и за период времени, составляющий несколько часов, в главную вену вводили от около 1×10^6 до около 1×10^7 клеток/кг массы тела пациента. Гемопоэтические клетки оседали в костномозговой полости и приживались. В альтернативном варианте клетки кожи пациента генетически редактировали и перепрограммировали в гемопоэтические клетки согласно Примеру 23, затем клетки ферментативным способом извлекали из емкости для культивирования, и выделяли клетки CD34+/CD90+/Lin- или CD34+/CD49f+/Lin-. Пациенту в главную вену вводили от около 1×10^3 до около 1×10^5 клеток. Гемопоэтические клетки оседали в костномозговой полости и приживались.

Пример 26 Модели сердечных заболеваний для скрининга биоактивных молекул

Клетки перепрограммировали согласно Примеру 11, а затем культивировали в DMEM/F12+0,2% ЧСА+0,5X N2 добавки+0,5X B27 добавки+100 нг/мЛ активина A+1 мкМ вортманнина на протяжении 4 дней, затем в 1:1 F12/IMDM+0,5% ЧСА+0,5% ITS добавки+0,5X B27 добавки+2 мкМ ретиноевой кислоты+20 нг/мЛ FGF7+50 нг/мЛ NOGIN на протяжении 4 дней, затем в DMEM/F12+1% ITS добавки+10 нг/мЛ bFGF+10 мМ никотинамида+50 нг/мЛ эксендина-4+10 нг/мЛ BMP4 на протяжении 7-9 дней для того, чтобы получить сердечные клетки (ФИГ. 5B). В альтернативном варианте клетки перепрограммировали согласно Примеру 12. Хотя сердечные клетки можно отделить от других присутствующих в культуре клеток, при помощи данного способа получают достаточно высокое процентное содержание сердечных клеток, поэтому в общем случае такое отделение не является необходимым. Полученные клетки затем можно использовать *in vitro* или *in vivo* для скрининга биоактивных молекул для

исследования сердечной недостаточности или для разработки терапевтических препаратов от сердечной недостаточности. Полученные клетки также можно использовать для исследования кардиотоксичности.

Пример 27 Индивидуальная заместительная клеточная терапия ишемической кардиомиопатии, включающая применение перепрограммированных клеток

Клетки кожи пациента перепрограммировали в сердечные клетки согласно Примеру 26. Затем клетки ферментативным способом извлекали из емкости для культивирования, и вводили от около 1×10^6 до около 1×10^7 клеток в перикард или от около 1×10^3 до около 1×10^5 клеток в одну или более коронарных артерий. Клетки приживались, а дополнительные инъекции проводили в случае необходимости.

Пример 28 Модели заболеваний сетчатки для скрининга биоактивных молекул

Клетки перепрограммировали согласно Примеру 11 или Примеру 12, а затем культивировали в DMEM/F12+0,2% ЧСА+0,5X N2 добавки+0,5X B27 добавки на протяжении 7 дней для того, чтобы получить ретинальные клетки. Полученные клетки затем можно использовать *in vitro* или *in vivo* для скрининга биоактивных молекул для исследования заболеваний сетчатки или для разработки терапевтических препаратов от заболеваний сетчатки.

Пример 29 Индивидуальная заместительная клеточная терапия макулярной дегенерации, включающая применение перепрограммированных клеток

Клетки кожи пациента перепрограммировали в ретинальные клетки согласно Примеру 28. Затем клетки ферментативным способом извлекали из емкости для культивирования, и вводили от около 1×10^4 до около 1×10^5 клеток в сетчатку или чуть ниже. Клетки приживались, а дополнительные инъекции проводили в случае необходимости.

ЭКВИВАЛЕНТЫ

Специалисты в данной области техники признают или смогут установить при помощи стандартных экспериментов существование многочисленных эквивалентных вариантов описанных в данном тексте отдельных вариантов реализации изобретения. Такие эквивалентные варианты включены в объем приведенной ниже формулы изобретения.

ВКЛЮЧЕНИЕ ПОСРЕДСТВОМ ССЫЛОК

Все патентные заявки и публикации, перечисленные в тексте, в полном объеме включены в данный текст посредством ссылок.

(57) Формула изобретения

1. Терапевтическая композиция для придания устойчивости к ВИЧ-инфекции субъекту-человеку, содержащая эффективное количество генно-редактированных гемопоэтических клеток, где генно-редактированная гемопоэтическая клетка включает:

транскрибированную *in vitro* синтетическую молекулу РНК, кодирующую генно-редактирующий белок, где указанный генно-редактирующий белок содержит ДНК-связывающий домен и каталитический домен нуклеазы, который осуществляет двухцепочечный разрыв в ДНК указанной гемопоэтической клетки; и

двухцепочечный разрыв в гене С-С хемокинового рецептора типа 5 (CCR5) или гене С-Х-С хемокинового рецептора типа 4 (CXCR4), где указанный двухцепочечный разрыв осуществлен указанным генно-редактирующим белком,

где указанный двухцепочечный разрыв в гене CCR5 или гене CXCR4 снижает или элиминирует функцию гена CCR5 или гена CXCR4, и указанная сниженная или элиминированная функция придает устойчивость к ВИЧ-инфекции субъекту.

2. Терапевтическая композиция по п.1, где указанный генно-редактирующий белок выбран из транскрипционной активаторо-подобной эффекторной нуклеазы (TALEN) и цинк-пальцевой нуклеазы.

5 3. Терапевтическая композиция по п.1, где указанная транскрибированная in vitro синтетическая молекула РНК дополнительно содержит одно или более из следующего: 5'-кэп, 5'-кэп 1-структура и 3'-поли(А) хвост.

4. Терапевтическая композиция по п.1, где двухцепочечный разрыв находится в пределах приблизительно 5,000,000 оснований от сайта инициации транскрипции гена CCR5 или CXCR4.

10 5. Терапевтическая композиция по п.1, где указанная гемопоэтическая клетка представляет собой гемопоэтическую стволовую клетку.

15

20

25

30

35

40

45

1

1	ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ
2	
3	<110> Factor Bioscience Inc.
4	Angel, Matthew
5	
6	<120> СПОСОБЫ И ПРЕПАРАТЫ ДЛЯ ТРАНСФЕКЦИИ КЛЕТОК
7	
8	<130> FABI-001/01WO
9	
10	<150> US 61/566,948
11	<151> 2011-12-05
12	
13	<160> 4
14	
15	<170> PatentIn версия 3.5
16	
17	<210> 1
18	<211> 360
19	<212> Белок
20	<213> Homo sapiens
21	
22	<400> 1
23	
24	Met Ala Gly His Leu Ala Ser Asp Phe Ala Phe Ser Pro Pro Pro Gly
25	1 5 10 15
26	
27	
28	Gly Gly Gly Asp Gly Pro Gly Gly Pro Glu Pro Gly Trp Val Asp Pro
29	20 25 30
30	
31	
32	Arg Thr Trp Leu Ser Phe Gln Gly Pro Pro Gly Gly Pro Gly Ile Gly
33	35 40 45
34	
35	
36	Pro Gly Val Gly Pro Gly Ser Glu Val Trp Gly Ile Pro Pro Cys Pro
37	50 55 60
38	
39	
40	Pro Pro Tyr Glu Phe Cys Gly Gly Met Ala Tyr Cys Gly Pro Gln Val
41	65 70 75 80
42	
43	
44	Gly Val Gly Leu Val Pro Gln Gly Gly Leu Glu Thr Ser Gln Pro Glu
45	85 90 95
46	
47	
48	Gly Glu Ala Gly Val Gly Val Glu Ser Asn Ser Asp Gly Ala Ser Pro
49	100 105 110
50	
51	

2

52 Glu Pro Cys Thr Val Thr Pro Gly Ala Val Lys Leu Glu Lys Glu Lys
 53 115 120 125
 54
 55
 56 Leu Glu Gln Asn Pro Glu Glu Ser Gln Asp Ile Lys Ala Leu Gln Lys
 57 130 135 140
 58
 59
 60 Glu Leu Glu Gln Phe Ala Lys Leu Leu Lys Gln Lys Arg Ile Thr Leu
 61 145 150 155 160
 62
 63
 64 Gly Tyr Thr Gln Ala Asp Val Gly Leu Thr Leu Gly Val Leu Phe Gly
 65 165 170 175
 66
 67
 68 Lys Val Phe Ser Gln Thr Thr Ile Cys Arg Phe Glu Ala Leu Gln Leu
 69 180 185 190
 70
 71
 72 Ser Phe Lys Asn Met Cys Lys Leu Arg Pro Leu Leu Gln Lys Trp Val
 73 195 200 205
 74
 75
 76 Glu Glu Ala Asp Asn Asn Glu Asn Leu Gln Glu Ile Cys Lys Ala Glu
 77 210 215 220
 78
 79
 80 Thr Leu Val Gln Ala Arg Lys Arg Lys Arg Thr Ser Ile Glu Asn Arg
 81 225 230 235 240
 82
 83
 84 Val Arg Gly Asn Leu Glu Asn Leu Phe Leu Gln Cys Pro Lys Pro Thr
 85 245 250 255
 86
 87
 88 Leu Gln Gln Ile Ser His Ile Ala Gln Gln Leu Gly Leu Glu Lys Asp
 89 260 265 270
 90
 91
 92 Val Val Arg Val Trp Phe Cys Asn Arg Arg Gln Lys Gly Lys Arg Ser
 93 275 280 285
 94
 95
 96 Ser Ser Asp Tyr Ala Gln Arg Glu Asp Phe Glu Ala Ala Gly Ser Pro
 97 290 295 300
 98
 99
 100 Phe Ser Gly Gly Pro Val Ser Phe Pro Leu Ala Pro Gly Pro His Phe
 101 305 310 315 320
 102

103
 104 Gly Thr Pro Gly Tyr Gly Ser Pro His Phe Thr Ala Leu Tyr Ser Ser
 105 325 330 335
 106
 107
 108 Val Pro Phe Pro Glu Gly Glu Ala Phe Pro Pro Val Ser Val Thr Thr
 109 340 345 350
 110
 111
 112 Leu Gly Ser Pro Met His Ser Asn
 113 355 360
 114
 115
 116 <210> 2
 117 <211> 317
 118 <212> Белок
 119 <213> Homo sapiens
 120
 121 <400> 2
 122
 123 Met Tyr Asn Met Met Glu Thr Glu Leu Lys Pro Pro Gly Pro Gln Gln
 124 1 5 10 15
 125
 126
 127 Thr Ser Gly Gly Gly Gly Gly Asn Ser Thr Ala Ala Ala Ala Gly Gly
 128 20 25 30
 129
 130
 131 Asn Gln Lys Asn Ser Pro Asp Arg Val Lys Arg Pro Met Asn Ala Phe
 132 35 40 45
 133
 134
 135 Met Val Trp Ser Arg Gly Gln Arg Arg Lys Met Ala Gln Glu Asn Pro
 136 50 55 60
 137
 138
 139 Lys Met His Asn Ser Glu Ile Ser Lys Arg Leu Gly Ala Glu Trp Lys
 140 65 70 75 80
 141
 142
 143 Leu Leu Ser Glu Thr Glu Lys Arg Pro Phe Ile Asp Glu Ala Lys Arg
 144 85 90 95
 145
 146
 147 Leu Arg Ala Leu His Met Lys Glu His Pro Asp Tyr Lys Tyr Arg Pro
 148 100 105 110
 149
 150
 151 Arg Arg Lys Thr Lys Thr Leu Met Lys Lys Asp Lys Tyr Thr Leu Pro
 152 115 120 125
 153

154
 155 Gly Gly Leu Leu Ala Pro Gly Gly Asn Ser Met Ala Ser Gly Val Gly
 156 130 135 140
 157
 158
 159 Val Gly Ala Gly Leu Gly Ala Gly Val Asn Gln Arg Met Asp Ser Tyr
 160 145 150 155 160
 161
 162
 163 Ala His Met Asn Gly Trp Ser Asn Gly Ser Tyr Ser Met Met Gln Asp
 164 165 170 175
 165
 166
 167 Gln Leu Gly Tyr Pro Gln His Pro Gly Leu Asn Ala His Gly Ala Ala
 168 180 185 190
 169
 170
 171 Gln Met Gln Pro Met His Arg Tyr Asp Val Ser Ala Leu Gln Tyr Asn
 172 195 200 205
 173
 174
 175 Ser Met Thr Ser Ser Gln Thr Tyr Met Asn Gly Ser Pro Thr Tyr Ser
 176 210 215 220
 177
 178
 179 Met Ser Tyr Ser Gln Gln Gly Thr Pro Gly Met Ala Leu Gly Ser Met
 180 225 230 235 240
 181
 182
 183 Gly Ser Val Val Lys Ser Glu Ala Ser Ser Ser Pro Pro Val Val Thr
 184 245 250 255
 185
 186
 187 Ser Ser Ser His Ser Arg Ala Pro Cys Gln Ala Gly Asp Leu Arg Asp
 188 260 265 270
 189
 190
 191 Met Ile Ser Met Tyr Leu Pro Gly Ala Glu Val Pro Glu Pro Ala Ala
 192 275 280 285
 193
 194
 195 Pro Ser Arg Leu His Met Ser Gln His Tyr Gln Ser Gly Pro Val Pro
 196 290 295 300
 197
 198
 199 Gly Thr Ala Ile Asn Gly Thr Leu Pro Leu Ser His Met
 200 305 310 315
 201
 202
 203 <210> 3
 204 <211> 479

205 <212> Белок
 206 <213> Homo sapiens
 207
 208 <400> 3
 209
 210 Met Arg Gln Pro Pro Gly Glu Ser Asp Met Ala Val Ser Asp Ala Leu
 211 1 5 10 15
 212
 213
 214 Leu Pro Ser Phe Ser Thr Phe Ala Ser Gly Pro Ala Gly Arg Glu Lys
 215 20 25 30
 216
 217
 218 Thr Leu Arg Gln Ala Gly Ala Pro Asn Asn Arg Trp Arg Glu Glu Leu
 219 35 40 45
 220
 221
 222 Ser His Met Lys Arg Leu Pro Pro Val Leu Pro Gly Arg Pro Tyr Asp
 223 50 55 60
 224
 225
 226 Leu Ala Ala Ala Thr Val Ala Thr Asp Leu Glu Ser Gly Gly Ala Gly
 227 65 70 75 80
 228
 229
 230 Ala Ala Cys Gly Gly Ser Asn Leu Ala Pro Leu Pro Arg Arg Glu Thr
 231 85 90 95
 232
 233
 234 Glu Glu Phe Asn Asp Leu Leu Asp Leu Asp Phe Ile Leu Ser Asn Ser
 235 100 105 110
 236
 237
 238 Leu Thr His Pro Pro Glu Ser Val Ala Ala Thr Val Ser Ser Ser Ala
 239 115 120 125
 240
 241
 242 Ser Ala Ser Ser Ser Ser Ser Pro Ser Ser Ser Gly Pro Ala Ser Ala
 243 130 135 140
 244
 245
 246 Pro Ser Thr Cys Ser Phe Thr Tyr Pro Ile Arg Ala Gly Asn Asp Pro
 247 145 150 155 160
 248
 249
 250 Gly Val Ala Pro Gly Gly Thr Gly Gly Gly Leu Leu Tyr Gly Arg Glu
 251 165 170 175
 252
 253
 254 Ser Ala Pro Pro Pro Thr Ala Pro Phe Asn Leu Ala Asp Ile Asn Asp
 255 180 185 190

256
 257
 258 Val Ser Pro Ser Gly Gly Phe Val Ala Glu Leu Leu Arg Pro Glu Leu
 259 195 200 205
 260
 261
 262 Asp Pro Val Tyr Ile Pro Pro Gln Gln Pro Gln Pro Pro Gly Gly Gly
 263 210 215 220
 264
 265
 266 Leu Met Gly Lys Phe Val Leu Lys Ala Ser Leu Ser Ala Pro Gly Ser
 267 225 230 235 240
 268
 269
 270 Glu Tyr Gly Ser Pro Ser Val Ile Ser Val Ser Lys Gly Ser Pro Asp
 271 245 250 255
 272
 273
 274 Gly Ser His Pro Val Val Val Ala Pro Tyr Asn Gly Gly Pro Pro Arg
 275 260 265 270
 276
 277
 278 Thr Cys Pro Lys Ile Lys Gln Glu Ala Val Ser Ser Cys Thr His Leu
 279 275 280 285
 280
 281
 282 Gly Ala Gly Pro Pro Leu Ser Asn Gly His Arg Pro Ala Ala His Asp
 283 290 295 300
 284
 285
 286 Phe Pro Leu Gly Arg Gln Leu Pro Ser Arg Thr Thr Pro Thr Leu Gly
 287 305 310 315 320
 288
 289
 290 Leu Glu Glu Val Leu Ser Ser Arg Asp Cys His Pro Ala Leu Pro Leu
 291 325 330 335
 292
 293
 294 Pro Pro Gly Phe His Pro His Pro Gly Pro Asn Tyr Pro Ser Phe Leu
 295 340 345 350
 296
 297
 298 Pro Asp Gln Met Gln Pro Gln Val Pro Pro Leu His Tyr Gln Glu Leu
 299 355 360 365
 300
 301
 302 Met Pro Pro Gly Ser Cys Met Pro Glu Glu Pro Lys Pro Lys Arg Gly
 303 370 375 380
 304
 305
 306 Arg Arg Ser Trp Pro Arg Lys Arg Thr Ala Thr His Thr Cys Asp Tyr

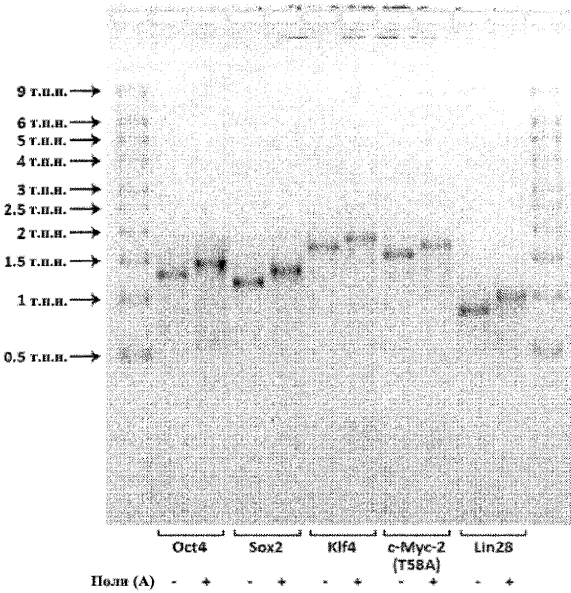
307 385 390 395 400
308
309
310 Ala Gly Cys Gly Lys Thr Tyr Thr Lys Ser Ser His Leu Lys Ala His
311 405 410 415
312
313
314 Leu Arg Thr His Thr Gly Glu Lys Pro Tyr His Cys Asp Trp Asp Gly
315 420 425 430
316
317
318 Cys Gly Trp Lys Phe Ala Arg Ser Asp Glu Leu Thr Arg His Tyr Arg
319 435 440 445
320
321
322 Lys His Thr Gly His Arg Pro Phe Gln Cys Gln Lys Cys Asp Arg Ala
323 450 455 460
324
325
326 Phe Ser Arg Ser Asp His Leu Ala Leu His Met Lys Arg His Phe
327 465 470 475
328
329
330 <210> 4
331 <211> 454
332 <212> Белок
333 <213> Homo sapiens
334
335 <400> 4
336
337 Met Asp Phe Phe Arg Val Val Glu Asn Gln Gln Pro Pro Ala Thr Met
338 1 5 10 15
339
340
341 Pro Leu Asn Val Ser Phe Thr Asn Arg Asn Tyr Asp Leu Asp Tyr Asp
342 20 25 30
343
344
345 Ser Val Gln Pro Tyr Phe Tyr Cys Asp Glu Glu Glu Asn Phe Tyr Gln
346 35 40 45
347
348
349 Gln Gln Gln Gln Ser Glu Leu Gln Pro Pro Ala Pro Ser Glu Asp Ile
350 50 55 60
351
352
353 Trp Lys Lys Phe Glu Leu Leu Pro Thr Pro Pro Leu Ser Pro Ser Arg
354 65 70 75 80
355
356
357 Arg Ser Gly Leu Cys Ser Pro Ser Tyr Val Ala Val Thr Pro Phe Ser

358 85 90 95
 359
 360
 361 Leu Arg Gly Asp Asn Asp Gly Gly Gly Gly Ser Phe Ser Thr Ala Asp
 362 100 105 110
 363
 364
 365 Gln Leu Glu Met Val Thr Glu Leu Leu Gly Gly Asp Met Val Asn Gln
 366 115 120 125
 367
 368
 369 Ser Phe Ile Cys Asp Pro Asp Asp Glu Thr Phe Ile Lys Asn Ile Ile
 370 130 135 140
 371
 372
 373 Ile Gln Asp Cys Met Trp Ser Gly Phe Ser Ala Ala Ala Lys Leu Val
 374 145 150 155 160
 375
 376
 377 Ser Glu Lys Leu Ala Ser Tyr Gln Ala Ala Arg Lys Asp Ser Gly Ser
 378 165 170 175
 379
 380
 381 Pro Asn Pro Ala Arg Gly His Ser Val Cys Ser Thr Ser Ser Leu Tyr
 382 180 185 190
 383
 384
 385 Leu Gln Asp Leu Ser Ala Ala Ala Ser Glu Cys Ile Asp Pro Ser Val
 386 195 200 205
 387
 388
 389 Val Phe Pro Tyr Pro Leu Asn Asp Ser Ser Ser Pro Lys Ser Cys Ala
 390 210 215 220
 391
 392
 393 Ser Gln Asp Ser Ser Ala Phe Ser Pro Ser Ser Asp Ser Leu Leu Ser
 394 225 230 235 240
 395
 396
 397 Ser Thr Glu Ser Ser Pro Gln Gly Ser Pro Glu Pro Leu Val Leu His
 398 245 250 255
 399
 400
 401 Glu Glu Thr Pro Pro Thr Thr Ser Ser Asp Ser Glu Glu Glu Gln Glu
 402 260 265 270
 403
 404
 405 Asp Glu Glu Glu Ile Asp Val Val Ser Val Glu Lys Arg Gln Ala Pro
 406 275 280 285
 407
 408

409 Gly Lys Arg Ser Glu Ser Gly Ser Pro Ser Ala Gly Gly His Ser Lys
 410 290 295 300
 411
 412
 413 Pro Pro His Ser Pro Leu Val Leu Lys Arg Cys His Val Ser Thr His
 414 305 310 315 320
 415
 416
 417 Gln His Asn Tyr Ala Ala Pro Pro Ser Thr Arg Lys Asp Tyr Pro Ala
 418 325 330 335
 419
 420
 421 Ala Lys Arg Val Lys Leu Asp Ser Val Arg Val Leu Arg Gln Ile Ser
 422 340 345 350
 423
 424
 425 Asn Asn Arg Lys Cys Thr Ser Pro Arg Ser Ser Asp Thr Glu Glu Asn
 426 355 360 365
 427
 428
 429 Val Lys Arg Arg Thr His Asn Val Leu Glu Arg Gln Arg Arg Asn Glu
 430 370 375 380
 431
 432
 433 Leu Lys Arg Ser Phe Phe Ala Leu Arg Asp Gln Ile Pro Glu Leu Glu
 434 385 390 395 400
 435
 436
 437 Asn Asn Glu Lys Ala Pro Lys Val Val Ile Leu Lys Lys Ala Thr Ala
 438 405 410 415
 439
 440
 441 Tyr Ile Leu Ser Val Gln Ala Glu Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu
 442 420 425 430
 443
 444
 445 Asp Leu Leu Arg Lys Arg Arg Glu Gln Leu Lys His Lys Leu Glu Gln
 446 435 440 445
 447
 448
 449 Leu Arg Asn Ser Cys Ala
 450 450
 451

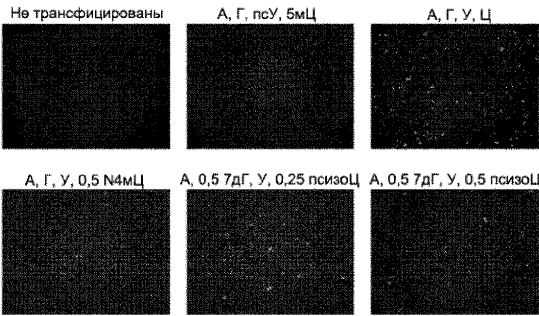
1/11

ФИГ. 1

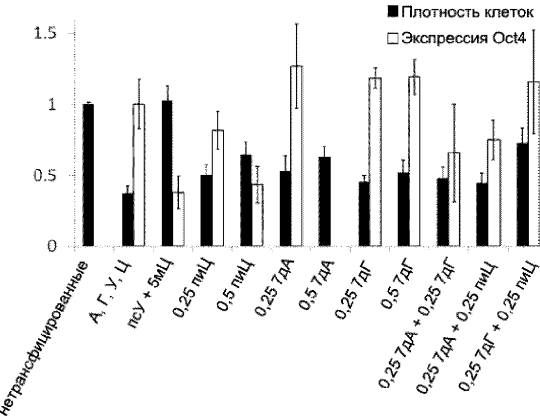


2/11

ФИГ. 2А

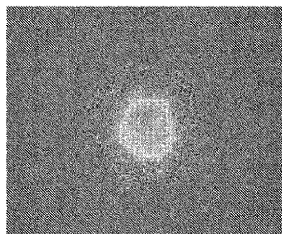


ФИГ. 2Б

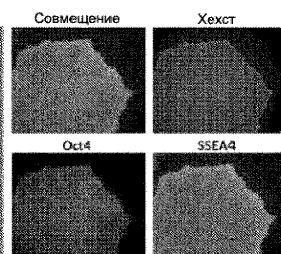


3/11

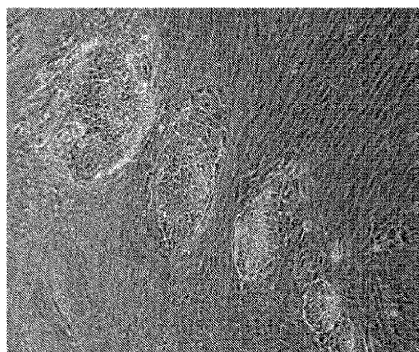
ФИГ. 3А



ФИГ. 3Б

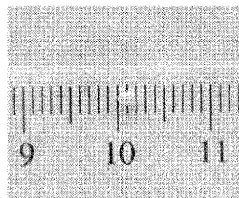


ФИГ. 3В

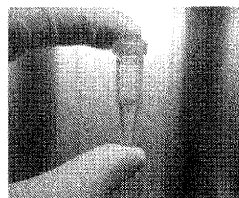


4/11

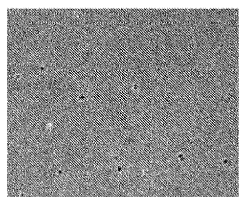
ФИГ. 4А



ФИГ. 4Б

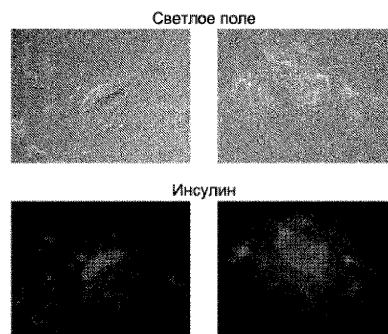


ФИГ. 4В

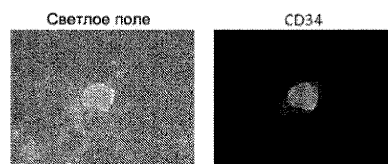


5/11

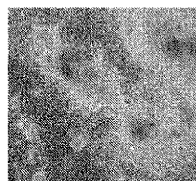
ФИГ. 5А



ФИГ. 5Б

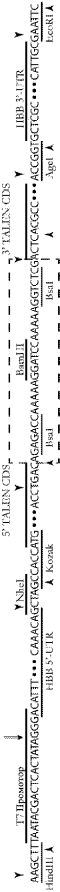


ФИГ. 5В

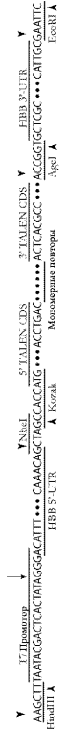


611

ФНТ. 6А



ФНТ. 6Б



ФНТ. 6В



711

ФИГ. 7

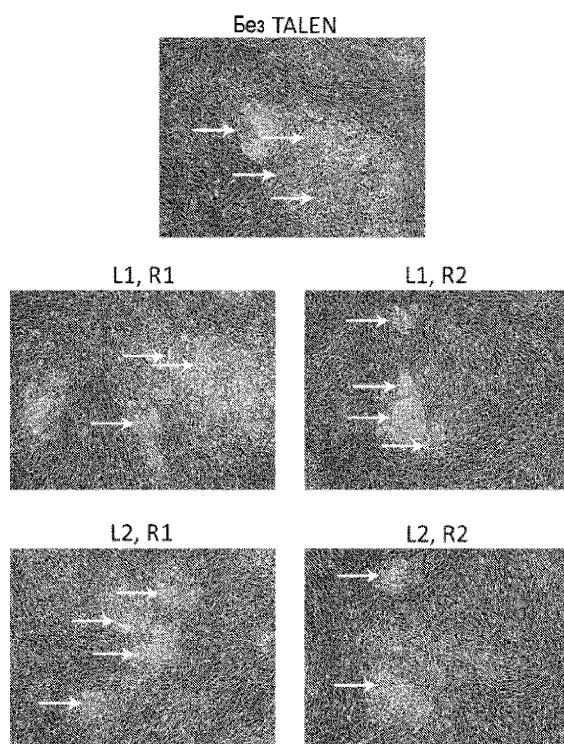
[illegible]

Где $x(02)x \rightarrow x(20)x$ является одним из

ААСАТС	{RVD NI, соединяется с А}
ААССГА	{RVD NG, соединяется с Т}
САТГАС	{RVD ND, соединяется с С}
СААААС	{RVD NN, соединяется с G или A}

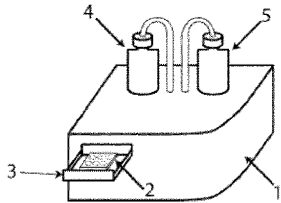
8/11

ФИГ. 8

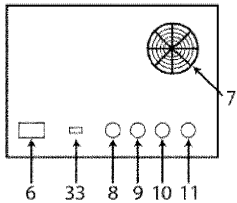


9/11

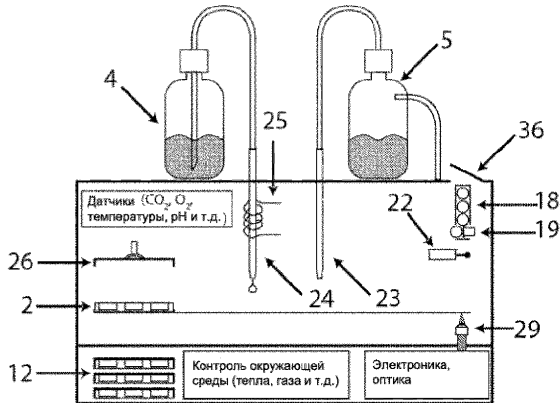
ФИГ. 9А



ФИГ. 9Б

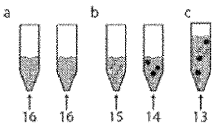


ФИГ. 9В

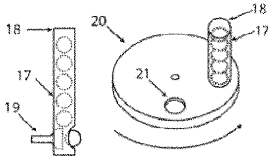


10/11

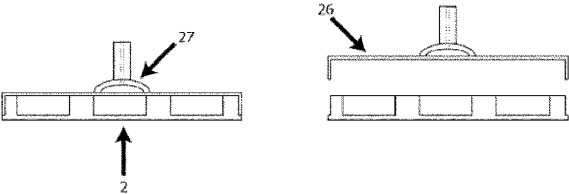
ФИГ. 10А



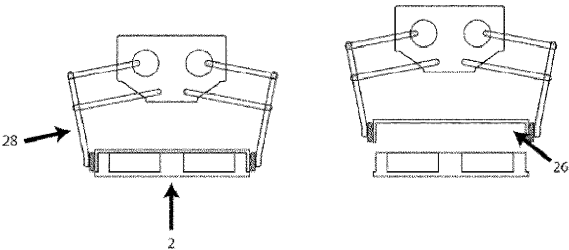
ФИГ. 10Б



ФИГ. 10В



ФИГ. 10Г



ФИГ. 11

11/11

