

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202293349** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.04.24

(22) Дата подачи заявки
2021.07.01

(51) Int. Cl. *C12N 5/074* (2010.01)
C12N 15/11 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C12N 5/077 (2010.01)

(54) КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ДЛЯ ПЕРЕПРОГРАММИРОВАНИЯ КЛЕТОК С ПРИМЕНЕНИЕМ КОЛЬЦЕВОЙ РНК

(31) **63/046,976**

(32) **2020.07.01**

(33) **US**

(86) **PCT/US2021/040094**

(87) **WO 2022/006399 2022.01.06**

(71) Заявитель:
**ЭЛЕВЭЙТБАЙО ТЕКНОЛОДЖИЗ,
ИНК. (US)**

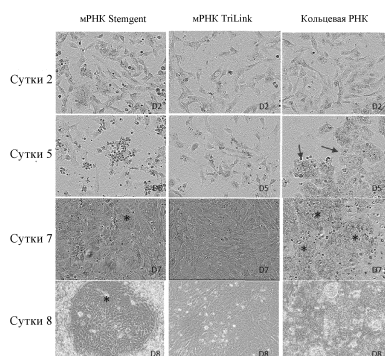
(72) Изобретатель:

**Нараян Сантош, Тиль Остин,
Карпентер Мелисса, Файнер Митчелл
Говард, Ян Миранда, Плева Шерилен
(US)**

(74) Представитель:

**Поликарпов А.В., Соколова М.В.,
Путинцев А.И., Черкас Д.А., Игнатьев
А.В., Билык А.В., Дмитриев А.В.,
Бучака С.М., Бельтюкова М.В. (RU)**

(57) Предложены рекомбинантные кольцевые РНК, содержащие по меньшей мере одну последовательность, кодирующую белок, где последовательность, кодирующая белок, кодирует фактор перепрограммирования (например, фактор транскрипции), где указанный фактор перепрограммирования представляет собой Oct3/4, Klf4, Sox2, Nanog, Lin28, c-Мус или L-Мус или их фрагмент или вариант. Также предложены способы получения индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (iPSC), включающие приведение соматической клетки в контакт с по меньшей мере одной из описанных здесь рекомбинантных кольцевых РНК и поддержание клетки в условиях, при которых получают перепрограммированную iPSC.



A1

202293349

202293349

A1

PCT/US2021/040094

МПК: C12N 5/074 (2010.01) C12N 15/63 (2006.01)

C12N 15/11 (2006.01) C12N 5/077 (2010.01)

КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ДЛЯ ПЕРЕПРОГРАММИРОВАНИЯ КЛЕТОК С ПРИМЕНЕНИЕМ КОЛЬЦЕВОЙ РНК

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[1] В настоящей заявке испрашивается приоритет предварительной заявки на патент США 63/046976, поданной 1 июля 2020, содержание которой включено во всей полноте посредством ссылки.

ОПИСАНИЕ ТЕКСТОВОГО ФАЙЛА, ПОДАННОГО В ЭЛЕКТРОННОМ ВИДЕ

[2] Содержание текстового файла, поданного в электронном виде, включено во всей полноте посредством ссылки: копия перечня последовательностей в машиночитаемом формате (имя файла: ELVT_011_01WO_SeqList_ST25.txt, файл записан 1 июля 2021, размер файла ~89 килобайт).

ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[3] Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (iPSC) изменили поиск лекарств и здравоохранение. iPSC получают путем перепрограммирования соматических клеток обратно в эмбрионально-подобное плюрипотентное состояние, что позволяет разрабатывать различные типы клеток человека, необходимые для исследовательских и/или терапевтических целей.

[4] iPSC обычно получают путем внедрения в соматическую клетку одного или более факторов перепрограммирования (например, Oct3/4, Klf4, Sox2, Nanog, Lin28, c-Myc и/или L-Myc). Хотя факторы перепрограммирования можно внедрять в клетку с использованием стандартных подходов, эти подходы имеют различные недостатки. Например, системы самореплицирующихся РНК используют РНК репликоны, которые способны самореплицироваться. Природа таких реплицирующихся векторов создает риск интеграции в геном. Перепрограммирование на основе мРНК (матричная РНК) является трудоемким и включает множество трансфекций мРНК вследствие быстрого кругооборота молекул мРНК. Экзогенная мРНК также является иммуногенной, что требует применения факторов ускользания от иммунного надзора (например, ингибиторов путей интерферонов) и/или модифицированных нуклеотидов для

минимизации токсичности.

[5] Таким образом, в области техники существует потребность в улучшенных композициях и способах получения iPSC.

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[6] Предложены кольцевые РНК (circRNA), кодирующие один или более факторов перепрограммирования (например, факторов транскрипции). Факторами перепрограммирования могут быть, например, Oct3/4, Klf4, Sox2, Nanog, Lin28, c-Мус и/или L-Мус. В некоторых воплощениях кольцевые РНК можно применять для получения iPSC без интеграции. Например, iPSC можно применять для создания специализированных клеточных терапий или для получения типов клеток, связанных с заболеванием, для продвижения исследований, связанных с поиском лекарств.

[7] В некоторых воплощениях рекомбинантная кольцевая РНК содержит последовательность, кодирующую белок, которая кодирует по меньшей мере один фактор перепрограммирования, где указанный по меньшей мере один фактор перепрограммирования представляет собой Oct3/4, Klf4, Sox2, Nanog, Lin28, c-Мус или L-Мус или их фрагмент или вариант.

[8] В некоторых воплощениях комплекс содержит рекомбинантную кольцевую РНК, описанную в данном документе, и липидную наночастицу (LNP).

[9] В некоторых воплощениях вектор содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую рекомбинантную кольцевую РНК, описанную в данном документе.

[10] В некоторых воплощениях композиция содержит рекомбинантную кольцевую РНК, комплекс или вектор, описанные в данном документе.

[11] В некоторых воплощениях композиция содержит две или более рекомбинантных кольцевых РНК, где рекомбинантные кольцевые РНК кодируют факторы перепрограммирования, выбранные из приведенных в Таблице 1, 2 или 3.

[12] В некоторых воплощениях композиция содержит две или более рекомбинантных кольцевых РНК, где композиция содержит комбинацию рекомбинантных кольцевых РНК, кодирующих факторы перепрограммирования, выбранные из: (1) Oct3/4, Klf4, Sox2 и c-Мус; (2) Oct3/4, Klf4, Sox2 и L-Мус; (3) Oct3/4, Klf4 и Sox2; (4) Oct3/4, Klf4, Sox2, Nanog, Lin28 и c-Мус; или (4) Oct3/4, Klf4, Sox2, Nanog, Lin28 и L-Мус.

[13] В некоторых воплощениях клетка содержит рекомбинантную кольцевую РНК, комплекс, вектор или композицию, описанные в данном документе.

[14] В некоторых воплощениях способ экспрессирования белка в клетке включает приведение клетки в контакт с кольцевой РНК, комплексом, вектором или композицией, описанными в данном документе, и поддержание клетки в условиях, при которых экспрессируется белок.

[15] В некоторых воплощениях способ получения индуцированной плюрипотентной стволовой клетки (iPSC) включает приведение соматической клетки в контакт с по меньшей мере одной рекомбинантной кольцевой РНК, комплексом, вектором и/или композицией, описанными в данном документе, и поддержание клетки в условиях, при которых получают перепрограммированную iPSC.

[16] В некоторых воплощениях способ получения индуцированной плюрипотентной стволовой клетки (iPSC) включает приведение CD34⁺ клетки в суспензии в контакт с по меньшей мере одной рекомбинантной кольцевой РНК, комплексом, вектором и/или композицией, описанными в данном документе, и поддержание клетки в условиях, при которых получают перепрограммированную iPSC.

[17] В некоторых воплощениях способ перепрограммирования клетки включает приведение клетки в контакт с одним или более из: (1) кольцевой РНК, кодирующей фактор перепрограммирования; (2) кольцевой РНК, не кодирующей какой-либо белок или миРНК (малая интерферирующая РНК); (3) кольцевой или линейной РНК, кодирующей миРНК; и/или (4) кольцевой или линейной РНК, кодирующей вирусный белок.

[18] В некоторых воплощениях способ перепрограммирования клетки включает приведение клетки в контакт с каждым из: (1) кольцевой РНК, кодирующей фактор перепрограммирования; (2) кольцевой РНК, не кодирующей какой-либо белок или миРНК; (3) кольцевой или линейной РНК, кодирующей миРНК; и/или (4) кольцевой или линейной РНК, кодирующей вирусный белок.

[19] В некоторых воплощениях способ перепрограммирования клетки включает приведение клетки в контакт с каждым из: (1) кольцевой РНК, кодирующей фактор перепрограммирования; (2) кольцевой РНК, кодирующей миРНК; и (3) кольцевой или линейной РНК, кодирующей вирусный белок.

[20] В некоторых воплощениях способ перепрограммирования клетки включает приведение клетки в контакт с каждым из: (1) кольцевой РНК, кодирующей фактор перепрограммирования; и (2) кольцевой РНК, кодирующей миРНК.

[21] В некоторых воплощениях способ увеличения длительности экспрессии белка в

клетке включает приведение клетки в контакт с кольцевой РНК, комплексом, вектором или композицией, описанными в данном документе, и поддержание клетки в условиях, при которых экспрессируется белок, где длительность экспрессии белка увеличивается по сравнению с трансфекцией клетки линейной РНК, кодирующей тот же самый белок.

[22] В некоторых воплощениях способ улучшения эффективности перепрограммирования клетки включает приведение клетки в контакт с кольцевой РНК, комплексом, вектором или композицией, описанными в данном документе, и поддержание клетки в условиях, при которых экспрессируется белок, где эффективность перепрограммирования клетки увеличивается по сравнению со способом перепрограммирования клетки, в котором применяют линейную РНК.

[23] В некоторых воплощениях способ увеличения числа колоний перепрограммированной клетки, образующихся после перепрограммирования, включает приведение клетки в контакт с кольцевой РНК, комплексом, вектором или композицией, описанными в данном документе, и поддержание клетки в условиях, при которых экспрессируется белок, где число колоний перепрограммированной клетки, образующихся после перепрограммирования, увеличивается по сравнению со способом перепрограммирования клетки, в котором применяют линейную РНК.

[24] В некоторых воплощениях способ перепрограммирования клеток в суспензии включает приведение клетки в суспензии в контакт с кольцевой РНК, комплексом, вектором или композицией, описанными в данном документе, и поддержание клетки в условиях, при которых экспрессируется белок.

[25] В некоторых воплощениях способ улучшения морфологического созревания перепрограммированных колоний включает приведение клетки в суспензии в контакт с кольцевой РНК, комплексом, вектором или композицией, описанными в данном документе, и поддержание клетки в условиях, при которых экспрессируется белок, где морфологическое созревание улучшается по сравнению со способом перепрограммирования клетки, в котором применяют линейную РНК.

[26] В некоторых воплощениях способ перепрограммирования клетки, в котором достигается меньшая клеточная гибель по сравнению со способом, в котором применяют линейную РНК, включает приведение клетки в контакт с кольцевой РНК, комплексом, вектором или композицией, описанными в данном документе, и поддержание клетки в условиях, при которых экспрессируется белок.

[27] В некоторых воплощениях способ сокращения времени от

перепрограммирования до сбора (отбора вручную колоний iPSC посредством механической диссоциации) включает приведение клетки в контакт с кольцевой РНК, комплексом, вектором или композицией, описанными в данном документе, и поддержание клетки в условиях, при которых экспрессируется белок, где время сокращается по сравнению со способом перепрограммирования клетки, в котором применяют линейную РНК.

[28] В некоторых воплощениях способ сокращения числа трансфекций для индуцирования эффекта перепрограммирования клетки по сравнению со способом перепрограммирования клетки, в котором применяют линейную РНК, включает приведение клетки в контакт с кольцевой РНК, комплексом, вектором или композицией, описанными в данном документе, и поддержание клетки в условиях, при которых экспрессируется белок.

[29] В некоторых воплощениях суспензионная культура содержит одну или более клеток, экспрессирующих CD34, где клетки, экспрессирующие CD34, содержат одну или более экзогенных *circRNA*, кодирующих фактор перепрограммирования.

[30] Также предложены кольцевые РНК, кодирующие один или более факторов трансдифференцировки. Факторы трансдифференцировки могут, например, представлять собой один или более факторов, перечисленных в Таблице 6. Кольцевые РНК, кодирующие один или более факторов трансдифференцировки, можно применять для превращения соматической клетки первого типа в соматическую клетку второго типа.

[31] В некоторых воплощениях способ непосредственного превращения клетки первого типа в клетку второго типа включает приведение клетки в контакт с рекомбинантной кольцевой РНК, комплексом, вектором и/или композицией, описанными в данном документе, и поддержание клетки в условиях, при которых клетка превращается в клетку второго типа.

[32] В некоторых воплощениях способ перепрограммирования и редактирования генома клетки включает приведение клетки в контакт с: (1) рекомбинантной кольцевой РНК, содержащей последовательность, кодирующую белок, где последовательность, кодирующая белок, кодирует по меньшей мере один фактор перепрограммирования, и (2) ферментом, способным редактировать ДНК или РНК клетки, или кодирующей его нуклеиновой кислотой.

[33] В некоторых воплощениях способ трансдифференцировки и редактирования

генома клетки включает приведение клетки в контакт с: (1) рекомбинантной кольцевой РНК, содержащей последовательность, кодирующую белок, где последовательность, кодирующая белок, кодирует по меньшей мере один фактор трансдифференцировки, и (2) ферментом, способным редактировать ДНК или РНК клетки, или кодирующей его нуклеиновой кислотой.

[34] В некоторых воплощениях композиция содержит соматическую клетку, содержащую одну или более экзогенных кольцевых РНК, кодирующих фактор перепрограммирования.

[35] В некоторых воплощениях композиция содержит трансдифференцированную клетку, которая содержит одну или более экзогенных кольцевых РНК, кодирующих фактор трансдифференцировки.

[36] В некоторых воплощениях способ индуцирования мезенхимально-эпителиального перехода (MET) соматической клетки в iPSC включает приведение соматической клетки в контакт с одной или более кольцевыми РНК, кодирующими фактор перепрограммирования.

[37] В некоторых воплощениях способ трансдифференцировки клетки включает приведение клетки в контакт с рекомбинантной кольцевой РНК, содержащей последовательность, кодирующую белок, где последовательность, кодирующая белок, кодирует по меньшей мере один фактор трансдифференцировки.

[38] В некоторых воплощениях набор содержит рекомбинантную кольцевую РНК, комплекс, вектор или композицию, описанные в данном документе.

[39] В некоторых воплощениях набор содержит: (1) сосуд, содержащий кольцевую РНК, кодирующую OCT4, и буфер; (2) сосуд, содержащий кольцевую РНК, кодирующую SOX2, и буфер; (3) сосуд, содержащий *circRNA*, кодирующую KLF4, и буфер; и (4) упаковку и инструкции к нему.

[40] Также предложена клетка, полученная одним или более чем одним способом, раскрытым в данном документе.

[41] Также предложена iPSC, полученная одним или более чем одним способом, раскрытым в данном документе.

[42] Также предложена трансдифференцированная клетка, имеющая происхождение от iPSC, полученной одним или более чем одним способом, раскрытым в данном документе.

[43] Другие задачи, преимущества и признаки настоящего изобретения станут

очевидны, исходя из следующего ниже описания.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[44] Файл патента или заявки содержит по меньшей мере один графический материал, выполненный в цвете. Копии данного патента или опубликованной заявки на патент с цветными графическими материалами будут предоставлены Ведомством по требованию при уплате соответствующей пошлины.

[45] На **ФИГ. 1** представлено схематическое изображение приведенного в качестве примера протокола циркуляризации линейной РНК, полученной посредством химического синтеза или транскрипции *in vitro* (IVT) для создания кольцевых РНК. Вначале получают линейную РНК. Затем 5'-конец линейной РНК фосфорилируют путем амплификации с использованием праймеров, специфических к фланкирующей последовательности. Затем 5'- и 3'-концы лигируют с использованием T4 РНК-лигазы. Кольцевую РНК очищают или линейные побочные продукты подвергают ферментативной денатурации. Затем кольцевую РНК можно приводить в контакт с клетками (например, трансфицировать) и/или конъюгировать с липидной наночастицей.

[46] На **ФИГ. 2A-2G** представлено схематическое изображение приведенных в качестве примера способов циркуляризации линейной РНК, включая ферментативное лигирование 5' фосфата с 3'-ОН концом (**Фиг. 2A**), химическое лигирование фосфата с ОН-концом (5'- или 3'-конец может быть фосфорилирован) (**Фиг. 2B**); химическое лигирование 3'-тиофосфата с тозиллированным 5'-концом (**Фиг. 2C**); химическое лигирование 3'-тиофосфата с иодированным 5'-концом (**Фиг. 2D**); химическое лигирование 3'-альдегида с 50 оксоамином (циркуляризация оксима) (**Фиг. 2E**); химическое лигирование 5'- или 3'-азиды с 3'- или 5'- алкином (клик-циркуляризация) (**Фиг. 2F**); циркуляризация путем хелатирования металла ($M=Zn^{2+}$ или Fe^{2+} , (= терпиридин)) (**Фиг. 2G**).

[47] На **ФИГ. 3** представлена схема приведенного в качестве иллюстрации способа циркуляризации линейной РНК. В показанной интрон-экзонной конструкции каталитический интрон группы I гена Td фага T4 разделяют надвое таким образом, чтобы сохранить структурные элементы, играющие ключевую роль для фолдинга рибозима. Затем 2 фрагмент экзона (E2) лигируют в направлении против хода транскрипции с 1 фрагментом экзона (E1), и между экзон-экзонным сочленением встраивают кодирующую область длиной приблизительно 1,1 т.п.н. (тысяч пар нуклеотидов). В ходе сплайсинга 3' гидроксильная группа нуклеотида гуанозин участвует в реакции

трансэтерификации с 5' сайтом сплайсинга, в результате чего происходит циркуляризация находящейся между ними области и вырезание 3' интрона.

[48] На **ФИГ. 4** проиллюстрирован дизайн конструкции *circRNA*, основанный на перестановке интрон-экзон (PIE), и получение *circRNA*.

[49] На **ФИГ. 5А - Фиг. 5В** проиллюстрирована кольцевая РНК, подвергнутая никированию. На **ФИГ. 5А** приведена иллюстрация кольцевой РНК, а на **Фиг. 5В** показаны ожидаемые никированные РНК, полученные в результате никирования по каждому из трех сайтов никирования, обозначенных белыми треугольниками в «А». Продукты распада, показанные в В, являются лишь иллюстрацией, поскольку никирование может произойти в любом месте по длине *circRNA*.

[50] На **ФИГ. 6** показан электрофорез в агарозном геле продуктов транскрипции *in vitro* с ДНК-матрицы, соответствующей либо полноразмерному (WT), либо укороченному (ΔSS) РНК-предшественнику с перестановкой интрон-экзон (PIE).

[51] На **ФИГ. 7** показаны результаты специфичной к границе сплайсинга RT-PCR для подтверждения того, что полоса *circRNA* содержит циркуляризованную РНК.

[52] На **ФИГ. 8А** показано распределение видов РНК, остающихся после каждого указанного этапа, для каждого из шести факторов перепрограммирования. На **ФИГ. 8В** показаны результаты расщепления препаратов *circRNA* РНКазой R.

[53] На **ФИГ. 9А - Фиг. 9F** показаны результаты перепрограммирования фибробластов с применением линейной и кольцевой РНК. На **ФИГ. 9А** показана хронология перепрограммирования HDF с применением линейной и кольцевой РНК. На **ФИГ. 9В** показаны уровни экспрессии ядерного белка GFP (nGFP), кодируемого линейной или циркуляризованной РНК, добавленной в коктейли для перепрограммирования (линейная РНК Stemgent или линейная РНК TriLink или *circRNA*). График отображает нормализованную экспрессию nGFP, выраженную в процентах от пиковой экспрессии. На **ФИГ. 9С** представлены репрезентативные изображения, демонстрирующие морфологический переход от фибробластов в iPSC в ходе перепрограммирования РНК. На **ФИГ. 9D** показаны изображения лунок целиком с колониями перепрограммированных iPSC, экспрессирующих Tra-1-81, маркер плюрипотентности, на 18 сутки. На **ФИГ. 9Е** представлены репрезентативные изображения iPSC, перепрограммированных с применением *circRNA*. На **ФИГ. 9F** показана конфлюэнтность колоний iPSC, как количественная оценка перепрограммирования iPSC, показанного на **Фиг. 9D**.

[54] На **ФИГ. 10А - Фиг. 10С** представлены данные, иллюстрирующие физические характеристики iPSC, перепрограммированных согласно способам, описанным в данном документе. На **ФИГ. 10А** представлены репрезентативные изображения iPSC, полученных с применением набора для перепрограммирования мРНК Stemgent (вверху), линейной мРНК, синтезированной в Trilink (в середине) и circRNA (внизу), на культурах между 3 и 5 пассажами. На **ФИГ. 10В** показано время удвоения популяции (PDT) iPSC, полученных путем перепрограммирования РНК, включая 5 клонов, полученных с применением circRNA, 2 клонов, полученных с применением набора Stemgent, и 3 клонов, полученных с применением линейной мРНК Trilink. На **ФИГ. 10С** показана экспрессия SSEA в клонах iPSC, полученных при перепрограммировании РНК, по результатам проточной цитометрии. S – полученные с набором Stemgent mRNA; L – полученные с линейной мРНК Trilink; C – полученные с circRNA.

[55] На **ФИГ. 11** показана схема трансфекции в экспериментах с перепрограммированием iPSC из Примера 6.

[56] На **ФИГ. 12А - Фиг. 12D** показано изменение морфологии в ходе перепрограммирования. На **ФИГ. 12А** – группа 4 Тх +ЕКВ. На **ФИГ. 12В** – группа 4 Тх -ЕКВ. На **ФИГ. 12С** – группа 2 Тх. На **ФИГ. 12D** – группа 1 Тх. Тх = трансфекция.

[57] На **ФИГ. 13** показаны изображения культур клеток на 6 сутки для оценки клеточной токсичности в результате указанных условий трансфекции.

[58] На **ФИГ. 14А** показано совместное окрашивание на Tra-1-81 и Oct4 лунок с культурами клеток для оценки перепрограммирования iPSC. На **ФИГ. 14В** показана количественная оценка перепрограммирования iPSC, показанного на **Фиг. 14А**.

[59] На **ФИГ. 15А - Фиг. 15D** проиллюстрированы результаты дифференцировки фибробластов в мышечные клетки с применением линейной (TriLink) или circRNA, кодирующих MyoD. На **ФИГ. 15А** показана экспрессия MyoD в ложнотрансфицированных, трансфицированных circRNA или линейной мРНК клетках. На **ФИГ. 15В** показано образование мышечных трубочек в ложнотрансфицированных, трансфицированных circRNA или линейной мРНК клетках. На **ФИГ. 15С** показана экспрессия специфических мышечных маркеров (миогенина, десмина и тяжелой цепи миозина (МНС)) в фибробластах, трансфицированных circRNA, кодирующей MyoD. На **ФИГ. 15D** показана экспрессия миогенина, десмина и тяжелой цепи миозина (МНС) в фибробластах, трансфицированных линейной мРНК, кодирующей MyoD.

[60] На **ФИГ. 16А-16В** проиллюстрировано подтверждение экспрессии белка с гена,

представляющего интерес, кодируемого линейной мРНК (TriLink) или circRNA. Изображения получены с объективом с 20X увеличением. Масштабная метка равна 100 мкм.

[61] На **ФИГ. 17A-17C** проиллюстрирована количественная оценка миогенной трансформации и образования мышечных трубочек в фибробластах кожи человека при применении линейной мРНК либо circRNA. На **ФИГ. 17A** показан индекс слияния, представляющий собой отношение ядер (DAPI-положительных) в десмин-положительных мышечных трубочках к общему числу ядер в популяции. На **ФИГ. 17B** показан процент совмещения MYOG-положительных ядер и десмин-положительных мышечных трубочек. На **ФИГ. 17C** показан процент совмещения специфического мышечного маркера тяжелой цепи миозина (МНС) и десмин-положительных мышечных трубочек.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[62] Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют обычное значение, известное специалистам в области техники, к которой относится данное изобретение. Терминология, используемая в подробном описании изобретения, предназначена только для описания конкретных воплощений и не предназначена для ограничения.

[63] Если из контекста не следует иное, недвусмысленно предполагается, что различные признаки, описанные в данном документе, можно применять в любой комбинации. Более того, в некоторых воплощениях любой признак или комбинация признаков, приведенных в данном описании, может быть исключен или пропущен. Например, в качестве иллюстрации, если в описании указано, что конкретная аминокислота может представлять собой A, G, I, L и/или V, это выражение также означает, что аминокислота может быть любой подгруппой указанных аминокислот, например, A, G, I или L; A, G, I или V; A или G; только L; и так далее, как если бы любая указанная комбинация была упомянута непосредственно. Кроме того, такие выражения также означают, что возможно не включение одной или более конкретных аминокислот. Например, в некоторых воплощениях аминокислота не является A, G или I; не является A; не является G или V; и так далее, как если бы возможность такого не включения каждой из них была бы сформулирована явным образом.

[64] Все публикации, заявки на патенты, патенты, регистрационные номера в базе GenBank и других, а также другие ссылки, приведенные в данном документе, включены

во всей полноте посредством ссылки для всех целей.

Общие методы

[65] При осуществлении настоящего изобретения, если не указано иное, используют стандартные методики культивирования клеток, молекулярной биологии (включая рекомбинантные методы), микробиологии, клеточной биологии, биохимии и иммунологии, известные специалистам в области техники. Такие методики подробно описаны в литературе, например в документах *Molecular Cloning: Laboratory Manual*, третье изд. (Sambrook et al., 2001) Cold Spring Harbor Press; *Oligonucleotide Synthesis* (P. Herdewijn, ed., 2004); *Animal Cell Culture* (R. I. Freshney), ed., 1987); *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc.); *Handbook of Experimental Immunology* (D. M. Weir & C. C. Blackwell, eds.); *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells* (J. M. Miller & M. P. Calos, eds., 1987); *Current Protocols in Molecular Biology* (F. M. Ausubel et al., eds., 1987); *PCR: The Polymerase Chain Reaction*, (Mullis et al., eds., 1994); *Current Protocols in Immunology* (J. E. Coligan et al., eds., 1991); *Short Protocols in Molecular Biology* (Wiley and Sons, 1999); *Manual of Clinical Laboratory Immunology* (B. Detrick, N. R. Rose, and J. D. Folds eds., 2006); *Immunochemical Protocols* (J. Pound, ed., 2003); *Lab Manual in Biochemistry: Immunology and Biotechnology* (A. Nigam and A. Ayyagari, eds. 2007); *Immunology Methods Manual: The Comprehensive Sourcebook of Techniques* (Ivan Lefkovits, ed., 1996); *Using Antibodies: A Laboratory Manual* (E. Harlow and D. Lane, eds., 1988) и других.

Определения

[66] В описании настоящего изобретения и прилагаемой формуле изобретения используются следующие термины.

[67] В данном документе все термины в единственном числе также охватывают термины во множественном числе, за исключением случаев, когда из контекста явным образом не следует иное.

[68] Термин «приблизительно», используемый в данном документе применительно к измеримому значению, такому как значение длины полинуклеотида или полипептида, дозы, времени, температуры и тому подобного, охватывает отклонения $\pm 20\%$, $\pm 10\%$, $\pm 5\%$, $\pm 1\%$, $\pm 0,5\%$ или даже $\pm 0,1\%$ от указанного значения.

[69] Используемый здесь термин «и/или» относится и охватывает все возможные комбинации одного или нескольких связанных перечисленных элементов, а также отсутствие комбинаций в случае интерпретации в качестве альтернативы («или»).

[70] В данном описании «кольцевая РНК» или «circRNA» относится к типу одноцепочечной РНК, которая, в отличие от более известной линейной РНК, образует ковалентно замкнутую непрерывающуюся петлю. В данном документе любой белок, название которого начинается с “circ”, относится к гену, кодируемому кольцевой РНК. РНК может быть циркуляризована в клетке посредством клеточных механизмов сплайсинга. Например, кольцевые РНК могут быть образованы, когда механизмы сплайсинга пре-мРНК осуществляют «обратный сплайсинг» для соединения сплайс-донора с расположенным в направлении против хода транскрипции сплайс-акцептором, с получением таким образом кольцевой РНК, которая имеет ковалентно сшитые концы. В альтернативном варианте, кольцевые РНК могут быть образованы *in vitro*, например посредством циркуляризации линейной РНК, образованной в результате транскрипции *in vitro* (IVT). Существует три общие стратегии циркуляризации РНК *in vitro*: химические способы с применением цианогенбромида или аналогичного конденсирующего средства, ферментативные способы с применением РНК- или ДНК-лигаз (например, T4 РНК-лигазы I или II) и рибозимные способы с применением самосплайсирующихся интронов. Рибозимный способ с применением перестановки каталитического интрона группы I применим для циркуляризации длинной РНК и требует только добавления GTP (гуанозинтрифосфат) и Mg^{2+} в качестве кофакторов. Стратегия сплайсинга с перестановкой интрон-экзон (PIE) состоит в слиянии частей экзонов, фланкированных последовательностями половин интронов. *In vitro* данные конструкции подвергаются реакциям двойной трансэтерификации, характерным для каталитических интронов группы I, но поскольку экзоны уже слиты, они вырезаются в виде ковалентно 5' - 3' соединенных циклов (**Фиг. 3**). Приведенный в качестве иллюстрации протокол циркуляризации линейной РНК приведен на **Фиг. 1**, а перечень приведенных в качестве примера стратегий циркуляризации линейной РНК представлен на **Фиг. 2A-2G**.

[71] Термины «линейная РНК» и «линейная мРНК» здесь используются взаимозаменяемо, как станет очевидно специалисту в области техники, исходя из контекста.

[72] В данном описании «плюрипотентный» относится к клетке, способной при различных условиях дифференцироваться в более чем один тип клеток и дифференцироваться в типы клеток, характерные для клеток всех трех зародышевых листков. В некоторых воплощениях плюрипотентность может проявляться экспрессией одного или более маркеров плюрипотентных стволовых клеток.

[73] В данном описании термины «индуцированные плюрипотентные стволовые клетки» и «iPSC» относятся к плюрипотентным клеткам, которые имеют происхождение от различных дифференцированных (то есть мультипотентных или неплюрипотентных) соматических клеток. iPSC по существу генетически идентичны своим соответствующим дифференцированным соматическим клеткам, из которых они имеют происхождение, и демонстрируют характеристики, схожие с клетками большей потентности, такими как эмбриональные стволовые (ES) клетки, в том числе способность к бесконечному самообновлению в культуре и способность дифференцироваться в другие типы клеток. В некоторых воплощениях iPSC демонстрируют морфологические свойства (то есть круглую форму, крупное ядро и скудную цитоплазму) и ростовые свойства (то есть время удвоения) схожие с ES клетками. В некоторых воплощениях iPSC экспрессируют маркеры, специфические для плюрипотентных клеток (например, Oct-4, SSEA-3, SSEA-4, Tra-1-60, Tra-1-81, но не SSEA-1).

[74] В данном описании «дифференцированная клетка» или «соматическая клетка» представляет собой любую клетку, которая в своей нативной форме не является плюрипотентной, как определено в данном документе. Термин «соматическая клетка» также охватывает клетки-предшественники, которые являются мультипотентными (например, могут продуцировать более одного типа клеток), но не плюрипотентными (например, могут продуцировать клетки всех трех зародышевых листков).

[75] Термин «перепрограммирование» в данном документе относится к процессу изменения состояния дифференцировки клетки, такой как соматическая клетка, мультипотентная клетка или клетка-предшественник. В некоторых воплощениях перепрограммирование клетки может включать превращение клетки из клетки первого типа в клетку второго типа. В некоторых воплощениях перепрограммирование может включать изменение фенотипа дифференцированной клетки в плюрипотентный фенотип. В некоторых воплощениях перепрограммирование может относиться к процессу «индуцированной дифференцировки» или «дифференцировки, направленной фактором транскрипции», когда iPSC превращается в дифференцированную клетку.

[76] В данном описании термин «фактор перепрограммирования» относится к любому фактору или комбинации факторов, которые способствуют перепрограммированию клетки. Фактор перепрограммирования может, например, быть фактором транскрипции. Приведенные в качестве иллюстрации факторы

перепрограммирования для получения iPSC из дифференцированных клеток включают Oct3/4, Klf4, Sox2, Nanog, Lin28, c-Мyc и L-Мyc. Приведенные в качестве иллюстрации факторы перепрограммирования и их комбинации для получения дифференцированных клеток представлены в Таблице 6.

[77] В данном описании «трансдифференцировка» относится к типу перепрограммирования клеток, когда соматические клетки одного типа непосредственно превращаются в соматические клетки второго типа. В некоторых воплощениях трансдифференцировка может относиться к «непосредственному перепрограммированию» или «непосредственному изменению судьбы клетки», где соматические клетки одного типа превращаются в соматические клетки второго типа без прохождения промежуточного плюрипотентного состояния или типа клеток-предшественников.

[78] В данном описании «участок внутренней посадки рибосомы» или «IRES» представляет собой элемент РНК, который позволяет инициировать трансляцию кэп-независимым образом. IRES может представлять собой, например, IRES вируса или IRES млекопитающего (например, IRES человека).

[79] «Нуклеотидтрифосфат», или «NTP» представляет собой молекулу, содержащую азотистое основание, связанное с 5-атомным сахаром (рибозой или дезоксирибозой), с тремя фосфатными группами, связанными с сахаром.

[80] В данном описании «модифицированный NTP» представляет собой NTP, который был химически модифицирован для придания благоприятных свойств нуклеиновой кислоте, содержащей NTP. Такие благоприятные свойства могут включать, например, пониженную иммуногенность, повышенную стабильность, химическую функциональность или модифицированную аффинность связывания.

[81] Термин «модифицированная РНК» (например, «модифицированная линейная РНК» или «модифицированная кольцевая РНК») используется для описания молекулы РНК, которая содержит один или более модифицированных NTP.

[82] Термин «вектор» относится к носителю нуклеиновой кислоты (то есть молекуле ДНК или РНК), которую можно применять для внедрения нуклеиновой кислоты в клетку. «Экспрессирующий вектор» представляет собой вектор, который содержит последовательность, кодирующую белок или РНК (например, кольцевую РНК), и необходимые регуляторные области, необходимые для экспрессии последовательности в клетке. В некоторых воплощениях последовательность, кодирующая белок или РНК,

функционально связана с другой последовательностью в векторе. Термин «функционально связана» означает, что регуляторные последовательности, необходимые для экспрессии последовательности, кодирующей белок или РНК, помещены в молекулу нуклеиновой кислоты в соответствующем положении относительно последовательности, обеспечивающей экспрессию белка или РНК.

[83] В данном описании термины «липидная наночастица» и «LNP» описывают частицы субмикронного диапазона на основе липидов. LNP могут обладать структурными характеристиками липосом и/или могут иметь альтернативные структуры не двухслойного типа. LNP могут быть конъюгированы с нуклеиновыми кислотами (например, молекулами ДНК или РНК) и применяются для доставки нуклеиновых кислот в клетки.

[84] Способы определения сходства или идентичности последовательностей между двумя или более нуклеиновокислотными последовательностями или аминокислотными последовательностями известны в области техники. Например, сходство или идентичность последовательностей можно устанавливать при помощи алгоритма поиска локальной идентичности последовательностей, предложенного Smith & Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2, 482 (1981), при помощи алгоритма выравнивания идентичных последовательностей, предложенного Needleman & Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48, 443 (1970), способом поиска сходства, предложенного Pearson & Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 2444 (1988), с помощью компьютеризированной реализации этих алгоритмов (GAP, BESTFIT, FASTA и TFASTA в пакете программного обеспечения Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Мэдисон, Висконсин), программы Best Fit для последовательностей, описанной Devereux et al. *Nucl. Acid Res.* 12, 387-395 (1984) или путем визуального анализа.

[85] Другим подходящим алгоритмом является алгоритм BLAST, описанный Altschul *et al.* *J. Mol. Biol.* 215, 403-410, (1990) и Karlin *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 5873-5787 (1993). Особенно удобной программой BLAST является программа WU-BLAST-2, которая была взята из Altschul *et al.* *Methods in Enzymology*, 266, 460-480 (1996); blast.wustl.edu/blast/README.html. WU-BLAST-2 использует несколько параметров поиска, которые возможно имеют значения по умолчанию. Параметры являются динамическими значениями и устанавливаются самой программой в зависимости от состава конкретной последовательности и состава конкретной базы данных, в которой осуществляют поиск последовательности, представляющей интерес;

однако значения можно корректировать для повышения чувствительности. Кроме того, еще одним удобным алгоритмом является «gapped BLAST», опубликованный Altschul *et al*, (1997) *Nucleic Acids Res.* 25, 3389-3402. Если не указано иное, в данном документе процент идентичности определяют при помощи алгоритма, представленного по адресу в интернете: blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi.

Рекомбинантные кольцевые РНК

[86] В данном документе предложены рекомбинантные кольцевые РНК. В частных воплощениях рекомбинантные кольцевые РНК кодируют факторы перепрограммирования, которые (в отдельности или в комбинации с другими факторами перепрограммирования) способны перепрограммировать дифференцированные клетки в iPSC, способны дифференцировать iPSC в дифференцированные клетки и/или способны дифференцировать один тип дифференцированных клеток в другой тип дифференцированных клеток. Например, в некоторых воплощениях кольцевые РНК кодируют факторы перепрограммирования для индуцированной дифференцировки или дифференцировки, направляемой факторами транскрипции.

[87] В некоторых воплощениях рекомбинантная кольцевая РНК содержит от приблизительно 200 нуклеотидов до приблизительно 5000 нуклеотидов. В некоторых воплощениях рекомбинантная кольцевая РНК содержит от приблизительно 200 до приблизительно 1000 нуклеотидов. В некоторых воплощениях рекомбинантная кольцевая РНК содержит от приблизительно 1000 до приблизительно 2500 нуклеотидов. В некоторых воплощениях кольцевая РНК содержит от приблизительно 2500 до приблизительно 5000 нуклеотидов. В некоторых воплощениях кольцевая РНК содержит более чем приблизительно 5000 нуклеотидов.

[88] В некоторых воплощениях рекомбинантная кольцевая РНК содержит одну или более открытых рамок считывания. В некоторых воплощениях рекомбинантная кольцевая РНК содержит одну или более кодирующих белок последовательностей. В некоторых воплощениях рекомбинантная кольцевая РНК не содержит открытую рамку считывания и/или кодирующую белок последовательность.

[89] В некоторых воплощениях рекомбинантная кольцевая РНК содержит последовательность, кодирующую фактор перепрограммирования. В некоторых воплощениях фактор перепрограммирования представляет собой человеческий или гуманизированный фактор перепрограммирования. В некоторых воплощениях фактор перепрограммирования представляет собой фактор транскрипции.

[90] В некоторых воплощениях фактор перепрограммирования может, например, представлять собой любой из факторов перепрограммирования, перечисленных в Таблице 1. В некоторых воплощениях фактор перепрограммирования представляет собой фрагмент или вариант любого из факторов перепрограммирования, перечисленных в Таблице 1. В некоторых воплощениях фактор перепрограммирования имеет последовательность, идентичную по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99% любому из факторов перепрограммирования, перечисленных в Таблице 1.

Таблица 1. Факторы перепрограммирования

Обозначение гена человека	Регистрационные номера мРНК в базе NCBI REFSEQ
POU2F1	NM_002697
POU2F2	NM_002698
POU2F3	NM_014352
POU3F1	NM_002699
POU3F2	NM_005604
POU3F3	NM_006236
POU3F4	NM_000307
POU5F1 (кодирует OCT4)	NM_002701, NM_203289
POU5F2	NM_153216
POU6F1	NM_002702, NR_026893
POU6F2	NM_007252
SOX1	NM_005986
SOX2	NM_003106
SOX3	NM_005634
SOX4	NM_003107
SOX5	NM_006940, NM_152989, NM_178010
SOX6	NM_017508, NM_033326, NM_001145811, NM_001145819
SOX7	NM_031439
SOX8	NM_014587
SOX9	NM_000346
SOX10	NM_006941

Обозначение гена человека	Регистрационные номера мРНК в базе NCBI REFSEQ
SOX11	NM_003108
SOX12	NM_006943
SOX13	NM_005686
SOX14	NM_004189
SOX15	NM_006942
SOX17	NM_022454
SOX18	NM_018419
SOX21	NM_007084
SOX30	NM_178424, NM_007017
KLF1	NM_006563
KLF2	NM_016270
KLF3	NM_016531
KLF4	NM_004235
KLF5	NM_001730
KLF6	NM_001300
KLF7	NM_003709
KLF8	NM_007250, NM_001159296
KLF9	NM_001206
KLF10	NM_005655, NM_001032282
KLF11	NM_003597
KLF12	NM_007249
KLF13	NM_015995
KLF14	NM_138693
KLF15	NM_014079
KLF16	NM_031918
KLF17	NM_173484
POU5F1P1	NR_002304
MYC	NM_002467
MYCL1	NM_005376, NM_001033081, NM_001033082
MYCN	NM_005378

Обозначение гена человека	Регистрационные номера мРНК в базе NCBI REFSEQ
NANOG	NM_024865
LIN28	NM_024674
THAP11	NM_020457
TERT	NM_198253, NM_198255
MYOD1	NM_002478
ASCL1	NM_004316
SPI1	NM_003120, NM_001080547
CEBPA	NM_004364
CEBPB	NM_005194
NEUROG3	NM_020999
PDX1	NM_000209
MAFA	NM_201589
ESRRB	NM_004452.2
NKX3-1	NM_006167
GATA3	NM_001002295

[91] В некоторых воплощениях фактор перепрограммирования представляет собой РНК, такую как микроРНК (miRNA). Показано, что miRNA, такие как кластер miRNA302(a-d) и miR367, улучшают эффективность перепрограммирования при применении в сочетании с другими факторами перепрограммирования (см. US 8791248; US 8852940; Poleganov et al., Human Gene Therapy. Nov 2015.751-766). Например, miRNA может быть любой из семейства miRNA302 (например, miR302d, miR302a, miR302c и miR302b) или miR367 или ее фрагментом или вариантом. В некоторых воплощениях фактор перепрограммирования представляет собой любой из следующих факторов перепрограммирования или их фрагмент или вариант: Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc, Lin28, Nanog, Sall4, Utf1, p53, p21, p16^{Ink4a}, GLIS1, L-Myc, TGF-бета, MDM2, REM2, циклин D1, большой Т-антиген SV40, DOT1L, CX43, MBD3, SIRT6, TCL1a, RARy, SNAIL, Lrh-1 или RCOR2.

[92] В некоторых воплощениях рекомбинантная кольцевая РНК содержит кодирующую белок последовательность, где кодирующая белок последовательность кодирует фактор перепрограммирования (например, фактор транскрипции). В

некоторых воплощениях фактор перепрограммирования представляет собой Oct3/4, Klf4, Sox2, Nanog, Lin28, c-Мус и/или L-Мус или их фрагмент или вариант. В некоторых воплощениях фактор перепрограммирования представляет собой Oct3/4, Klf4, Sox2, Nanog, Lin28 и/или c-Мус или их фрагмент или вариант. В некоторых воплощениях фактор перепрограммирования представляет собой человеческий или гуманизированный фактор перепрограммирования.

[93] В некоторых воплощениях рекомбинантная кольцевая РНК кодирует фактор перепрограммирования Oct3/4. В некоторых воплощениях кодируемый Oct3/4 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 или последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98% или 99%. В некоторых воплощениях кольцевая РНК кодирует фактор перепрограммирования Oct3/4 и содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 33 или состоит из нее. В некоторых воплощениях кольцевая РНК кодирует фактор перепрограммирования Oct3/4 и содержит нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична SEQ ID NO: 37.

[94] В некоторых воплощениях рекомбинантная кольцевая РНК кодирует фактор перепрограммирования Klf4. В некоторых воплощениях кодируемый Klf4 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 или 3 или последовательность, идентичную им по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98% или 99%. В некоторых воплощениях кольцевая РНК кодирует фактор перепрограммирования Klf4 и содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 37 или состоит из нее. В некоторых воплощениях кольцевая РНК кодирует фактор перепрограммирования Klf4 и содержит нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична SEQ ID NO: 37.

[95] В некоторых воплощениях рекомбинантная кольцевая РНК кодирует фактор перепрограммирования Sox2. В некоторых воплощениях кодируемый Sox2 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4 или последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98% или 99%. В некоторых воплощениях кольцевая РНК кодирует фактор перепрограммирования Sox2 и содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 34 или состоит из нее. В некоторых воплощениях кольцевая РНК кодирует фактор перепрограммирования Sox2 и содержит нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 90 или по меньшей мере на 95% 96%, 97%, 98% или 99% идентична

SEQ ID NO: 34.

[96] В некоторых воплощениях рекомбинантная кольцевая РНК кодирует фактор перепрограммирования Nanog. В некоторых воплощениях Nanog имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5 или 6 или последовательность, идентичную им по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98% или 99%. В некоторых воплощениях кольцевая РНК кодирует фактор перепрограммирования Nanog и содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 36 или состоит из нее. В некоторых воплощениях кольцевая РНК кодирует фактор перепрограммирования Nanog и содержит нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична SEQ ID NO: 36.

[97] В некоторых воплощениях рекомбинантная кольцевая РНК кодирует фактор перепрограммирования Lin28. В некоторых воплощениях Lin28 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7 или последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98% или 99%. В некоторых воплощениях кольцевая РНК кодирует фактор перепрограммирования Lin28 и содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 35 или состоит из нее. В некоторых воплощениях кольцевая РНК кодирует фактор перепрограммирования Lin28 и содержит нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 90% или по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична SEQ ID NO: 35.

[98] В некоторых воплощениях рекомбинантная кольцевая РНК кодирует фактор перепрограммирования с-Мус. В некоторых воплощениях с-Мус имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8 или 9 или последовательность, идентичную им по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98% или 99%. В некоторых воплощениях кольцевая РНК кодирует фактор перепрограммирования с-Мус и содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 38 или состоит из нее. В некоторых воплощениях кольцевая РНК кодирует фактор перепрограммирования с-Мус и содержит нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 90% или по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична SEQ ID NO: 38.

[99] В некоторых воплощениях рекомбинантная кольцевая РНК кодирует фактор перепрограммирования L-Мус. В некоторых воплощениях L-Мус имеет последовательность любой из SEQ ID NO: 10-12 или последовательность, идентичную им по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98% или 99%.

[100] В некоторых воплощениях кольцевая РНК кодирует фактор

перепрограммирования MyoD и содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 32 или состоит из нее. В некоторых воплощениях кольцевая РНК кодирует фактор перепрограммирования MyoD и содержит нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 90% или по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична SEQ ID NO: 32.

[101] В некоторых воплощениях рекомбинантная кольцевая РНК содержит две или более кодирующих белок нуклеотидных последовательностей. Например, рекомбинантная кольцевая РНК может содержать три, четыре, пять или шесть кодирующих белок последовательностей. В некоторых воплощениях по меньшей мере одна из кодирующих белок последовательностей кодирует фактор перепрограммирования (например, фактор транскрипции).

[102] В некоторых воплощениях рекомбинантная кольцевая РНК содержит две или более кодирующих белок последовательностей, где по меньшей мере одна из кодирующих белок последовательностей кодирует фактор перепрограммирования. В некоторых воплощениях рекомбинантная кольцевая РНК содержит две или более кодирующих белок последовательностей, где по меньшей мере одна из кодирующих белок последовательностей кодирует Oct3/4, Klf4, Sox2, Nanog, Lin28, c-Мyc или L-Мyc или их фрагменты или варианты. В некоторых воплощениях рекомбинантная кольцевая РНК содержит две или более кодирующих белок последовательностей, где каждая из кодирующих белок последовательностей независимо выбрана из Oct3/4, Klf4, Sox2, Nanog, Lin28, c-Мyc или L-Мyc или их фрагментов или вариантов.

[103] В некоторых воплощениях настоящего изобретения предложены композиции рекомбинантной кольцевой РНК, кодирующей факторы перепрограммирования. В некоторых воплощениях композиция дополнительно содержит буфер. Буфер может содержать, например, 1-10 mM цитрат натрия. В некоторых воплощениях pH буфера составляет приблизительно 2, приблизительно 2,5, приблизительно 3, приблизительно 3,5, приблизительно 4, приблизительно 4,5, приблизительно 5, приблизительно 5,5, приблизительно 6, приблизительно 6,5, приблизительно 7, приблизительно 7,5, приблизительно 8, приблизительно 8,5, приблизительно 9, приблизительно 9,5, приблизительно 10, приблизительно 10,5, приблизительно 11, приблизительно 11,5 или приблизительно 12. В некоторых воплощениях pH буфера составляет приблизительно 6,5.

[104] В некоторых воплощениях композиция содержит две или более

рекомбинантных кольцевых РНК, каждая из которых кодирует фактор перепрограммирования, выбранный из Oct3/4, Klf4, Sox2, Nanog, Lin28, c-Myc или L-Myc. В некоторых воплощениях композиция содержит две или более рекомбинантных кольцевых РНК, каждая из которых кодирует фактор перепрограммирования, выбранный из комбинаций, приведенных в Таблице 2.

Таблица 2. Комбинации факторов перепрограммирования

Обозначение комбинации	1 фактор перепрограммирования	2 фактор перепрограммирования
A1	Oct3/4	Klf4
A2	Oct3/4	Sox2
A3	Oct3/4	Nanog
A4	Oct3/4	Lin28
A5	Oct3/4	c-Myc
A6	Oct3/4	L-Myc
A7	Klf4	Sox2
A8	Klf4	Nanog
A9	Klf4	Lin28
A10	Klf4	c-Myc
A11	Klf4	L-Myc
A12	Sox2	Nanog
A13	Sox2	Lin28
A14	Sox2	c-Myc
A15	Sox2	L-Myc
A16	Nanog	Lin28
A17	Nanog	c-Myc
A18	Nanog	L-Myc
A19	Lin28	c-Myc
A20	Lin28	L-Myc
A21	c-Myc	L-Myc

[105] В воплощениях, где рекомбинантная кольцевая РНК содержит более одной кодирующей белок нуклеиновокислотной последовательности, каждая последовательность может быть отделена последовательностью, кодирующей саморасщепляющийся пептид, такой как пептид 2A. Приведенные в качестве примера пептиды 2A включают EGRGSLTCDGVEENPGP (SEQ ID NO: 17), ATNFSLLKQAGDVEENPGP (SEQ ID NO: 18), QCTNYALLKLAGDVESNPGP (SEQ ID NO: 19) и VKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP (SEQ ID NO: 20), без ограничения ими. В некоторых воплощениях каждая кодирующая белок последовательность может быть отделена посредством IRES.

[106] В некоторых воплощениях рекомбинантная кольцевая РНК содержит кодирующую белок последовательность и вторую последовательность. В некоторых воплощениях кодирующая белок последовательность кодирует Oct3/4, Klf4, Sox2, Nanog, Lin28, c-Мyc или L-Мyc или их фрагменты или варианты. В некоторых воплощениях вторая последовательность представляет собой последовательность из одной или более из circBIRC6, circCORO1C или circMAN1A2. circBIRC6, circCORO1C и circMAN1A2 представляют собой эндогенно экспрессируемые circRNA, и показано, что ими обогащены человеческие ESC (эмбриональные стволовые клетки) и, предположительно, они действуют как «miR губка». Таким образом, они могут играть регуляторную роль, способствуя плюрипотентности путем противодействия некоторым miRNA (например, miR34a и/или miR145), которые, как известно, подавляют экспрессию ассоциированных с плюрипотентностью факторов транскрипции NANOG, SOX2 и OCT4 (Yu *et al.* Nat Commun 8, 1149 (2017)).

[107] У кольцевой РНК отсутствует 5' 7-метилгуанозиновая кэпирующая структура, необходимая для эффективной трансляции линейных мРНК. Таким образом, для трансляции кольцевых РНК может использоваться альтернативный механизм рекрутирования рибосомы. Например, может использоваться участок внутренней посадки рибосомы (IRES), который непосредственно связывается с факторами инициации или самой рибосомой. Соответственно, в некоторых воплощениях рекомбинантная кольцевая РНК содержит участок внутренней посадки рибосомы (IRES). В некоторых воплощениях IRES задействует эукариотическую рибосому. В некоторых воплощениях IRES функционально связан с кодирующей белок нуклеиновокислотной последовательностью.

[108] Примеры последовательностей IRES включают последовательности, имеющие происхождение из различных видов вирусов, например из лидерных последовательностей UTR (нетранслируемой области) пикорнавируса (такого как вирус энцефаломиокардита (EMCV)), лидерной последовательности вируса полиомиелита, лидерной последовательности вируса гепатита А, IRES вируса гепатита С, IRES риновируса человека 2 типа, элемента IRES вируса ящура, IRES вируса giardavirus и тому подобных. Могут также применяться различные невирусные IRES, включая последовательности IRES дрожжей, а также IRES рецептора 1 типа ангиотензина II, IRES фактора роста фибробластов, IRES фактора роста сосудистого эндотелия и IRES инсулиноподобного фактора роста 2, без ограничения ими. Дополнительные

последовательности IRES, подходящие для применения в рекомбинантных кольцевых РНК, описанных в данном документе, включают описанные в базе данных, доступной по адресу <http://iresite.org/>.

[109] В некоторых воплощениях кольцевая РНК содержит интронные элементы, фланкирующие кодирующую белок последовательность. Интронные элементы могут быть подвергнуты обратному сплайсингу клеточным аппаратом сплайсинга с получением кольцевой РНК, которая ковалентно замкнута. Соответственно, в некоторых воплощениях кольцевая РНК содержит первый интронный элемент, расположенный в 5'-направлении относительно кодирующей белок последовательности, и второй интронный элемент, расположенный в 3'-направлении относительно кодирующей белок последовательности.

[110] В некоторых воплощениях кольцевая РНК образуется в результате циркуляризации линейной РНК. В некоторых воплощениях линейная РНК может быть самоциркуляризующейся, например, если она содержит самосплайсирующиеся интроны. Поскольку кольцевые РНК не имеют 5'- или 3'-концов, они могут быть устойчивы к опосредованному экзонуклеазами разрушению и могут быть более стабильными, чем большинство линейных РНК в клетках.

[111] В некоторых воплощениях интронные элементы выбраны из любых известных интронных элементов, в любой комбинации и в любых количествах и/или соотношениях. Примеры интронных элементов включают описанные в базе данных кольцевых РНК circBase (Glazar et al. RNA 20:1666-1670 (2014); и www.circbase.org) и Rybak-Wolf et al. Mol. Cell 58(5):870-885 (2015), каждый из которых включен во всей полноте посредством ссылки. В некоторых воплощениях интронный элемент представляет собой интрон млекопитающего или его фрагмент. В некоторых воплощениях интронный элемент представляет собой интронный элемент не от млекопитающего (например, самосплайсирующийся интрон группы I, самосплайсирующийся интрон группы II, сплайсосомный интрон или интрон тРНК (транспортная РНК)) или его фрагмент.

[112] В некоторых воплощениях кольцевая РНК содержит один или более дополнительных элементов, которые улучшают стабильность и/или усиливают трансляцию кодирующей белок последовательности с кольцевой РНК. Например, в некоторых воплощениях кольцевая РНК может содержать последовательность Kozak. Один из примеров консенсусной последовательности Kozak представляет собой: RCC(AUG)G (SEQ ID NO: 21), со стартовым кодоном в скобках и «R» в положении -3

представляющим собой пурин (А или G). Другим примером консенсусной последовательности Kozak является RXY(AUG) (SEQ ID NO: 22), где R представляет собой пурин (А или G), Y представляет собой C или G, а X представляет собой любое основание.

[113] В некоторых воплощениях кольцевая РНК содержит первый интронный элемент, кодирующую белок последовательность и второй интронный элемент. В некоторых воплощениях кольцевая РНК содержит IRES и кодирующую белок последовательность. В некоторых воплощениях кольцевая РНК содержит первую интронную последовательность, IRES, кодирующую белок последовательность и вторую интронную последовательность.

[114] В некоторых воплощениях кольцевая РНК содержит последовательность, кодирующую фактор перепрограммирования (например, фактор транскрипции). В некоторых воплощениях кольцевая РНК содержит первый интронный элемент, последовательность, кодирующую фактор перепрограммирования, и второй интронный элемент.

[115] В некоторых воплощениях кольцевая РНК содержит IRES и последовательность, кодирующую фактор перепрограммирования. В некоторых воплощениях кольцевая РНК содержит первую интронную последовательность, IRES, последовательность, кодирующую фактор перепрограммирования, и вторую интронную последовательность. В некоторых воплощениях кольцевая РНК содержит IRES и последовательность, кодирующую фактор перепрограммирования. В некоторых воплощениях кольцевая РНК содержит первый интронный элемент, IRES, последовательность, кодирующую фактор перепрограммирования, и второй интронный элемент. Примеры схем расположения элементов в кольцевых РНК приведены на Фиг. 4. См. также US 2020/0080106, содержание которого включено в данное описание посредством ссылки.

[116] В некоторых воплощениях кольцевая РНК содержит последовательность, кодирующую Oct3/4, Klf4, Sox2, Nanog, Lin28, c-Мyc или L-Мyc. В некоторых воплощениях кольцевая РНК содержит первый интронный элемент, последовательность, кодирующую Oct3/4, Klf4, Sox2, Nanog, Lin28, c-Мyc или L-Мyc, и второй интронный элемент.

[117] В некоторых воплощениях кольцевая РНК содержит IRES и последовательность, кодирующую Oct3/4, Klf4, Sox2, Nanog, Lin28, c-Мyc или L-Мyc. В

некоторых воплощениях кольцевая РНК содержит первую интронную последовательность, IRES, последовательность, кодирующую Oct3/4, Klf4, Sox2, Nanog, Lin28, c-Myc или L-Myc, и вторую интронную последовательность. В некоторых воплощениях кольцевая РНК содержит IRES и последовательность, кодирующую Oct3/4, Klf4, Sox2, Nanog, Lin28, c-Myc или L-Myc. В некоторых воплощениях кольцевая РНК содержит первый интронный элемент, IRES, последовательность, кодирующую Oct3/4, Klf4, Sox2, Nanog, Lin28, c-Myc или L-Myc, и второй интронный элемент.

[118] Кольцевые РНК могут также содержать модифицированные основания и/или NTP. В некоторых воплощениях рекомбинантные кольцевые РНК содержат модифицированные NTP. В некоторых воплощениях рекомбинантные кольцевые РНК представляют собой модифицированные кольцевые РНК.

[119] Модифицированные основания включают синтетические и природные основания, такие как 5-метилцитозин (5-me-C), 5-гидроксиметилцитозин, ксантин, гипоксантин, 2-аминоаденин, 6-метил и другие алкильные производные аденина и гуанина, 2-тиоурацил, 2-тиотимин и 2-тиоцитозин, 5-галоурацил и цитозин, 5-пропинилурацил и цитозин и другие алкильные производные пиримидиновых оснований, 6-азоурацил, цитозин и тимин, 5-урацил (псевдоурацил), 4-тиоурацил, 8-галогено, 8-амино, 8-тиол, 8-тиоалкил, 8-гидроксил и другие 8-замещенные аденины и гуанины, 5-галогено, особенно 5-бромо, 5-трифторметил и другие 5-замещенные урацилы и цитозины, 7-метилгуанин и 7-метиладенин, 2-F-аденин, 2-амино-аденин, 8-азагуанин и 8-азааденин, 7-деазагуанин и 7-дезааденин и 3-деазагуанин и 3-дезааденин. Другие модифицированные основания включают трициклические пиримидины, такие как феноксазин цитидин(1Н-пиримидо[5,4-b][1,4]бензоксазин-2(3Н)-он), фенотиазин цитидин(1Н-пиримидо[5,4-b][1,4]бензотиазин-2(3Н)-он), G-фиксирующие основания, такие как замещенный феноксазин цитидин (например, 9-(2-аминоэтокси)-Н-пиримидо[5,4-b][1,4]бензоксазин-2(3Н)-он), карбазол цитидин (2Н-пиримидо[4,5-b]индол-2-он), пиридоиндол цитидин (Н-пиридо[3',2':4,5]пирроло[2,3-d]пиримидин-2-он). Модифицированные основания могут также включать такие, в которых пуриновое или пиримидиновое основание замещено другими гетероциклами, например, 7-деаза-аденин, 7-деазагуанозин, 2-аминопиридин и 2-пиридон.

[120] В некоторых воплощениях рекомбинантные кольцевые РНК содержат модифицированные остовы. Примеры модифицированных остовов РНК включают такие, которые содержат фосфоротиоаты, хиральные фосфоротиоаты,

фосфородитиоаты, фосфотриэфиры, аминокил-фосфотриэфиры, метил- и другие алкилфосфонаты, включая 3-алкиленфосфонаты, 5'-алкиленфосфонаты и хиральные фосфонаты, фосфинаты, фосфорамидаты, включая 3'-аминофосфорамидат и аминокил-фосфорамидаты, тионофосфорамидаты, тионоалкилфосфонаты, тионоалкил-фосфотриэфиры, селенофосфаты и боранофосфаты, имеющие нормальные 3'-5' связи, их 2'-5' связанные аналоги и те, которые имеют инвертированную полярность, когда одна или более межнуклеотидных связей представляют собой связь 3' с 3', 5' с 5' или 2' с 2'.

[121] В некоторых воплощениях кольцевые РНК могут быть модифицированы химическим присоединением к РНК одной или более группировок или конъюгатов, усиливающих активность, клеточное распределение или клеточное поглощение. Например, кольцевая РНК может быть конъюгирована с интеркаляторами, репортерными молекулами, полиаминами, полиамидами, полиэтиленгликолями, полиэфирами, группами, усиливающими фармакодинамические свойства олигомеров, или группами, усиливающими фармакокинетические свойства олигомеров. В некоторых воплощениях кольцевые РНК могут быть конъюгированы с холестеринами, липидами, фосфолипидами, биотином, феназином, фолатом, фенантридином, антрахиноном, акридином, флуоресцеинами, родаминами, кумаринами или красителями. Группы, усиливающие фармакодинамические свойства, включают группы, которые улучшают поглощение РНК, усиливают устойчивость олигомеров к деградации, и/или усиливают сайт-специфическую гибридизацию с РНК. Группы, усиливающие фармакокинетические свойства, включают группы, которые улучшают поглощение, распределение, метаболизм или выведение олигомеров. Кольцевые РНК могут также быть конъюгированы с активными лекарственными субстанциями, например, аспирином, варфарином, фенилбутазоном, ибупрофеном, супрофеном, фенбуфеном, кетопрофеном, (S)-(+)-пранопрофеном, карпрофеном, дансилсаркозином, 2,3,5-трийодобензойной кислотой, флуфенамовой кислотой, фолиновой кислотой, бензотиадиазидом, хлортиазидом, диазепином, индометицином, барбитуратом, цефалоспорином, сульфаниламидным лекарственным средством, противодиабетическим агентом, антибактериальным агентом или антибиотиком. В некоторых воплощениях рекомбинантная кольцевая РНК конъюгирована с липидной наночастицей (LNP).

[122] В некоторых воплощениях кольцевая РНК является частью комплекса. В

некоторых воплощениях комплекс содержит рекомбинантную кольцевую РНК и липидную наночастицу (LNP). В некоторых воплощениях рекомбинантная кольцевая РНК и LNP конъюгированы. В некоторых воплощениях рекомбинантная кольцевая РНК и LNP ковалентно конъюгированы. В некоторых воплощениях рекомбинантная кольцевая РНК и LNP нековалентно конъюгированы.

[123] LNP может содержать, например, один или более катионных липидов, некатионных липидов и/или липидов, модифицированных PEG (полиэтиленгликоль). В некоторых воплощениях LNP может содержать по меньшей мере один из следующих катионных липидов: C12-200, DLin-KC2-DMA, DODAP, HGT4003, ICE, HGT5000 или HGT5001. В некоторых воплощениях LNP содержит холестерин и/или липид, модифицированный PEG. В некоторых воплощениях LNP содержит DMG-PEG2K. В некоторых воплощениях LNP содержит одно из следующего: C12-200, DOPE, холестерин, DMG-PEG2K; DODAP, DOPE, холестерин, DMG-PEG2K; HGT5000, DOPE, холестерин, DMG-PEG2K, HGT5001, DOPE или DMG-PEG2K. В некоторых воплощениях LNP содержит полиэтиленмин (PEI).

[124] В некоторых воплощениях рекомбинантная кольцевая РНК по существу является неиммуногенной. В некоторых воплощениях кольцевая РНК считается неиммуногенной, если она не индуцирует экспрессию или активность одного или более генов, регулируемых интерфероном (например, одного или более генов, описанных в www.interferome.org). В некоторых воплощениях гены, регулируемые интерфероном, выбраны из IFN-альфа, IFN-бета и/или TNF-альфа. В кольцевую РНК могут быть внесены различные модификации для уменьшения ее иммуногенности. Например, в некоторых воплощениях кольцевая РНК может быть модифицирована, чтобы содержать один или более М-6-метиладенозинов (m^6A), 5-метилцитозинов (5mC) или остатков псевдоуридина.

[125] В некоторых воплощениях кольцевые РНК, описанные в данном документе, менее иммуногены, чем линейная РНК. Например, в некоторых воплощениях кольцевая РНК не индуцирует существенным образом экспрессию и/или активность одного или более генов, регулируемых интерфероном. В некоторых воплощениях кольцевая РНК индуцирует экспрессию и/или активность одного или более генов, регулируемых интерфероном, приблизительно на 10%, приблизительно на 20%, приблизительно на 30%, приблизительно на 40%, приблизительно на 50%, приблизительно на 60%, приблизительно на 70%, приблизительно на 80%, приблизительно на 90% или

приблизительно на 100% меньше по сравнению с линейной РНК.

[126] В некоторых воплощениях кольцевые РНК, описанные в данном документе, имеют большее время полужизни в клетке, чем линейная РНК. Например, кольцевая РНК может иметь время полужизни, которое приблизительно на 10%, приблизительно на 20%, приблизительно на 30%, приблизительно на 40%, приблизительно на 50%, приблизительно на 60%, приблизительно на 70%, приблизительно на 80%, приблизительно на 90% или приблизительно на 100% больше по сравнению с временем полужизни линейной РНК. Например, кольцевая РНК может иметь время полужизни, которое приблизительно на 4 часа, приблизительно на 12 часов, приблизительно на 18 часов, приблизительно на 24 часа, приблизительно на 2 суток, приблизительно на 3 суток, приблизительно на 4 суток, приблизительно на 5 суток, приблизительно на 10 суток или приблизительно на 10 суток больше по сравнению с временем полужизни линейной РНК.

[127] В некоторых воплощениях рекомбинантные кольцевые РНК не реплицируются в клетках. В некоторых воплощениях рекомбинантные кольцевые РНК не представляют угрозы интеграции в геном.

[128] Кольцевые РНК могут быть получены при помощи транскрипции *in vitro* (IVT) согласно стандартным протоколам и/или с применением доступных для приобретения наборов (например, наборов MAXIscript® или MEGAscript® от ThermoFisher®). Например, в приведенном в качестве примера протоколе для получения кольцевой РНК применяется линейная ДНК-матрица (например, молекула ДНК, кодирующая кольцевую РНК, описанную в данном документе), рибонуклеотидтрифосфаты, буферная система, включающая ДТТ (дитиотреитол) и ионы магния, и соответствующая РНК-полимераза фага. ДНК-матрица содержит двуцепочечную промоторную область, с которой связывается полимераз фага и инициирует синтез РНК. Условия реакции (например, тип соли нуклеотида, тип и концентрацию соли в буфере для транскрипции, концентрацию ферментов и pH) оптимизируют для конкретной используемой полимеразы и для всего набора компонентов, для достижения оптимального выхода. Крупномасштабные реакции IVT позволяют получать до 120-180 мкг РНК на микрограмм матрицы в 20 мкл реакции. В некоторых воплощениях кольцевые РНК могут быть образованы путем синтеза РНК согласно стандартным протоколам.

[129] В области техники известны различные способы циркуляризации РНК. Например, приведенный в качестве иллюстрации протокол циркуляризации линейной

РНК приведен на **Фиг. 1**, а перечень приведенных в качестве примера стратегий циркуляризации линейной РНК представлен на **Фиг. 2A-2G**. В некоторых воплощениях РНК является самоциркуляризирующейся, например, если она содержит самосплайсирующиеся интроны.

[130] Также предложены нуклеиновые кислоты (например, молекулы ДНК), кодирующие описанные здесь кольцевые РНК, и векторы, содержащие их.

Способы экспрессии белка (например, фактора перепрограммирования) в клетке с применением кольцевой РНК

[131] В данном документе предложены способы экспрессии белка в клетке, где белок кодируется кольцевой РНК. В некоторых воплощениях белок представляет собой фактор перепрограммирования. В некоторых воплощениях фактор перепрограммирования представляет собой фактор транскрипции. В некоторых воплощениях белок представляет собой Oct3/4, Klf4, Sox2, Nanog, Lin28, c-Мус и/или L-Мус. В некоторых воплощениях белок представляет собой Oct3/4, Klf4, Sox2, Nanog, Lin28 и/или c-Мус.

[132] В некоторых воплощениях способ экспрессирования белка в клетке включает приведение клетки в контакт с по меньшей мере одним из: рекомбинантных кольцевых РНК, векторов, комплексов или композиций, описанных в данном документе, и поддержание клетки в условиях, при которых экспрессируется белок.

[133] В некоторых воплощениях способ экспрессирования белка в клетке включает приведение клетки в контакт с первой кольцевой РНК и по меньшей мере одной дополнительной кольцевой РНК и поддержание клетки в условиях, при которых экспрессируется белок. В некоторых воплощениях способ экспрессирования белка в клетке включает приведение клетки в контакт с первой кольцевой РНК и второй кольцевой РНК и поддержание клетки в условиях, при которых экспрессируется белок. В некоторых воплощениях способ экспрессирования белка в клетке включает приведение клетки в контакт с первой, второй и третьей кольцевой РНК и поддержание клетки в условиях, при которых экспрессируется белок. В некоторых воплощениях способ экспрессирования белка в клетке включает приведение клетки в контакт с по меньшей мере четырьмя кольцевыми РНК, по меньшей мере пятью кольцевыми РНК, по меньшей мере шестью кольцевыми РНК, по меньшей мере семью кольцевыми РНК, по меньшей мере восемью кольцевыми РНК, по меньшей мере девятью кольцевыми РНК или по меньшей мере десятью кольцевыми РНК и поддержание клетки в условиях, при которых экспрессируется белок.

[134] В некоторых воплощениях способ экспрессирования белка в клетке включает приведение клетки в контакт с первой кольцевой РНК, кодирующей Oct3/4, Klf4, Sox2, Nanog, Lin28, c-Мус или L-Мус, и по меньшей мере одной дополнительной кольцевой РНК и поддержание клетки в условиях, при которых экспрессируется белок. В некоторых воплощениях способ экспрессирования белка в клетке включает приведение клетки в контакт с первой кольцевой РНК, кодирующей Oct3/4, Klf4, Sox2, Nanog, Lin28, c-Мус или L-Мус, и по меньшей мере двумя, по меньшей мере тремя, по меньшей мере четырьмя, по меньшей мере пятью, по меньшей мере шестью, по меньшей мере семью, по меньшей мере восемью, по меньшей мере девятью или по меньшей мере десятью дополнительными кольцевыми РНК и поддержание клетки в условиях, при которых экспрессируется белок. В некоторых воплощениях способ экспрессирования белка в клетке включает приведение клетки в контакт с множеством кольцевых РНК (например, по меньшей мере двумя, по меньшей мере тремя, по меньшей мере четырьмя, по меньшей мере пятью, по меньшей мере шестью, по меньшей мере семью, по меньшей мере восемью, по меньшей мере девятью или по меньшей мере десятью) кольцевыми РНК, где каждая кольцевая РНК кодирует Oct3/4, Klf4, Sox2, Nanog, Lin28, c-Мус или L-Мус, и поддержание клетки в условиях, при которых экспрессируется белок.

[135] В некоторых воплощениях способ экспрессирования белка в клетке включает приведение клетки в контакт с (1) первой кольцевой РНК, кодирующей Oct3/4, Klf4, Sox2, Nanog, Lin28, c-Мус или L-Мус, и (2) по меньшей мере одной дополнительной кольцевой РНК, где по меньшей мере одна дополнительная кольцевая РНК представляет собой circBIRC6, circCORO1C или circMAN1A2, и поддержание клетки в условиях, при которых экспрессируется белок. В некоторых воплощениях дополнительная кольцевая РНК представляет собой circBIRC6. В некоторых воплощениях circBIRC6 имеет последовательность SEQ ID NO: 13 или последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95%. В некоторых воплощениях дополнительная кольцевая РНК представляет собой circCORO1C. В некоторых воплощениях circCORO1C имеет последовательность SEQ ID NO: 14 или последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95%. В некоторых воплощениях дополнительная кольцевая РНК представляет собой circMAN1A2. В некоторых воплощениях кодируемый circMAN1A2 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15 или последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95%.

[136] В некоторых воплощениях способ экспрессирования белка в клетке включает приведение клетки в контакт с кольцевыми РНК, каждая из которых кодирует одно из Oct4, Sox2, Klf4 и cMyc. В некоторых воплощениях способ экспрессирования белка в клетке включает приведение клетки в контакт с кольцевыми РНК, каждая из которых кодирует одно из Oct4, Sox2, Klf4, cMyc и Lin28. В некоторых воплощениях способ экспрессирования белка в клетке включает приведение клетки в контакт с (1) кольцевыми РНК, каждая из которых кодирует одно из Oct4, Sox2, Klf4, cMyc и Lin28, и (2) circBIRC6, circCORO1C и circMAN1A2.

[137] В некоторых воплощениях клетка представляет собой прокариотическую клетку. В некоторых воплощениях клетка представляет собой эукариотическую клетку. В некоторых воплощениях клетка представляет собой клетку животного. В некоторых воплощениях клетка представляет собой клетку млекопитающего (например, мышиную, коровью, обезьянью, свиную, лошадиную, овечью клетку или клетку человека). В некоторых воплощениях клетка представляет собой человеческую клетку. В некоторых воплощениях клетка представляет собой клетку дрожжей, грибов или растений.

[138] В некоторых воплощениях клетка представляет собой соматическую клетку. В некоторых воплощениях клетка представляет собой фибробласт, клетку, имеющую происхождение из периферической крови, эндотелиальную клетку-предшественник, клетку, имеющую происхождение из пуповинной крови, гепатоцит, кератиноцит, меланоцит, клетку, имеющую происхождение из жировой ткани, или клетку, имеющую происхождение из мочи (например, эпителиальную клетку-предшественник почки). В некоторых воплощениях клетка представляет собой эпителиальную клетку, эндотелиальную клетку, нейрональную клетку, жировую клетку, клетку сердца, клетку скелетной мускулатуры, иммунную клетку, клетку печени, клетку селезенки, клетку легкого, клетку циркулирующей крови, клетку желудочно-кишечного тракта, клетку почки, клетку костного мозга, клетку-предшественник или клетку поджелудочной железы. В некоторых воплощениях клетка выделена из любой соматической ткани, включая мозг, печень, легкое, кишечник, желудок, кишечник, жир, мышцы, матку, кожу, селезенку, эндокринный орган, кость и так далее.

[139] В некоторых воплощениях клетка представляет собой адгезивную клетку. В некоторых воплощениях клетка представляет собой неадгезивную клетку (например, клетку в суспензии, такую как CD34+ клетка).

[140] В некоторых воплощениях клетку приводят в контакт с кольцевой РНК. В

некоторых воплощениях клетку приводят в контакт с кольцевой РНК более чем один раз (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 раз). В некоторых воплощениях приведение в контакт осуществляют с эффективными интервалами. Эффективные интервалы могут, например, представлять собой один раз в сутки, через сутки, раз в трое суток, раз в неделю, раз в две недели или раз в месяц.

[141] В некоторых воплощениях приведение в контакт включает трансфицирование клетки кольцевой РНК или вектором, содержащим кодирующую ее нуклеиновую кислоту (например, молекулу ДНК). В некоторых воплощениях кольцевой РНК трансфицируют клетку, используя липид-опосредованную трансфекцию. Липид-опосредованная трансфекция стимулирует активное поглощение нуклеиновых кислот посредством эндоцитоза. Приведенным в качестве примера реагентом для липид-опосредованной трансфекции является Lipofectamine[®] (например, Lipofectamine[®] RNAiMAX[®] от ThermoFisher[®]). В некоторых воплощениях способ трансфицирования клетки включает стадии (1) разведения РНК или ДНК и трансфицирующего реагента в отдельных пробирках, (2) объединение ДНК или РНК с трансфицирующим реагентом для образования комплексов, (3) добавление комплексов к клеткам, (4) анализ экспрессии белка в клетках. Определение экспрессии белка в клетках можно осуществлять несколькими способами, включая среди прочих анализ методом вестерн-блоттинга, иммуноцитохимию и определение, опосредованное флуоресценцией (например, FACS).

[142] В некоторых воплощениях приведение в контакт включает внедрение в клетку кольцевой РНК или вектора, содержащего кодирующую ее нуклеиновую кислоту (например, молекулу ДНК) путем электропорации. Электропорация обеспечивает доставку нуклеиновых кислот путем транзитного создания пор в клеточной мембране, когда клетка находится в растворе, в котором присутствуют нуклеиновые кислоты в высокой концентрации.

[143] В некоторых воплощениях приведение в контакт включает инкубирование клетки с комплексами circRNA-LNP.

[144] В некоторых воплощениях приведение в контакт включает один или более способов, таких как баллистическая трансфекция (то есть генную пушку или биолистическую трансфекцию), магнетофекцию, пептид-опосредованную трансфекцию (трансфекцию на основе наночастиц с нековалентным связыванием пептид/РНК, таких как система трансфекции N-TER[™] от Sigma-Aldrich, или ковалентным присоединением

пептида к РНК) и/или путем микроинъекции. Можно также применять комбинации указанных методик, используемых последовательно или одновременно.

[145] Как объяснено выше, способы экспрессирования белка в клетке могут включать поддержание клетки в условиях, при которых экспрессируется белок. Такие условия хорошо известны специалистам в области техники и могут варьировать в зависимости от типа клетки. Например, в некоторых воплощениях клетку можно поддерживать в нормальной культуральной среде (с сывороткой или без), приблизительно при 37°C в атмосфере, содержащей приблизительно 5% CO₂.

Способы получения iPSC

[146] В данном документе также предложены способы перепрограммирования соматических клеток и способы получения iPSC. В некоторых воплощениях способ получения iPSC включает приведение соматической клетки в контакт с по меньшей мере одним из: рекомбинантных кольцевых РНК, комплексов, векторов или композиций, описанных в данном документе, и поддержание клетки в условиях, при которых получают перепрограммированную iPSC.

[147] В некоторых воплощениях способ получения iPSC включает приведение соматической клетки в контакт с по меньшей мере одной рекомбинантной кольцевой РНК, кодирующей фактор перепрограммирования (например, фактор транскрипции), и поддержание клетки в условиях, при которых получают перепрограммированную iPSC. Фактор перепрограммирования может, например, представлять собой любой из факторов перепрограммирования, перечисленных в Таблице 1. В некоторых воплощениях фактор перепрограммирования представляет собой Oct3/4, Klf4, Sox2, Nanog, Lin28, c-Мyc и/или L-Мyc. В некоторых воплощениях фактор перепрограммирования представляет собой Oct3/4. В некоторых воплощениях фактор перепрограммирования представляет собой Klf4. В некоторых воплощениях фактор перепрограммирования представляет собой Sox2. В некоторых воплощениях фактор перепрограммирования представляет собой Nanog. В некоторых воплощениях фактор перепрограммирования представляет собой Lin28. В некоторых воплощениях фактор перепрограммирования представляет собой c-Мyc. В некоторых воплощениях фактор перепрограммирования представляет собой L-Мyc.

[148] В некоторых воплощениях способ получения iPSC включает приведение соматической клетки в контакт с более чем одной кольцевой РНК, где каждая кольцевая РНК кодирует фактор перепрограммирования, и поддержание клетки в условиях, при

которых получают перепрограммированную iPSC. В некоторых воплощениях клетку приводят в контакт с по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9 или по меньшей мере 10 кольцевыми РНК, каждая из которых кодирует фактор перепрограммирования. В некоторых воплощениях способ получения iPSC включает приведение соматической клетки в контакт с 6 кольцевыми РНК, кодирующими факторы перепрограммирования Oct3/4, Klf4, Sox2, Nanog, Lin28 и c-Мус. В некоторых воплощениях способ получения iPSC включает приведение соматической клетки в контакт с 4 кольцевыми РНК, кодирующими факторы перепрограммирования Oct3/4, Klf4, Sox2 и c-Мус. В некоторых воплощениях способ получения iPSC включает приведение соматической клетки в контакт с 4 кольцевыми РНК, кодирующими факторы перепрограммирования Oct3/4, Klf4, Sox2 и L-Мус. В некоторых воплощениях способ получения iPSC включает приведение соматической клетки в контакт с 6 кольцевыми РНК, кодирующими факторы перепрограммирования Oct3/4, Klf4, Sox2, Nanog, Lin28 и L-Мус. В некоторых воплощениях способ получения iPSC включает приведение соматической клетки в контакт с 5 кольцевыми РНК, кодирующими факторы перепрограммирования Oct3/4, Klf4, Sox2, Lin28 и c-Мус. В некоторых воплощениях способ получения iPSC включает приведение соматической клетки в контакт с 5 кольцевыми РНК, кодирующими факторы перепрограммирования Oct3/4, Klf4, Sox2, Lin28 и L-Мус.

[149] В некоторых воплощениях способ получения iPSC включает приведение соматической клетки в контакт с двумя кольцевыми РНК и поддержание клетки в условиях, при которых получают перепрограммированную iPSC. В некоторых воплощениях каждая из первой и второй кольцевых РНК кодирует фактор перепрограммирования, выбранный из Oct3/4, Klf4, Sox2, Nanog, Lin28, c-Мус или L-Мус, где первая и вторая кольцевые РНК не кодируют один и тот же фактор перепрограммирования. В некоторых воплощениях первая кольцевая РНК кодирует Oct3/4, а вторая кольцевая РНК кодирует Sox2.

[150] В некоторых воплощениях способ получения iPSC включает приведение соматической клетки в контакт с тремя кольцевыми РНК и поддержание клетки в условиях, при которых получают перепрограммированную iPSC. В некоторых воплощениях каждая из первой, второй и третьей кольцевых РНК кодирует фактор перепрограммирования, выбранный из Oct3/4, Klf4, Sox2, Nanog, Lin28, c-Мус или L-

Мус, где ни одна из первой, второй и третьей кольцевых РНК не кодирует один и тот же фактор перепрограммирования.

[151] В некоторых воплощениях способ получения iPSC включает приведение соматической клетки в контакт с четырьмя кольцевыми РНК и поддержание клетки в условиях, при которых получают перепрограммированную iPSC. В некоторых воплощениях каждая из первой, второй, третьей и четвертой кольцевых РНК кодирует фактор перепрограммирования, выбранный из Oct3/4, Klf4, Sox2, Nanog, Lin28, с-Мус или L-Мус, где ни одна из первой, второй, третьей и четвертой кольцевых РНК не кодирует один и тот же фактор перепрограммирования. В некоторых воплощениях первая кольцевая РНК кодирует Oct3/4, вторая кольцевая РНК кодирует Sox2, третья кольцевая РНК кодирует с-Мус, а четвертая кольцевая РНК кодирует Klf4. В некоторых воплощениях первая кольцевая РНК кодирует Oct3/4, вторая кольцевая РНК кодирует Sox2, третья кольцевая РНК кодирует L-Мус, а четвертая кольцевая РНК кодирует Klf4.

[152] В некоторых воплощениях способ получения iPSC включает приведение соматической клетки в контакт с четырьмя кольцевыми РНК и поддержание клетки в условиях, при которых получают перепрограммированную iPSC. В некоторых воплощениях каждая из первой, второй, третьей и четвертой кольцевых РНК кодирует фактор перепрограммирования, выбранный из Oct3/4, Klf4, Sox2, Nanog и Lin28, где ни одна из первой, второй, третьей, четвертой и пятой кольцевых РНК не кодирует один и тот же фактор перепрограммирования. В некоторых воплощениях первая кольцевая РНК кодирует Oct3/4, вторая кольцевая РНК кодирует Sox2, третья кольцевая РНК кодирует Klf4, а четвертая кольцевая РНК кодирует Lin28.

[153] В некоторых воплощениях способ получения iPSC включает приведение соматической клетки в контакт с пятью кольцевыми РНК и поддержание клетки в условиях, при которых получают перепрограммированную iPSC. В некоторых воплощениях каждая из первой, второй, третьей, четвертой и пятой кольцевых РНК кодирует фактор перепрограммирования, выбранный из Oct3/4, Klf4, Sox2, Nanog, Lin28, с-Мус или L-Мус, где ни одна из первой, второй, третьей, четвертой и пятой кольцевых РНК не кодирует один и тот же фактор перепрограммирования. В некоторых воплощениях первая кольцевая РНК кодирует Oct3/4, вторая кольцевая РНК кодирует Sox2, третья кольцевая РНК кодирует Klf4, четвертая кольцевая РНК кодирует сМус, а пятая кольцевая РНК кодирует Lin28.

[154] В некоторых воплощениях способ получения iPSC включает приведение

соматической клетки в контакт с пятью кольцевыми РНК и поддержание клетки в условиях, при которых получают перепрограммированную iPSC. В некоторых воплощениях каждая из первой, второй, третьей, четвертой и пятой кольцевых РНК кодирует фактор перепрограммирования, выбранный из Oct3/4, Klf4, Sox2, Nanog, Lin28, где ни одна из первой, второй, третьей, четвертой и пятой кольцевых РНК не кодирует один и тот же фактор перепрограммирования. В некоторых воплощениях первая кольцевая РНК кодирует Oct3/4, вторая кольцевая РНК кодирует Sox2, третья кольцевая РНК кодирует Klf4, четвертая кольцевая РНК кодирует Lin28, а пятая кольцевая РНК кодирует Nanog. В некоторых воплощениях первая кольцевая РНК кодирует Oct3/4, вторая кольцевая РНК кодирует Sox2, третья кольцевая РНК кодирует Klf4, четвертая кольцевая РНК кодирует Lin28, а пятая кольцевая РНК кодирует с-Мус. В некоторых воплощениях первая кольцевая РНК кодирует Oct3/4, вторая кольцевая РНК кодирует Sox2, третья кольцевая РНК кодирует Klf4, четвертая кольцевая РНК кодирует Lin28, а пятая кольцевая РНК кодирует L-Мус.

[155] В некоторых воплощениях способ получения iPSC включает приведение соматической клетки в контакт с шестью кольцевыми РНК и поддержание клетки в условиях, при которых получают перепрограммированную iPSC. В некоторых воплощениях каждая из первой, второй, третьей, четвертой, пятой и шестой кольцевых РНК кодирует фактор перепрограммирования, выбранный из Oct3/4, Klf4, Sox2, Nanog, Lin28, с-Мус или L-Мус, где ни одна из первой, второй, третьей, четвертой, пятой и шестой кольцевых РНК не кодирует один и тот же фактор перепрограммирования. В некоторых воплощениях первая кольцевая РНК кодирует Oct3/4, вторая кольцевая РНК кодирует Sox2, третья кольцевая РНК кодирует Klf4, четвертая кольцевая РНК кодирует сМус, пятая кольцевая РНК кодирует Lin28, а шестая кольцевая РНК кодирует Nanog. В некоторых воплощениях первая кольцевая РНК кодирует Oct3/4, вторая кольцевая РНК кодирует Sox2, третья кольцевая РНК кодирует Klf4, четвертая кольцевая РНК кодирует L-Мус, пятая кольцевая РНК кодирует Lin28, а шестая кольцевая РНК кодирует Nanog.

[156] В некоторых воплощениях способ получения iPSC включает приведение соматической клетки в контакт с шестью кольцевыми РНК и поддержание клетки в условиях, при которых получают перепрограммированную iPSC. В некоторых воплощениях каждая из первой, второй, третьей, четвертой, пятой и шестой кольцевых РНК кодирует фактор перепрограммирования, выбранный из Oct3/4, Klf4, Sox2, Nanog, Lin28, с-Мус или L-Мус, где ни одна из первой, второй, третьей, четвертой, пятой и

шестой кольцевых РНК не кодирует один и тот же фактор перепрограммирования. В некоторых воплощениях первая кольцевая РНК кодирует Oct3/4, вторая кольцевая РНК кодирует Sox2, третья кольцевая РНК кодирует Klf4, четвертая кольцевая РНК кодирует cMyc, пятая кольцевая РНК кодирует Lin28, а шестая кольцевая РНК кодирует Nanog. В некоторых воплощениях первая кольцевая РНК кодирует Oct3/4, вторая кольцевая РНК кодирует Sox2, третья кольцевая РНК кодирует Klf4, четвертая кольцевая РНК кодирует cMyc, пятая кольцевая РНК кодирует Lin28, а шестая кольцевая РНК кодирует Nanog.

[157] В некоторых воплощениях способ получения iPSC включает приведение соматической клетки в контакт с семью кольцевыми РНК и поддержание клетки в условиях, при которых получают перепрограммированную iPSC.

[158] В некоторых воплощениях клетку приводят в контакт с множеством кольцевых РНК, где каждая кольцевая РНК кодирует фактор перепрограммирования, выбранный из факторов перепрограммирования, приведенных в Таблице 1, где ни одна из кольцевых РНК не кодирует один и тот же фактор перепрограммирования.

[159] В некоторых воплощениях клетку приводят в контакт с множеством кольцевых РНК, как показано в Таблице 3. В Таблице 3 в каждом ряду представлены различные комбинации кольцевых РНК, которые можно приводить в контакт с клеткой, где «X» означает, что кольцевую РНК приводят в контакт с клеткой. Например, в комбинации №1 клетку приводят в контакт с кольцевой РНК, кодирующей Oct3/4, и кольцевой РНК, кодирующей Klf4. В комбинации №104 клетку приводят в контакт с кольцевыми РНК, кодирующими Oct3/4, Klf4, Sox2, и Nanog, Lin28 и L-Myc. В каждой из приведенных ниже комбинаций клетку можно дополнительно приводить в контакт с одной или более неколовыми нуклеиновыми кислотами РНК, кодирующими один или более факторов перепрограммирования (например, одной или более плазидами или мРНК).

Таблица 3. Комбинации кольцевых РНК для создания iPSC

Номер комбинации	Circ Oct3/4	circKlf4	circSox2	Circ Nanog	Circ Lin28	Circ C-Myc	Circ L-Myc
1	X	X					
2	X		X				
3	X			X			
4	X				X		
5	X					X	
6	X						X

Номер комбинации	Circ Oct3/4	circKlf4	circSox2	Circ Nanog	Circ Lin28	Circ C-Myc	Circ L- Myc
7		X	X				
8		X		X			
9		X			X		
10		X				X	
11		X					X
12			X	X			
13			X		X		
14			X			X	
15			X				X
16				X	X		
17				X		X	
18				X			X
19					X	X	
20					X		X
21						X	X
22	X	X	X				
23	X	X		X			
24	X	X			X		
25	X	X				X	
26	X	X					X
27	X		X	X			
28	X		X		X		
29	X		X			X	
30	X		X				X
31	X			X	X		
32	X			X		X	
33	X			X			X
34	X				X	X	
35	X				X		X
36	X					X	X
37		X	X	X			
38		X	X		X		
39		X	X			X	
40		X	X				X

Номер комбинации	Circ Oct3/4	circKlf4	circSox2	Circ Nanog	Circ Lin28	Circ C-Myc	Circ L- Myc
41		X		X	X		
42		X		X		X	
43		X		X			X
44		X			X	X	
45		X			X		X
46		X				X	X
47			X	X	X		
48			X	X		X	
49			X	X			X
50			X		X	X	
51			X		X		X
52			X			X	X
53				X	X	X	
54				X	X		X
55				X		X	X
56					X	X	X
57	X	X	X	X			
58	X	X	X		X		
59	X	X	X			X	
60	X	X	X				X
61	X	X		X	X		
62	X	X		X		X	
63	X	X		X			X
64	X	X			X	X	
65	X	X			X		X
66	X	X				X	X
67	X		X	X	X		
68	X		X	X		X	
69	X		X	X			X
70	X		X		X	X	
71	X		X		X		X
72	X		X			X	X
73	X			X	X	X	
74	X			X	X		X

Номер комбинации	Circ Oct3/4	circKlf4	circSox2	Circ Nanog	Circ Lin28	Circ C-Myc	Circ L-Myc
75	X			X		X	X
76	X				X	X	X
77		X	X	X	X		
78		X	X	X		X	
79		X	X	X			X
80		X		X	X	X	
81		X		X	X		X
82		X		X		X	X
83		X			X	X	X
84			X	X	X	X	
85			X	X	X		X
86				X	X	X	X
87	X	X	X	X	X		
88	X	X	X	X		X	
89	X	X	X	X			X
90	X	X	X		X	X	
91	X	X	X		X		X
92	X	X	X			X	X
93	X		X	X	X	X	
94	X		X	X	X		X
95	X	X		X	X	X	
96	X	X		X	X		X
97	X	X			X	X	X
98		X	X	X	X	X	
99		X		X	X	X	X
100	X	X	X	X	X	X	
101	X		X	X	X	X	X
102	X	X		X	X	X	X
103	X	X	X		X	X	X
104	X	X	X	X	X		X
105		X	X	X	X	X	X
106	X	X	X	X	X	X	X

[160] В некоторых воплощениях способ получения iPSC включает приведение

соматической клетки в контакт с кольцевыми РНК из комбинации №100, приведенной в Таблице 3 выше. В некоторых воплощениях способ получения iPSC включает приведение соматической клетки в контакт с комбинацией кольцевых РНК, которые не включают ни одной кольцевой РНК, экспрессирующей C-Мус или L-Мус. В некоторых таких воплощениях комбинация выбрана из комбинации, приведенной в Таблице 3 выше, включающей C-Мус и/или L-Мус, но данная комбинация модифицирована для исключения C-Мус и/или L-Мус.

[161] В некоторых воплощениях способ получения iPSC включает приведение соматической клетки в контакт с кольцевой РНК, кодирующей Oct4, и дополнительно приведение соматической клетки в контакт с одной или более линейными РНК, кодирующими фактор дифференцировки, кольцевую РНК, кодирующую фактор дифференцировки или вирусные векторы, кодирующие фактор дифференцировки. В некоторых воплощениях уровень экспрессии Oct4 ниже по сравнению с аналогичным способом, в котором клетку приводят в контакт с линейной РНК, кодирующей Oct4. В некоторых воплощениях экспрессия Oct4 продолжается в течение более длительного времени, чем при аналогичном способе, в котором клетку приводят в контакт с линейной РНК, кодирующей Oct4.

[162] В некоторых воплощениях способ получения iPSC включает приведение клетки в контакт с одной или более кольцевыми РНК, кодирующими фактор перепрограммирования, описанный выше (например, в Таблице 3), и дополнительно включает приведение клетки в контакт с одной или более кольцевыми РНК. В некоторых воплощениях одна или более дополнительных кольцевых РНК выбрана из *circBIRC6*, *circCORO1C* и *circMAN1A2*. В некоторых воплощениях дополнительная кольцевая РНК представляет собой *circBIRC6*. В некоторых воплощениях дополнительная кольцевая РНК представляет собой *circCORO1C*, а в некоторых воплощениях дополнительная кольцевая РНК представляет собой *circMAN1A2*.

[163] В некоторых воплощениях способ получения iPSC включает приведение клетки в контакт с одной или более кольцевыми РНК, кодирующими фактор перепрограммирования, описанный выше (например, в Таблице 3), и дополнительно включает приведение клетки в контакт с белком B18R или кольцевой РНК, кодирующей белок B18R. В некоторых воплощениях способ получения iPSC включает приведение соматической клетки в контакт с одной или более кольцевыми РНК, кодирующими фактор перепрограммирования, как описано выше (например, в Таблице 3), одной или

более кольцевыми РНК, выбранными из circBIRC6, circCORO1C и circMAN1A2, и белком B18R или кольцевой РНК, кодирующей белок B18R. Белок B18R, кодируемый открытой рамкой считывания B18R в штамме Western Reserve (WR) вируса осповакцины, представляет собой белок, связывающий интерферон (IFN) I типа, который, как известно, подавляет интерфероновый ответ и защищает клетки от влияния интерферона. Пример последовательности B18R приведен в SEQ ID NO: 16. В некоторых воплощениях белок B18R имеет последовательность, которая по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 16.

[164] В некоторых воплощениях способ получения iPSC включает приведение соматической клетки в контакт с одной или более кольцевыми РНК, кодирующими фактор перепрограммирования, описанный выше (например, в Таблице 3), и дополнительно включает приведение клетки в контакт с одним или более дополнительными факторами перепрограммирования. Дополнительный фактор перепрограммирования может, например, представлять собой некодирующую РНК (например, LINcRNA-ROR, miR302 (miR302d, miR302a, miR302c or miR302b), miR367, miR766, miR200c, miR369, miR372, Let7, miR19a/b), витамин C, вальпроовую кислоту, CHIR99021, парнат, SB431542, PD0325901, BIX-01294, литий максацилан, 8-Br-cAMP, A-83-01, тиазовивин, Y-27632, EPZ004777 или DAPT.

[165] В некоторых воплощениях способ перепрограммирования клетки может включать приведение клетки в контакт с: (1) по меньшей мере одной кольцевой РНК, кодирующей фактор перепрограммирования, (2) по меньшей мере одной кольцевой РНК, которая не кодирует какой-либо белок или миРНК, (3) по меньшей мере одной кольцевой или линейной РНК, кодирующей миРНК, и/или (4) по меньшей мере одной кольцевой или линейной РНК, кодирующей вирусный белок, в любой комбинации. По меньшей мере один фактор перепрограммирования может, например, представлять собой любой из факторов перепрограммирования, приведенных в Таблице 1. По меньшей мере одна кольцевая РНК, не кодирующая какой-либо белок или миРНК, может, например, представлять собой circBIRC6 (SEQ ID NO: 13), circCORO1C (SEQ ID NO: 14) и/или circMAN1A2 (SEQ ID NO: 15). Например, миРНК может представлять собой миРНК из семейства miRNA302 (например, miR302d, miR302a, miR302c и miR302b) или miR367. Вирусный белок может, например, представлять собой B18R, E3 или K3.

[166] В некоторых воплощениях способ перепрограммирования клетки может включать обработку клетки для подавления или предупреждения врожденного

иммунного ответа. Например, способ перепрограммирования клетки может включать приведение клетки в контакт с одним или более вирусными белками, которые ингибируют врожденный иммунный ответ, или кольцевой(ыми) РНК, кодирующей(ими) вирусный(е) белок(белки). Вирусные белки могут, например, представлять собой ингибиторы путей RIG-1 (индуцируемого ретиноевой кислотой гена I) или PKR (протеинкиназы R). Примеры вирусных белков, подходящих для применения в способах, описанных в данном документе, включают, без ограничения, B18R, E3 или K3 из вируса осповакцины. Дополнительные вирусные белки перечислены ниже в Таблице 4.

Таблица 4. Вирусные белки для подавления врожденного иммунного ответа

Белок	Вирус
Гамма 34.5	Вирус простого герпеса (HSV)
VP35	Вирус Эбола
NS1 вируса гриппа	Вирус гриппа
pTRS1/pIRS1	Цитомегаловирус (CMV) человека
m142/m143	CMV мыши
NSs	вирус лихорадки долины Рифт (RVFV)
E3L	Вирус осповакцины
MC159L	Поксвирус
NSP3	Ротавирус группы С
NSP5	Ротавирус группы 1
Us11	Вирус простого герпеса
SM	Вирус Эпштейна-Барр
OVIFNR	Парапоксвирус
Crm1	Поксвирус
L(pro)	Вирус ящура
Us11	Вирус простого герпеса
E6	Папилломавирус
Большой Т-антиген	SV-40
LANA2	Вирус герпеса
BILF1	Вирус Эпштейна-Барр
NS5A	Вирус гепатита С
P58	Вирус гриппа
SM	Вирус Эпштейна-Барр
vIRF-2	Вирус герпеса человека-8
PK2	Бакуловирус
TAT	ВИЧ-1
K3L	Вирус Осповакцины, Iridoviridae
S-HDAg	Вирус гепатита D
E2	Вирус гепатита С
C8L	Вирус оспы свиней

[167] Другим способом подавления или предупреждения врожденного иммунного ответа является обработка клетки миРНК (или кольцевой РНК, кодирующей миРНК), мишенью которой является RIG-1 (индуцируемый ретиноевой кислотой ген I) или PKR (протеинкиназа R). Например, миРНК может представлять собой miR146a, miR485, miR182, nc886, miR-155, miR526a или miR132. В некоторых воплощениях способ перепрограммирования клетки может включать обработку клетки миРНК или кодирующей ее кольцевой РНК, где мишенью миРНК является RIG-1 или PKR.

[168] Приведенные в качестве иллюстрации РНК для применения в способе перепрограммирования клетки показаны ниже в Таблице 5. В Таблице 5 в каждом ряду приведены различные комбинации, с которыми можно приводить в контакт клетку, где «X» указывает, что РНК приводят в контакт с клеткой. Например, в комбинации №1 клетку приводят в контакт с кольцевой РНК, кодирующей фактор перепрограммирования. В комбинации №15 клетку приводят в контакт с кольцевой РНК, кодирующей фактор перепрограммирования, кольцевой РНК, не кодирующей никакой белок или миРНК, кольцевой или линейной РНК, кодирующей миРНК, и кольцевой или линейной РНК, кодирующей вирусный белок.

Таблица 5. Комбинации РНК для применения в способе перепрограммирования клетки

Номер комбинации	Кольцевая РНК, кодирующая фактор перепрограммирования (см., например, Таблицу 1)	Кольцевая РНК, не кодирующая какой-либо белок или миРНК (например, circBIRC6, circCORO1c, circMAN1A2)	Кольцевая или линейная РНК, кодирующая миРНК (например, miR302d, miR302a, miR302c, miR302b или miR367)	Кольцевая или линейная РНК, кодирующая вирусный белок (например, B18R, E3, K3)
1	X			
2		X		
3			X	
4				X
5	X	X		
6	X		X	
7	X			X
8		X	X	
9		X		X
10			X	X
11	X	X	X	
12	X	X		X
13	X		X	X
14		X	X	X
15	X	X	X	X

[169] Приведение клетки в контакт можно осуществлять любыми способами, описанными выше, такими как трансфекция, электропорация и/или применение комплексов circRNA-LNP. В некоторых воплощениях приведение в контакт включает инкубирование клетки с одной или более кольцевыми РНК, такими как кольцевые РНК, кодирующие факторы перепрограммирования.

[170] В некоторых воплощениях кольцевую РНК приводят в контакт с клетками однократно. В некоторых воплощениях клетку приводят в контакт с кольцевой РНК более чем один раз, например 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 раз. В некоторых воплощениях приведение в контакт осуществляют с эффективными интервалами. Эффективные интервалы могут, например, представлять собой один раз в сутки, через сутки, раз в трое суток, раз в неделю, раз в две недели или раз в месяц. В некоторых воплощениях кольцевую РНК приводят в контакт в течение процесса перепрограммирования, так что контакт продолжается на протяжении всего процесса перепрограммирования.

[171] Как объяснено выше, способы получения iPSC могут включать поддержание клетки в условиях, при которых получают такую перепрограммированную iPSC. Такие условия известны специалистам в области техники и могут варьировать в зависимости от типа клетки. В качестве одного примера, соматические клетки могут быть помещены во флакон с соответствующей средой, так чтобы они достигали конfluence от приблизительно 75% до приблизительно 90% в сутки, когда их приводят в контакт с circRNA (сутки 0). Затем клетки можно приводить в контакт с circRNA (например, путем трансфекции). Трансфицированные клетки можно высаживать в культуральные чашки и инкубировать в течение ночи. В течение следующих 10-14 суток среду можно заменять по мере необходимости. В некоторых воплощениях в среду можно добавлять один или более дополнительных агентов для усиления клеточного перепрограммирования. За клетками можно наблюдать на предмет появления колоний iPSC, а колонии iPSC собирают и переносят в отдельные чашки для размножения.

[172] Для подтверждения плюрипотентности iPSC в выделенных клонах можно исследовать экспрессию одного или более маркеров стволовых клеток. Маркеры стволовых клеток, например, могут быть выбраны из Oct4, Lin28, SOX2, SSEA4, SSEA3, TRA-1-81, TRA-1-60, CD9, Nanog, Fbx15, Ecatl, Esgl, Eras, Gdf3, Fgf4, Cripto, Daxl, Zpf296, Slc2a3, Rex1, Utf1 и Nat1. Способы определения экспрессии таких маркеров включают, например, RT-PCR и иммунологические методы, которые определяют присутствие

кодируемых полипептидов.

[173] В некоторых воплощениях плюрипотентность клеток подтверждают путем измерения способности клеток дифференцироваться в клетки каждого из трех зародышевых листков. В некоторых воплощениях для оценки плюрипотентного характера выделенных клонов можно применять образование тератомы у иммунокомпрометированных кроликов.

[174] В некоторых воплощениях перепрограммирование посредством circRNA требует менее частого и/или меньшего числа трансфекций (по сравнению с подходами на основе линейной РНК) для достижения перепрограммирования iPSC. Например, перепрограммирование посредством circRNA может требовать приблизительно на 10%, приблизительно на 20%, приблизительно на 30%, приблизительно на 40%, приблизительно на 50%, приблизительно на 60%, приблизительно на 70%, приблизительно на 80%, приблизительно на 90% или приблизительно на 100% меньше трансфекций по сравнению с подходами на основе линейной РНК для достижения перепрограммирования.

[175] В некоторых воплощениях перепрограммирование посредством circRNA позволяет достичь большей эффективности перепрограммирования по сравнению с подходами на основе линейной РНК. «Эффективность перепрограммирования» относится к количественному или качественному параметру образования iPSC из начальной популяции клеток. Показатели эффективности перепрограммирования включают подсчет количества колоний iPSC, присутствующих в конкретный момент времени в ходе протокола перепрограммирования (как оценку скорости образования колоний) или по завершении протокола перепрограммирования (как оценку общего числа колоний iPSC, образовавшихся в ходе конкретного протокола). См., например, Пример 6 и **Фиг. 12**. Колонии iPSC можно определять количественно (например, по окрашиванию на маркеры плюрипотентности клеточной поверхности и подсчету количества окрашенных клеток – см. **Фиг. 14**) или качественно путем оценки морфологических характеристик (например, плотно упакованные клетки, где каждая клетка в колонии имеет более или менее единообразную форму и диаметр, колонии, имеющие четко выраженную границу, и клетки в колониях iPSC, имеющие высокое ядерно-цитоплазменное соотношение и заметное ядрышко). Эффективность перепрограммирования также может включать оценку относительной зрелости колоний iPSC в различных протоколах перепрограммирования. Созревание колоний iPSC можно

определять по морфологическим характеристикам, отмеченным выше.

[176] Увеличение эффективности перепрограммирования относится к увеличению одного или более показателей эффективности перепрограммирования при сравнении двух или более протоколов перепрограммирования. Например, как подробно показано в Примерах, перепрограммирование с применением факторов перепрограммирования, кодируемых *circRNA*, приводит к увеличению эффективности перепрограммирования по сравнению с перепрограммированием с применением факторов перепрограммирования, кодируемых линейной РНК.

[177] В некоторых воплощениях увеличенная эффективность перепрограммирования включает увеличение общего количества колоний iPSC, присутствующих в конце первого протокола перепрограммирования, по сравнению с общим числом колоний iPSC, присутствующих в конце второго и/или третьего протоколов перепрограммирования. В некоторых воплощениях увеличенная эффективность перепрограммирования включает увеличение общего количества колоний iPSC, присутствующих в конкретный момент времени в первом протоколе перепрограммирования, по сравнению с общим количеством колоний iPSC, присутствующих в тот же момент времени во втором и/или третьем протоколе перепрограммирования (то есть увеличение скорости образования колоний iPSC).

[178] В некоторых воплощениях клетка представляет собой прокариотическую клетку. В некоторых воплощениях клетка представляет собой эукариотическую клетку. В некоторых воплощениях клетка представляет собой клетку млекопитающего (например, мышиную, коровью, обезьянью, свиную, лошадиную, овечью клетку или клетку человека). В некоторых воплощениях клетка представляет собой клетку человека. В некоторых воплощениях клетка представляет собой клетку дрожжей, грибов или растений.

[179] В некоторых воплощениях клетка представляет собой соматическую клетку. В некоторых воплощениях клетка представляет собой фибробласт, клетку, имеющую происхождение из периферической крови, эндотелиальную клетку-предшественник, клетку, имеющую происхождение из пуповинной крови, гепатоцит, кератиноцит, меланоцит, клетку, имеющую происхождение из жировой ткани, или клетку, имеющую происхождение из мочи (например, эпителиальную клетку-предшественник почки). В некоторых воплощениях клетка представляет собой эпителиальную клетку, эндотелиальную клетку, нейрональную клетку, жировую клетку, клетку сердца, клетку

скелетной мускулатуры, иммунную клетку, клетку печени, клетку селезенки, клетку легкого, клетку циркулирующей крови, клетку желудочно-кишечного тракта, клетку почки, клетку костного мозга, клетку-предшественник или клетку поджелудочной железы. В некоторых воплощениях клетка выделена из соматической ткани, включая мозг, печень, легкое, кишечник, желудок, кишечник, жир, мышцы, матку, кожу, селезенку, эндокринный орган, кость и так далее, без ограничения ими. В некоторых воплощениях клетка представляет собой клетку амниотической жидкости, стволовую клетку жировой клетчатки, клетку пульпы зуба или бета-клетку островков поджелудочной железы.

[180] В некоторых воплощениях клетка представляет собой адгезивную клетку. В некоторых воплощениях клетка представляет собой неадгезивную клетку (например, клетку в суспензии, такую как CD34+ клетка).

Способы трансдифференцировки клеток

[181] В данном документе также предложены способы трансдифференцировки клеток с применением кольцевых РНК. В некоторых воплощениях способ непосредственного превращения клетки из клетки первого типа в клетку второго типа включает приведение клетки в контакт с рекомбинантной кольцевой РНК или композицией, описанными в данном документе, и поддержание клетки в условиях, при которых клетка превращается в клетку второго типа. В некоторых воплощениях клетка не входит в промежуточное плюрипотентное состояние. В некоторых воплощениях клетка превращается непосредственно из клетки первого типа в клетку второго типа, не становясь клеткой-предшественником.

[182] В некоторых воплощениях кольцевая РНК кодирует один или более факторов перепрограммирования, способных трансдифференцировать клетки из первого типа клеток во второй тип клеток. В некоторых воплощениях кольцевая РНК кодирует MyoD, C/EBP α , C/EBP β , Pdx1, Ngn3, Mafk, Pdx1, Hnf4 α , Foxa1, Foxa2, Foxa3, Ascl1 (также известный как Mash1), Brn2, Myt1l, miR-124, Brn2, Myt1l, Ascl1, Nurr1, Lmx1a, Ascl1, Brn2, Myt1l, Lmx1a, FoxA2, Oct4, Sox2, Klf4 и c-Myc, Tbx5, Mef2c, Gata-4 или Mesp1. В некоторых воплощениях кольцевая РНК кодирует один или более факторов перепрограммирования, перечисленных в Таблице 1.

[183] В некоторых воплощениях клетка первого типа представляет собой iPSC. В некоторых воплощениях клетка первого типа представляет собой фибробласт.

[184] В некоторых воплощениях клетка второго типа представляет собой мышечную

клетку, нейрон, кардиомиоцит, гепатоцит, островок, кератиноцит, Т-клетку или NK-клетку. В некоторых воплощениях клетка второго типа представляет собой мышечную клетку, нейрон, кардиомиоцит, гепатоцит, островковую клетку, кератиноцит, Т-клетку или NK-клетку.

[185] В некоторых воплощениях способ непосредственного превращения клетки из клетки первого типа в клетку второго типа включает приведение клетки в контакт с множеством кольцевых РНК, где каждая кольцевая РНК кодирует фактор транскрипции согласно одной из комбинаций, приведенных в Таблице 6.

[186] В некоторых воплощениях способ непосредственного превращения клетки из клетки первого типа в клетку второго типа включает приведение клетки в контакт с множеством кольцевых РНК, где каждая кольцевая РНК кодирует фактор транскрипции, приведенный в Таблице 6. В некоторых воплощениях клетку приводят в контакт с по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10 или более кольцевыми РНК.

[187] В некоторых воплощениях способ непосредственного превращения клетки из клетки первого типа в клетку второго типа включает приведение клетки в контакт с двумя кольцевыми РНК и поддержание клетки в условиях, при которых клетка превращается в клетку второго типа. В некоторых воплощениях каждая из первой и второй кольцевых РНК кодирует фактор транскрипции, приведенный в Таблице 6, где первая и вторая кольцевые РНК не кодируют один и тот же фактор транскрипции.

[188] В некоторых воплощениях способ непосредственного превращения клетки из клетки первого типа в клетку второго типа включает приведение клетки в контакт с по меньшей мере тремя кольцевыми РНК и поддержание клетки в условиях, при которых клетка превращается в клетку второго типа. В некоторых воплощениях каждая из первой, второй и третьей кольцевых РНК кодирует фактор транскрипции, приведенный в Таблице 6, где первая, вторая и третья кольцевые РНК не кодируют один и тот же фактор транскрипции.

[189] В некоторых воплощениях способ непосредственного превращения клетки из клетки первого типа в клетку второго типа включает приведение клетки в контакт с по меньшей мере четырьмя кольцевыми РНК и поддержание клетки в условиях, при которых клетка превращается в клетку второго типа. В некоторых воплощениях каждая

из первой, второй, третьей и четвертой кольцевых РНК кодирует фактор трансдифференцировки, приведенный в Таблице 6, где первая, вторая, третья и четвертая кольцевые РНК не кодируют один и тот же фактор трансдифференцировки.

[190] В некоторых воплощениях способ непосредственного превращения клетки из клетки первого типа в клетку второго типа включает приведение клетки в контакт с по меньшей мере пятью кольцевыми РНК и поддержание клетки в условиях, при которых клетка превращается в клетку второго типа. В некоторых воплощениях каждая из первой, второй, третьей, четвертой и пятой кольцевых РНК кодирует фактор трансдифференцировки, приведенный в Таблице 6, где первая, вторая, третья, четвертая и пятая кольцевые РНК не кодируют один и тот же фактор трансдифференцировки.

[191] В некоторых воплощениях способ непосредственного превращения клетки из клетки первого типа в клетку второго типа включает приведение клетки в контакт с по меньшей мере шестью кольцевыми РНК и поддержание клетки в условиях, при которых клетка превращается в клетку второго типа. В некоторых воплощениях каждая из первой, второй, третьей, четвертой, пятой и шестой кольцевых РНК кодирует фактор трансдифференцировки, приведенный в Таблице 6, где первая, вторая, третья, четвертая, пятая и шестая кольцевые РНК не кодируют один и тот же фактор трансдифференцировки.

[192] В некоторых воплощениях способ непосредственного превращения клетки из клетки первого типа в клетку второго типа включает приведение клетки в контакт с по меньшей мере семью кольцевыми РНК и поддержание клетки в условиях, при которых клетка превращается в клетку второго типа. В некоторых воплощениях каждая из первой, второй, третьей, четвертой, пятой и шестой кольцевых РНК кодирует фактор трансдифференцировки, приведенный в Таблице 6, где первая, вторая, третья, четвертая, пятая и шестая кольцевые РНК не кодируют один и тот же фактор трансдифференцировки.

[193] В некоторых воплощениях способ непосредственного превращения клетки из клетки первого типа в клетку второго типа включает приведение клетки в контакт с множеством кольцевых РНК и поддержание клетки в условиях, при которых клетка превращается в клетку второго типа. В некоторых воплощениях каждая из кольцевых РНК кодирует фактор трансдифференцировки, приведенный в Таблице 6, где ни одна из кольцевых РНК не кодирует один и тот же фактор трансдифференцировки.

[194] В некоторых воплощениях клетку приводят в контакт с кольцевой РНК,

кодирующей один или более факторов перепрограммирования, перечисленных в Таблице 6. В некоторых воплощениях способ непосредственного превращения клетки из клетки первого типа, как показано в Таблице 6, в клетку второго типа, как показано в Таблице 6, включает приведение клетки в контакт с рекомбинантной кольцевой РНК, кодирующей один или более факторов перепрограммирования, приведенных в Таблице 6, и поддержание клетки в условиях, при которых клетка превращается в клетку второго типа. Клетка первого типа может, например, представлять собой клетку любого типа, указанного в Таблице 6. Клетка второго типа может, например, представлять собой клетку любого типа, указанного в Таблице 6.

[195] В некоторых воплощениях настоящего изобретения предложена композиция, содержащая одну или более кольцевых РНК, где каждая кольцевая РНК кодирует один или более факторов трансдифференцировки, указанных в Таблице 6. В некоторых воплощениях настоящего изобретения предложена композиция, содержащая множество кольцевых РНК, где каждая кольцевая РНК кодирует по меньшей мере один фактор трансдифференцировки, указанный в Таблице 6.

[196] В некоторых воплощениях способ трансдифференцировки клетки включает приведение клетки в контакт с одной или более кольцевыми РНК, где каждая из кольцевых РНК кодирует фактор трансдифференцировки, приведенный в Таблице 6. В некоторых воплощениях способ трансдифференцировки клетки включает приведение клетки в контакт с одной или более кольцевыми РНК, где каждая из кольцевых РНК кодирует фактор трансдифференцировки, приведенный в Таблице 6, и где клетка представляет собой любую из «клеток первого типа», указанных в Таблице 6.

[197] В некоторых воплощениях способ трансдифференцировки клетки включает приведение клетки первого типа, указанной в столбце А комбинации любого номера, приведенной в Таблице 6, в контакт с соответствующим(и) фактором(ами) трансдифференцировки, указанным(и) в столбце В той же комбинации для трансдифференцировки, с получением клетки второго типа, указанной в столбце С комбинации того же номера, где по меньшей мере один фактор трансдифференцировки, указанный в столбце В, кодируется кольцевой РНК. В некоторых воплощениях все факторы трансдифференцировки, указанные в столбце В для заданной комбинации для трансдифференцировки, кодируются одной или более чем одной кольцевыми РНК. В некоторых воплощениях клетка первого типа трансдифференцируется в клетку второго типа с применением фатов трансдифференцировки, указанных в столбце В для любой из

комбинаций № 1-151. В некоторых воплощениях клетка первого типа представляет собой клетку любого типа из приведенных в столбце А для любой из комбинаций № 1-151. В некоторых воплощениях клетка второго типа представляет собой любую из клеток второго типа, приведенных в столбце С для любой из комбинаций № 1-151.

Таблица 6. Примеры факторов трансдифференцировки для превращения клетки из клетки первого типа в клетку второго типа

	Столбец А	Столбец В	Столбец С
Номер комбинации	Первый тип клеток	Фактор(ы) трансдифференцировки	Второй тип клеток
1.	Фибробласт	MyoD	Миоцит
2.	В-клетка	C/EBP α , C/EBP β	Макрофаг
3.	Клетка протоков поджелудочной железы	Pdx1	Бета-клетка
4.	Экзокринная клетка поджелудочной железы	Ngn3, Mafa, Pdx1	
5.	Гепатоцит	Эксендин-4, Pdx1	
6.	Фибробласт	Hnf4 α , Foxa1 или Foxa2 или Foxa3	Гепатоцит
7.	Фибробласт	Ascl1 (также известный как Mash1), Brn2, Myt1l, miR-124, Brn2, Myt1l	Нейрон
8.	Астроцит	Rax6, нейрогенин 2, Ascl1	
9.	Фибробласт	Ascl1, Nurr1, Lmx1a, Ascl1, Brn2, Myt1l, Lmx1a, FoxA2	Дофаминергический нейрон
10.	Фибробласт	Oct4, Sox2, Klf4 и c-Мyc, Tbx5, Mef2c, Gata-4, Mesp1	Кардиомиоцит
11.	Фибробласт кожи взрослого человека	Brn2, Myt1l, miRNA-124	Нейроны
12.	Мононуклеарные клетки периферической крови взрослого человека	Ascl1, Brn2, Myt1l, Ngn2	
13.	Астроциты полосатого тела человека	Ascl1, Brn2, Myt1l	
14.	Эмбриональные и постнатальные	Ascl1, Brn2, Myt1l	

	Столбец А	Столбец В	Столбец С
Номер комбинации	Первый тип клеток	Фактор(ы) трансдифференцировки	Второй тип клеток
	фибробласты мышы		
15.	Неонатальные фибробласты человека	Foxa2, Hnf4 α , C/EBP β , c-Мyc	Гепатоцит
16.	Эмбриональные фибробласты человека	Hnf1 α , Hnf4 α , Foxa3	
17.	Фибробласты взрослого человека	ETV2	Эндотелиальные клетки
18.	Амниотические клетки мышы	Sox17	
19.	Фибробласты кожи и легкого новорожденного человека	Oct4, Sox2, KLF4, c-Мyc bFGF, β ME	
20.	Эмбриональные фибробласты мышы	Myod1	
21.	Фибробласты кожи человека	Myod1 SB431542, Chir99021, EGF, IGF1	
22.	Фибробласты кожи человека	Морфогенный белок 1 хряща	Хондроциты
23.	Фибробласты кожи мышы	c-Мyc, KLF4, Sox9	
24.	Экзокринные клетки поджелудочной железы взрослой мышы	Pdx1, Ngn3, Mafa	Панкреатические β -клетки
25.	Экзокринные клетки поджелудочной железы человека	MAPK, STAT3	
26.	Фибробласты сердца мышы	Gata4, Mef2c, Tbx5	Кардиомиоциты
27.	Фибробласты сердца мышы	miRNA-1, miRNA-133, miRNA-208, miRNA-499	
28.	Миобласты мышы	Myod1	Адипоциты
29.	Стволовые клетки жировой ткани мышы	Runx2	
30.	Преадипоциты мышы	Runx2, MKP-1	

	Столбец А	Столбец В	Столбец С
Номер комбинации	Первый тип клеток	Фактор(ы) трансдифференцировки	Второй тип клеток
31.	Астроциты	Pax6, Mash1, или Ngn2	Глутаминергические нейроны
32.	Эмбриональные фибробласты и гепатоциты	Brn2, Ascl1 и Myt1l	Нейрональные клетки
33.	Астроциты	Dlx2; Dlx2 и Ascl1	ГАМК-эргические нейроны
34.	Эмбриональные фибробласты и фибробласты кожи взрослого	Ascl1, Lmx1a и Nurr1	Дофаминергические нейроны
35.	Фибробласты плода и постнатальные фибробласты крайней плоти	BRN2, ASCL1, MYT1L и NEUROD1	Нейрональные клетки
36.	Эмбриональные фибробласты и постнатальные фибробласты	ASCL1, BRN2, MYT1L, LMX1A и FOXA2	Нейрональные клетки
37.	Эмбриональные фибробласты	Brn4/Pou3f4, Sox2, Klf4, c-Myc и E47/Tcf3	Нейральные стволовые клетки
38.	Эмбриональные фибробласты и фибробласты крайней плоти плода	Sox2	Нейральные стволовые клетки
39.	Клетки Сертоли	Pax6, Ngn2, Hes1, Id1, Ascl1, Brn2, c-Myc и Klf4	Нейральные стволовые клетки
40.	Фибробласты (клетки IMR90)	MASH1, NGN2, SOX2, NURR1 и PITX3 + доминантно-негативный P53	Дофаминергические нейроны
41.	Несенсорные эпителиальные клетки улитки уха	Ascl1; Ascl1 и Neurod	Нейрональные клетки
42.	Астроциты	Brn4	Нейрональные клетки
43.	Фибробласты кожи	Brn2, Sox2 и Foxa2	Дофаминергические предшественники
44.	Фибробласты кожи взрослого	NEUROG2, SOX11, ISL1 и LHX3	Двигательные нейроны
45.	Фибробласты (клетки 3T6)	Ascl1, Brn4 и Tcf3	Нейрональные клетки
46.	Клетки пуповинной крови	SOX2 и HMGA2	Нейральные стволовые клетки

	Столбец А	Столбец В	Столбец С
Номер комбинации	Первый тип клеток	Фактор(ы) трансдифференцировки	Второй тип клеток
47.	Фибробласты (клетки 3Т6)	Ascl1, Brn2 и Foxa1	Нейрональные клетки
48.	Резидентные глиальные клетки	Ascl1, Lmx1a и Nurr1	Нейрональные клетки
49.	Фибробласт-подобные клетки из тканей сетчатки	ASCL1 и PAX6	Нейрональные клетки
50.	Кардиомиоциты из плюрипотентных стволовых клеток	Brn2, Ascl1, Myt1l и Neurod	Нейрональные клетки
51.	Фибробласты	ASCL1, ISL1, NEUROD1, BRN2, HB9, LHX3, MYT1L и NGN2	Двигательные нейроны
52.	Фибробласты	SOX2, GATA3 и NEUROD1	Нейроциты
53.	Фибробласты кожи	SOX2 и PAX6	Клетки-предшественники нейронов
54.	Эмбриональные фибробласты и фибробласты крайней плоти новорожденного	Ptf1a	Нейральные стволовые клетки
55.	Фибробласты взрослого	SOX2; SOX2 и PAX6; SOX2 и LMX1A; SOX2, LMX1A и FOXA2	Клетки-предшественники нейронов
56.	Не-нейрональные клетки спирального ганглия	Ascl1 и Neurod	Нейрональные клетки
57.	Мезенхимные стволовые клетки пуповинной крови	SOX2, ASCL1 и NEUROG2	Нейрональные клетки
58.	Перициты	ASCL1 и SOX2	Нейрональные клетки
59.	Клетки пуповинной крови CD133(+)	FOXM1, SOX2, MYC, SALL4 и STAT6	Нейрональные клетки
60.	Гепатоциты	Suz12, Ezh2, Meis1, Sry, Smarca4, Esr1, Pparg и Stat3	Нейрональные клетки
61.	Периферические CD34(+) клетки	AR, SOX2, SMAD3, MYC, JUN, WT1, TAL1, SPI1 и RUNX1	Нейральные стволовые клетки
62.	Эпителиоподобные клетки мочи	POU3F2, SOX2, BACH1, AR, PBX1 и NANOG	Нейральные стволовые клетки
63.	Глиальные клетки Мюллера	Bmi1, Spi1, Lmo2 и Cebpd	Нейральные стволовые клетки

	Столбец А	Столбец В	Столбец С
Номер комбинации	Первый тип клеток	Фактор(ы) трансдифференцировки	Второй тип клеток
64.	Астроциты и фибробласты крайней плоти	Ascl1, Phox2b, Ar-2a, Gata3, Hand2, Nurr1 и Phox2a	Норадренергические нейроны
65.	Клетки костного мозга, фибробласты и кератиноциты	MSI1, NGN2 и MBD2	Клетки-предшественники нейронов
66.	Клетки микроглии	Neurod1	Нейрональные клетки
67.	Фибробласты сердца	Gata4, Mef2c и Tbx5	Кардиомиоциты
68.	Фибробласты сердца	Gata4, Mef2c, Tbx5 и Hand2	Кардиомиоциты
69.	Фибробласты сердца и эмбриональные фибробласты	Mef2c и Tbx5 + Myocd или Gata4	Кардиомиоциты
70.	Фибробласты сердца	GATA4, MEF2C, TBX5, MESP1 и MYOCD	Кардиомиоциты
71.	Фибробласты из эмбриональных стволовых клеток	GATA4, MEF2C, TBX5, ESRRG, MESP1, ZFPM2 и MYOCD	Кардиомиоциты
72.	Фибробласты взрослого	Gata4, Hand2, Mef2c, Tbx5 и Znf281	Кардиомиоциты
73.	Эмбриональные фибробласты и фибробласты кожи взрослого	Hnf4a и Foxa1, Foxa2 или Foxa3	Гепатоциты
74.	Каудальные фибробласты	Gata4, Hnf1a и Foxa3 + нокдаун p19 ^{Arf}	Гепатоциты
75.	Фибробласты плода и взрослого мезенхимные стволовые клетки жировой ткани	FOXA3, HNF1A и HNF4A + большой Т антиген SV40	Гепатоциты
76.	Фибробласты (клетки BJ и MRC-5) Гепатоциты)	HNF1A и любые два из трех факторов: FOXA1, FOXA3 и HNF4A	Гепатоциты
77.	Клетки печени в моделях хронических заболеваний печени у мышей	Foxa3, Gata4, Hnf1a и Hnf4a	Гепатоциты
78.	Фибробласты легкого плода	ATF5, PROX1, FOXA2, FOXA3 и HNF4A	Гепатоциты

	Столбец А	Столбец В	Столбец С
Номер комбинации	Первый тип клеток	Фактор(ы) трансдифференцировки	Второй тип клеток
79.	Фибробласты	OCT4, FOXA2, HNF1A и GATA3	Гепатоциты
80.	Эмбриональные фибробласты	Foxa3, Hnf1a и Gata4	Гепатоциты
81.	Эмбриональные фибробласты	Hnf4a, Foxa3, Klf4 и c-Мус	Гепатоциты
82.	Клетки печени <i>in vivo</i>	Pdx1	β клетки
83.	Экзокринные клетки поджелудочной железы <i>in vivo</i>	Ngn3, Pdx1 и Mafa	β клетки
84.	Гепатоциты	Ngn3	Островковые клетки
85.	Клетки печени	PDX1, PAX4 и MAFA	β клетки
86.	Культивируемые клетки протоков поджелудочной железы взрослого	Pdx1, Ngn3 и Mafa	β клетки
87.	Клетки желчного пузыря	Pdx1, Ngn, Mafa и Pax6	β клетки
88.	Предшественники Т клеток	Cebpa или Cebpb	Макрофаги
89.	Предшественники Т клеток	Pu.1	Дендритные клетки
90.	В клетки	Нокаут Pax5	Т клетки
91.	Фибробласты (клетки 3Т3), эмбриональные фибробласты и фибробласты кожи взрослого	Pu.1 и Cebpa или Cebpb	Макрофаго-подобные клетки
92.	В клетки	Gata1, Scl и Cebpa	Эритроидные клетки
93.	Фибробласты (клетки 3Т3) и фибробласты кожи взрослого	Nfe2, Mafg и Mafk	Мегакариоцит
94.	Фибробласты кожи	Spl1, Cebpa, Mnda и Irf8	Моноциты
95.	Эмбриональные фибробласты и фибробласты кожи уха взрослого	Erg, Gata2, Lmo2, Runx1c и Scl	Гемопоэтические клетки-предшественники

	Столбец А	Столбец В	Столбец С
Номер комбинации	Первый тип клеток	Фактор(ы) трансдифференцировки	Второй тип клеток
96.	Фибробласты	Pu. 1, Irf8 и Batf3	Антигенпрезентирующие дендритные клетки
97.	Фибробласты крайней плоти новорожденного	c-MYC, KLF4 и SOX9	Хондрогенные клетки
98.	Фибробласты кожи	OCT3/4 и OCT6 или OCT9 + L-MYC, c-MYC, или N-MYC	Остеобласты
99.	Фибробласты	RUNX2, OCT4, OSTERIX и L-MYC	Остеобласты
100.	Фибробласты десны и фибробласты кожи взрослого	OCT4, OSTERIX и L-MYC	Остеобласты
101.	Эмбриональные фибробласты	c-Myc, Oct4 и hLMP3	Остеобласты
102.	Фибробласты (клетки C3H10T1/2)	Myod	Миобласты
103.	Фибробласты кожи	MYOD1 и MYCL	Миобласты
104.	Эмбриональные фибробласты	Mef2b и Pitx1 + Pax3 или Pax7	Клетки-предшественники скелетных мышц
105.	Фибробласты взрослого	Pax7, Mef2b и Myod	Клетки-предшественники скелетных мышц
106.	Эмбриональные фибробласты и фибробласты крайней плоти новорожденного	Prdm16 и Cebpb	Клетки бурого жира
107.	Эмбриональные фибробласты	Nr5a1, Wt1, Dmrt1, Gata4 и Sox9	Клетки Сертоли
108.	Клетки из радужной оболочки	CRX, RAX и NEUROD	Фоторецепторные клетки
109.	Эмбриональные фибробласты и фибробласты кожи кончика хвоста взрослого	Mitf, Sox10 и Pax3	Меланоциты
110.	Стромальные клетки жировой ткани	SOX18	Эндотелиальные клетки
111.	Фибробласты кожи	CRX, RAX, OTX2 и NEUROD	Фоторецепторные клетки
112.	Эмбриональные фибробласты	Foxn1	Эпителиальные клетки тимуса

	Столбец А	Столбец В	Столбец С
Номер комбинации	Первый тип клеток	Фактор(ы) трансдифференцировки	Второй тип клеток
113.	Фибробласты	NF-κB и LEF-1	Клетки потовых желез
114.	Стволовые клетки амниотической жидкости	OCT4	Плюрипотентные стволовые клетки
115.	Мезенхимные клетки-предшественники сердца	Klf4 и c-Мyc	Адипоциты
116.	Эмбриональные фибробласты, фибробласты кожи кончика хвоста взрослого, постнатальные фибробласты крайней плоти и фибробласты кожи плода	Emx2, Hnf1b, Hnf4a и Pax8	Эпителиальные клетки почечных канальцев
117.	Эндотелиальные клетки-предшественники	MYOCD	Гладкомышечные клетки
118.	Эмбриональные стволовые клетки	Cdx2, Arid3a и Gata3	Стволовые клетки трофобласта
119.	Эмбриональные фибробласты и фибробласты кожи кончика хвоста взрослого	Dmrt1, Gata4 и Nr5a1	Клетки Лейдига
120.	Постнатальные фибробласты кожи	ER71/ETV2 (ETS variant 2)	Эндотелиальные клетки
121.	Фибробласты кожи	PPARG2	Адипоциты
122.	Эмбриональные фибробласты и эндотелиальные клетки пуповинной вены	Hnf4a, Foxa3, Gata6 и Cdx2	Клетки-предшественники кишечника
123.	Эмбриональные фибробласты и фибробласты кожи взрослого	Myocd, Gata6 и Mef2c	Гладкомышечные клетки
124.	Эпидермальные клетки	Foxc1	Клетки потовых желез
125.	Эпителиальные клетки проксимальных	SNAI2, EYA1 и SIX1	Клетки-предшественники нефрона

	Столбец А	Столбец В	Столбец С
Номер комбинации	Первый тип клеток	Фактор(ы) трансдифференцировки	Второй тип клеток
	почечных канальцев (НК2)		
126.	Фибробласты (клетки BJ и MRC-5)	HNF1A и Any two of the three factors: FOXA1, FOXA3 и HNF4A	Гепатоциты
127.	Несенсорные эпителиальные клетки улитки уха	Ascl1; Ascl1 и Neurod	Нейрональные клетки
128.	Фибробласты сердца	Gata4, Mef2c и Tbx5	Кардиомиоциты
129.	Астроциты	Sox2	Нейральные стволовые клетки
130.	Зародышевые и эмбриональные фибробласты и клетки мозга <i>in vivo</i>	Ascl1, Brn2 и Myt1l	Нейрональные клетки
131.	Мононуклеарные клетки периферической крови	CRX, RAX1 и NEUROD1	Фоторецепторные клетки
132.	Фибробласты десен и фибробласты кожи взрослого	OCT4, OSTERIX и L-MYC	Остеобласты
133.	Фибробласты	OCT4, FOXA2, HNF1A и GATA3	Гепатоциты
134.	Фибробласты	SOX2, GATA3 и NEUROD1	Нейроциты
135.	Фибробласты (клетки 3T6)	Ascl1, Brn2 и Foxa1	Нейрональные клетки
136.	Мезенхимные стволовые клетки	Hnf4a и Foxa3	Гепатоциты
137.	Фибробласты кожи	ETV2	Эндотелиальные клетки-предшественники
138.	Фибробласты (клетки 3T6)	Ascl1, Brn4 и Tcf3	Нейрональные клетки
139.	Мезенхимные стволовые клетки и фибробласты кожи	SOX2	Нейральные стволовые клетки
140.	Фибробласты взрослого	SOX2; SOX2 и PAX6; SOX2 и LMX1A; SOX2, LMX1A и FOXA2	Клетки-предшественники нейронов
141.	Фибробласты кожи	SOX2 и PAX6	Клетки-предшественники нейронов

	Столбец А	Столбец В	Столбец С
Номер комбинации	Первый тип клеток	Фактор(ы) трансдифференцировки	Второй тип клеток
142.	Эмбриональные фибробласты	Hnf4a и Foxa3	Гепатоциты
143.	Фибробласты крайней плоти	ASCL1 + miR-124 + P53 knock-down	Нейрональные клетки
144.	Клетки костного мозга, фибробласты и кератиноциты	MSI1, NGN2 и MBD2	Клетки-предшественники нейронов
145.	Эпителиальные клетки проксимальных почечных канальцев (HK2)	SNAI2, EYA1 и SIX1	Клетки-предшественники нефрона
146.	Фибробласты сердца	miR-1, miR-133, miR-208 и miR-499	Кардиомиоциты
147.	Фибробласты сердца и эмбриональные фибробласты	Gata4, Mef2c и Tbx5 + miR-133; Gata4, Mef2c, Tbx5, Mesp1 и Myocd + miR-133	Кардиомиоциты
148.	Фибробласты	GATA4, MEF2C, TBX5, ESRRG, MESP1, MYOCARDIN, ZFPM2 и HAND2 + miR-1	Кардиомиоциты
149.	Фибробласты взрослого	miR-9/9* и miR-124	Нейрональные клетки
150.	Фибробласты взрослого	ISL1 и LHX3 + miR-9/9* и miR-124	Двигательные нейроны спинного мозга
151.	Перициты сосудов мозга	ASCL1, MYT1L, BRN2 и TLX3 + miR-124	Холинергические нейрональные клетки

[198] Приведение клетки в контакт можно осуществлять любым из способов, описанных выше (например, трансфекцией, электропорацией и/или применением комплексов circRNA-LNP).

[199] В некоторых воплощениях клетки приводят в контакт с кольцевой РНК однократно. В некоторых воплощениях клетки приводят в контакт с кольцевой РНК более чем один раз, например 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 раз. В некоторых воплощениях приведение в контакт осуществляют с эффективными интервалами. Эффективные интервалы могут, например, представлять собой один раз в сутки, через сутки, раз в трое суток, раз в неделю, раз в две недели или раз в месяц.

[200] Как объяснено выше, способы непосредственного превращения клетки из

клетки первого типа в клетку второго типа могут включать поддержание клетки в условиях, при которых клетка превращается в клетку второго типа. Такие условия известны специалистам в области техники и могут варьировать в зависимости от типа клетки. В качестве одного примера, после того, как клетки привели в контакт с одной или более кольцевыми РНК, их можно культивировать в стандартной среде, возможно с добавлением различных факторов перепрограммирования. У клеток отслеживают морфологию и наличие маркеров, характерных для клеток второго типа.

[201] В данном документе также предложены трансдифференцированные клетки, полученные способами, описанными в данном документе.

[202] В данном документе также предложены композиции, содержащие трансдифференцированную клетку, где трансдифференцированная клетка содержит одну или более экзогенных кольцевых РНК, кодирующих фактор трансдифференцировки. В некоторых воплощениях фактор трансдифференцировки представляет собой любой из факторов трансдифференцировки или комбинаций факторов трансдифференцировки, указанных в Таблице 6. В некоторых воплощениях трансдифференцированная клетка представляет собой любую из клеток второго типа, указанных в Таблице 6. В некоторых воплощениях трансдифференцированная клетка имеет происхождение от клетки первого типа, представляющей собой любую из клеток первого типа, указанных в Таблице 6.

Дифференцировка iPSC с применением кольцевых РНК

[203] Также предложены iPSC, полученные способами, описанными в данном документе. В некоторых воплощениях iPSC экспрессируют один или более из Oct4, SOX2, Lin 28, SSEA4, SSEA3, TRA-1-81, TRA-1-60, CD9, Nanog, Fbx15, Ecatl, Esgl, Eras, Gdf3, Fgf4, Cripto, Daxl, Zpf296, Slc2a3, Rex1, Utl1 и Nat1.

[204] Также предложена дифференцированная клетка, имеющая происхождение от iPSC, полученная с применением способов, изложенных в данном документе. Способы дифференцировки iPSC хорошо известны специалистам в области техники. В некоторых воплощениях дифференцированная клетка представляет собой мышечную клетку, нейрон, кардиомиоцит, гепатоцит, островковую клетку, кератиноцит, Т-клетку или НК-клетку.

[205] В некоторых воплощениях iPSC, описанные в данном документе (или iPSC, полученные способом, который здесь не описан), могут дифференцироваться при приведении iPSC в контакт с одной или более кольцевыми РНК, кодирующими фактор

дифференцировки. Например, в некоторых воплощениях iPSC приводят в контакт с кольцевой РНК или кодирующей ее молекулой ДНК, кодирующей фактор дифференцировки, способный дифференцировать iPSC в тип клеток, представляющих интерес, такие как Т-клетки. В некоторых воплощениях фактор дифференцировки выбран из RORA, HLF, MYB, KLF4, ERG, SOX4, LUC, HOXA9, HOXA10 и HOXA5. В некоторых воплощениях iPSC приводят в контакт с по меньшей мере одной, по меньшей мере двумя, по меньшей мере тремя, по меньшей мере четырьмя, по меньшей мере пятью, по меньшей мере шестью, по меньшей мере семью, по меньшей мере восемью, по меньшей мере девятью или по меньшей мере десятью или по меньшей мере одиннадцатью кольцевыми РНК, где каждая кольцевая РНК кодирует фактор дифференцировки, выбранный из RORA, HLF, MYB, KLF4, ERG, SOX4, LUC, HOXA9, HOXA10 и HOXA5. В некоторых воплощениях iPSC приводят в контакт с по меньшей мере одной, по меньшей мере двумя, по меньшей мере тремя, по меньшей мере четырьмя, по меньшей мере пятью кольцевыми РНК, где каждая кольцевая РНК кодирует фактор дифференцировки, выбранный из HOXA9, ERG, RORA, SOX4 или MYB. В некоторых воплощениях iPSC приводят в контакт с множеством кольцевых РНК, где каждая кольцевая РНК кодирует по меньшей мере один из HOXA9, ERG, RORA, SOX4 или MYB. В некоторых воплощениях iPSC приводят в контакт с по меньшей мере одной кольцевой РНК, где circRNA кодирует один или более факторов трансдифференцировки, указанных в Таблице 6. В некоторых воплощениях iPSC дополнительно приводят в контакт с shRNA (малая шпилечная РНК) EZH1. Экспрессия shRNA EZH1 может облегчать переключение из линии, ограниченной гематopoэтическими предшественниками, на предшественники с мульти-лимфоидным потенциалом.

[206] В некоторых воплощениях iPSC дифференцируются в CD34+CD38- клетку. В некоторых воплощениях приведение iPSC в контакт с одной или более кольцевыми РНК, кодирующими один или более из следующих факторов дифференцировки, дифференцирует iPSC в CD34+CD38- клетку: RORA, HLF, MYB, KLF4, ERG, SOX4, LUC, HOXA9, HOXA10 или HOXA5.

[207] В некоторых воплощениях CD34+CD45+ миелоидную клетку-предшественника приводят в контакт с кольцевой РНК или кодирующей ее молекулой ДНК, которая кодирует один или более из RORA, HLF, MYB, KLF4, ERG, SOX4, LUC, HOXA9, HOXA10 или HOXA5. В некоторых воплощениях CD34+CD45+ миелоидную клетку-

предшественника приводят в контакт с кольцевой РНК или кодирующей ее молекулой ДНК, которая кодирует один или более из HOXA9, ERG, RORA, SOX4 или MYB. В некоторых воплощениях приведение iPSC в контакт с одной или более кольцевыми РНК, как описано выше, дифференцирует CD34+CD45+ клетку в CD34+CD38- клетку. В некоторых воплощениях клетки, полученные после приведения в контакт, представляют собой самообновляющиеся HSPC (гемопоезические стволовые клетки и клетки-предшественники) с эритроидным и лимфоидным потенциалом.

[208] В некоторых воплощениях iPSC, полученные с применением способов, описанных в данном документе, являются более молодыми по сравнению с iPSC, полученными с применением традиционных способов, таких как применение вирусного вектора, кодирующего фактор перепрограммирования или трансфекцию линейной РНК, кодирующей фактор перепрограммирования. В данном описании «более молодые» относится к тому факту, что клетка перепрограммируется быстрее (то есть в течение приблизительно 5, приблизительно 6, приблизительно 7 или приблизительно 8 суток после трансфекции) по сравнению с традиционными способами (то есть приблизительно 9 суток или более).

[209] В некоторых воплощениях iPSC экспрессирует различные уровни одного или более биомаркеров по сравнению с iPSC, полученными с применением традиционных способов. Например, в некоторых воплощениях iPSC экспрессирует низкие уровни маркеров, связанных с клеточным стрессом и/или клеточной гибелью (апоптозом) по сравнению с iPSC, полученными с применением традиционных способов. Например, в некоторых воплощениях iPSC экспрессирует более низкие уровни одного или более белков теплового шока или каспаз.

[210] В некоторых воплощениях геном iPSC имеет различные эпигенетические модификации по сравнению с iPSC, полученными с применением традиционных способов. Например, в некоторых воплощениях iPSC может иметь измененные уровни метилирования ДНК и/или модификации гистонов.

[211] В некоторых воплощениях Т-клетку приводят в контакт с одной или более кольцевыми РНК (или кодирующими их молекулами ДНК), которые кодируют факторы, которые могут улучшать эффективность Т-клетки. В данном контексте улучшение эффективности относится к улучшению выживания Т-клетки и/или ее противоопухолевой активности при применении в иммуно-онкологии. Например, Т-клетку можно приводить в контакт с одной или более кольцевыми РНК, которые

кодируют IL-12, IL-18, IL-15 или IL-7.

[212] В некоторых воплощениях Т-клетку приводят в контакт с одной или более кольцевыми РНК (или кодирующими их молекулами ДНК), которые улучшают способность Т-клетки к хоумингу в опухолевую ткань. Например, Т-клетку можно приводить в контакт с одной или более кольцевыми РНК, которые кодируют CXCR2, CCR2B или гепараназу.

[213] В некоторых воплощениях Т-клетку приводят в контакт с одной или более кольцевыми РНК (или кодирующими их молекулами ДНК), которые способствуют улучшению выживаемости и/или способствуют переключению на фенотип центральной клетки памяти. Например, Т-клетку можно приводить в контакт с одной или более кольцевыми РНК, которые кодируют Suv39h1.

Комбинированные способы перепрограммирования и редактирования генома клетки

[214] Благодаря комбинированию способов получения iPSC со способами редактирования их генома диагностическая и терапевтическая сила iPSC повышается. В данном описании термины «редактирование генома» относятся к модификации специфического локуса нуклеиновой кислоты (например, ДНК или РНК) клетки. Редактирование генома может скорректировать вызванные патологией генетические мутации, произошедшие у пациентов с заболеванием, и аналогично, можно применять для индуцирования специфических мутаций в не затронутых заболеванием клетках дикого типа (таких как iPSC). Соответственно, в настоящем изобретении предложены комбинированные способы перепрограммирования и редактирования генома клетки. В некоторых воплощениях описанные здесь кольцевые РНК можно применять в способах перепрограммирования и редактирования генома клетки.

[215] Редактирование генома может включать, например, индуцирование двуцепочечных разрывов ДНК в области модификации гена. В некоторых воплощениях локус ДНК заменен экзогенной последовательностью, вводимой направленным вектором. Для редактирования генома клетки можно применять любой из следующих ферментов: нуклеаза с цинковыми пальцами, хоуминг-эндонуклеаза, TALEN (эффекторная нуклеаза, подобная активаторам транскрипции), NgAgo (эндонуклеаза argonaute), SGN (эндонуклеаза, направляемая структурой), RGN (РНК-направляемая эндонуклеаза) или их модифицированные или укороченные варианты. В некоторых воплощениях РНК-направляемая нуклеаза представляет собой РНК-направляемую

нуклеазу, раскрытую в любом из документов WO 2019/236566 (например, РНК-направляемые нуклеазы APG05083.1, APG07433.1, APG07513.1, APG08290.1, APG05459.1, APG04583.1 и APG1688.1), WO 2021/030344 (например, РНК-направляемые нуклеазы APG05733.1, APG06207.1, APG01647.1, APG08032.1, APG05712.1, APG01658.1, APG06498.1, APG09106.1, APG09882.1, APG02675.1, APG01405.1, APG06250.1, APG06877.1, APG09053.1, APG04293.1, APG01308.1, APG06646.1, APG09748 и APG07433.1) и WO 2020/139783 (РНК-направляемые нуклеазы APG00969, APG03128, APG09748, APG00771, APG02789, APG09106, APG02312, APG07386, APG09980, APG05840, APG05241, APG07280, APG09866, APG00868), каждый из которых включен во всей полноте посредством ссылки. В некоторых воплощениях РНК-направляемая нуклеаза представляет собой нуклеазу Cas9, нуклеазу Cas12(a) (Cpf1), нуклеазу Cas12b, нуклеазу Cas12c, TnpB-подобную нуклеазу, нуклеазу Cas13a (C2c2), нуклеазу Cas13b, нуклеазу Cas 14 или их модифицированные или укороченные варианты.

[216] В некоторых воплощениях для редактирования генома клетки применяется нуклеаза Cas9. Cas9 представляет собой крупный многофункциональный белок, имеющий два потенциальных нуклеазных домена, HNH и RuvC-подобный. HNH и RuvC-подобный домены расщепляют комплементарную 20-нуклеотидную последовательность crRNA и цепь ДНК напротив комплементарной цепи, соответственно. Существует несколько вариантов системы CRISPR-Cas9, и каждый из этих вариантов можно применять в способах, раскрытых в данном документе: (1) исходная система CRISPR-Cas9 функционирует путем индуцирования двуцепочечных разрывов ДНК, которые вызываются нуклеазой дикого типа Cas9, направляемой единой РНК. (2) вариант никазы Cas9(мутант D10A), образующийся в результате мутации HNH или RuvC-подобного домена Cas9 направляется спаренными направляющими РНК. (3) модифицированный вариант нуклеазы Cas9 с усиленной специфичностью (eSpCas9). (4) каталитически выключенный вариант Cas9 (dCas9) образуется путем мутирования обоих доменов (HNH и RuvC-подобного). При слиянии с суппрессором или активатором транскрипции dCas9 можно применять для модификации транскрипции эндогенных генов (CRISPRa или CRISPRi) или при слиянии с флуоресцентным белком можно применять для визуализации геномных локусов. (5) слияние CRISPR-Cas9 с цитидиндезаминазой дает вариант, который индуцирует непосредственное превращение цитидина в уридин, таким образом избегая двуцепочечный разрыв ДНК. В некоторых воплощениях нуклеаза Cas9

выделена или имеет происхождение из *S. pyogenes* или *S. aureus*.

[217] Для Cas9 требуется направляющая последовательность РНК («направляющая РНК» или «gRNA»), нацеленная на конкретный локус. В некоторых воплощениях gRNA представляет собой единую направляющую РНК. sgRNA может содержать спейсерную последовательность и каркасную последовательность. Спейсерная последовательность комплементарна целевой расщепляемой последовательности и направляет фермент к ней. Каркасная область связывается с ферментом Cas9.

[218] Примеры ферментов, которые применяются для редактирования РНК клетки, включают, без ограничения, ферменты семейства ADAR (аденозин-дезаминазы, действующей на РНК). Например, фермент может быть человеческим ADAR1, ADAR2 или ADAR3, или его модифицированным или укороченным вариантом. В некоторых воплощениях фермент может представлять собой ADAR кальмара (например, *Loligo pealeii*), такой как sqADAR2 или его модифицированный или укороченный вариант. В некоторых воплощениях фермент может представлять собой ADAR *C. elegans* (например, seADAR1 или seADAR2) или *D. melanogaster* (например, dADAR) или их модифицированный или укороченный вариант.

[219] В некоторых воплощениях способ перепрограммирования и редактирования генома клетки включает приведение клетки в контакт с: (1) рекомбинантной кольцевой РНК, содержащей последовательность, кодирующую белок, где последовательность, кодирующая белок, кодирует по меньшей мере один фактор перепрограммирования, и (2) ферментом, способным редактировать ДНК или РНК клетки.

[220] В некоторых воплощениях способ перепрограммирования и редактирования генома клетки включает приведение клетки в контакт с: (1) рекомбинантной кольцевой РНК, содержащей последовательность, кодирующую белок, где последовательность, кодирующая белок, кодирует по меньшей мере один фактор перепрограммирования, и (2) нуклеиновой кислотой, кодирующий фермент, способный редактировать ДНК или РНК клетки.

[221] В некоторых воплощениях клетку приводят в контакт с рекомбинантной кольцевой РНК перед приведением ее в контакт с ферментом или кодирующей его нуклеиновой кислотой. В некоторых воплощениях клетку приводят в контакт с рекомбинантной кольцевой РНК после приведения ее в контакт с ферментом или кодирующей его нуклеиновой кислотой. В некоторых воплощениях клетку приводят в контакт с рекомбинантной кольцевой РНК приблизительно в то же время, когда ее

приводят в контакт с ферментом или кодирующей его нуклеиновой кислотой.

[222] В некоторых воплощениях способы перепрограммирования и редактирования генома клетки дополнительно включают приведение клетки в контакт с нуклеиновой кислотой, кодирующей направляющую РНК, или с направляющей РНК.

[223] Композиция для перепрограммирования и редактирования генома клетки может включать, например, рекомбинантную кольцевую РНК (или кодирующую ее молекулу ДНК) и фермент, способный редактировать ДНК или РНК (или кодирующую его молекулу ДНК или РНК). В некоторых воплощениях рекомбинантная кольцевая РНК содержит кодирующую белок последовательность. В некоторых воплощениях кольцевая РНК не кодирует белок. В некоторых воплощениях кольцевая РНК представляет собой circBIRC6 (SEQ ID NO: 13), circCORO1C (SEQ ID NO: 14) или circMAN1A2 (SEQ ID NO: 15).

Комбинированные способы трансдифференцировки и редактирования генома клетки

[224] В некоторых воплощениях описанные здесь кольцевые РНК можно также применять в способах трансдифференцировки и редактирования генома клетки. Соответственно, в данном документе предложены композиции и способы трансдифференцировки и редактирования генома клетки.

[225] В некоторых воплощениях способ трансдифференцировки и редактирования генома клетки включает приведение клетки в контакт с: (1) рекомбинантной кольцевой РНК, содержащей последовательность, кодирующую белок, где последовательность, кодирующая белок, кодирует по меньшей мере один фактор трансдифференцировки, и (2) ферментом, способным редактировать ДНК или РНК клетки. В некоторых воплощениях фактор трансдифференцировки выбран из любых, указанных в Таблице 6.

[226] В некоторых воплощениях способ трансдифференцировки и редактирования генома клетки включает приведение клетки в контакт с: (1) рекомбинантной кольцевой РНК, содержащей последовательность, кодирующую белок, где последовательность, кодирующая белок, кодирует по меньшей мере один фактор трансдифференцировки, и (2) нуклеиновой кислотой, кодирующей фермент, способный редактировать ДНК или РНК клетки.

[227] Ферменты, используемые для редактирования ДНК или РНК в способе трансдифференцировки и редактирования генома клетки, могут представлять собой любой из ферментов, указанных выше.

[228] В некоторых воплощениях клетку приводят в контакт с рекомбинантной кольцевой РНК перед приведением ее в контакт с ферментом или кодирующей его нуклеиновой кислотой. В некоторых воплощениях клетку приводят в контакт с рекомбинантной кольцевой РНК после приведения ее в контакт с ферментом или кодирующей его нуклеиновой кислотой. В некоторых воплощениях клетку приводят в контакт с рекомбинантной кольцевой РНК приблизительно в то же время, когда ее приводят в контакт с ферментом или кодирующей его нуклеиновой кислотой.

[229] В некоторых воплощениях способы трансдифференцировки и редактирования генома клетки дополнительно включают приведение клетки в контакт с нуклеиновой кислотой, кодирующей направляющую РНК, или с направляющей РНК.

[230] Композиция для трансдифференцировки и редактирования генома клетки может включать, например, рекомбинантную кольцевую РНК (или кодирующую ее молекулу ДНК) и фермент, способный редактировать ДНК или РНК (или кодирующую его молекулу ДНК или РНК). В некоторых воплощениях рекомбинантная кольцевая РНК содержит кодирующую белок последовательность. В некоторых воплощениях кольцевая РНК не кодирует белок. В некоторых воплощениях кольцевая РНК представляет собой *circBIRC6* (SEQ ID NO: 13), *circCORO1C* (SEQ ID NO: 14) или *circMAN1A2* (SEQ ID NO: 15). В некоторых воплощениях кольцевая РНК кодирует фактор перепрограммирования, раскрытый в данном документе. В некоторых воплощениях кольцевая РНК кодирует один или более Oct3/4, Klf4, Sox2, Nanog, Lin28, c-Myc и L-Myc. В некоторых воплощениях кольцевая РНК кодирует один или более факторов трансдифференцировки, перечисленных в Таблице 6.

Дополнительные способы

[231] Как поймут специалисты в области техники, кольцевые РНК, описанные в данном документе, и связанные с ними композиции могут найти применение в одном или более следующих способов.

[232] В некоторых воплощениях предложен способ перепрограммирования клетки, в котором достигается меньшая клеточная гибель по сравнению со способом, в котором применяют линейную РНК, где способ включает приведение клетки в контакт с кольцевой РНК, комплексом, вектором или композицией, описанными в данном документе, и поддержание клетки в условиях, при которых экспрессируется белок. В некоторых воплощениях клеточная гибель, индуцированная перепрограммированием, снижена по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%,

по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 100%, по меньшей мере на 200%, по меньшей мере на 500% или более по сравнению со способом перепрограммирования, в котором применяют линейную РНК. В некоторых воплощениях клетку приводят в контакт с комбинацией кольцевых РНК, где комбинация кольцевых РНК выбрана из: (1) *circOct3/4*, *circKlf4*, *circSox2*, *circNanog*, *circLin28* и *circ c-Myc*; (2) *circOct3/4*, *circKlf4*, *circSox2*, *circNanog* и *circLin28*; (3) *circOct3/4*, *circKlf4*, *circSox2*, *circNanog*, *circLin28* и *circL-Myc*; (4) *circOct3/4*, *circKlf4*, *circSox2*, *circNanog* и *circLin28* (5) *circOct3/4*, *circKlf4*, *circSox2* и *circC-Myc*; (6) *circOct3/4*, *circKlf4*, *circSox2* и *circL-Myc*; или (7) *circOct3/4*, *circKlf4* и *circSox2*. В некоторых воплощениях клетку приводят в контакт с *circMyoD*.

[233] Также предложен способ сокращения времени от перепрограммирования до сбора, включающий приведение клетки в контакт с кольцевой РНК, комплексом, вектором или композицией, описанными в данном документе, и поддержание клетки в условиях, при которых экспрессируется белок, где время от перепрограммирования до сбора сокращается по сравнению со способом перепрограммирования, в котором применяют линейную РНК. В данном описании термин «сбор» относится к отбору вручную колоний iPSC посредством механической диссоциации. В некоторых воплощениях время сокращается по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 100%, по меньшей мере на 200%, по меньшей мере на 500% или более по сравнению со способом перепрограммирования, в котором применяют линейную РНК. В некоторых воплощениях клетку приводят в контакт с комбинацией кольцевых РНК, где комбинация кольцевых РНК выбрана из: (1) *circOct3/4*, *circKlf4*, *circSox2*, *circNanog*, *circLin28* и *circ c-Myc*; (2) *circOct3/4*, *circKlf4*, *circSox2*, *circNanog* и *circLin28*; (3) *circOct3/4*, *circKlf4*, *circSox2*, *circNanog*, *circLin28* и *circL-Myc*; (4) *circOct3/4*, *circKlf4*, *circSox2*, *circNanog* и *circLin28* (5) *circOct3/4*, *circKlf4*, *circSox2* и *circC-Myc*; (6) *circOct3/4*, *circKlf4*, *circSox2* и *circL-Myc*; или (7) *circOct3/4*, *circKlf4* и *circSox2*. В некоторых воплощениях клетку приводят в контакт с *circMyoD*.

[234] Также предложен способ сокращения числа трансфекций для индуцирования эффекта перепрограммирования клетки, способ включает приведение клетки в контакт с кольцевой РНК, комплексом, вектором или композицией, описанными в данном

документе, и поддержание клетки в условиях, при которых экспрессируется белок. В некоторых воплощениях количество трансфекций сокращается по сравнению со способом, в котором применяют линейную РНК. В некоторых воплощениях количество трансфекций для индуцирования перепрограммирования клетки составляет 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7. В некоторых воплощениях количество трансфекций сокращается по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 100%, по меньшей мере на 200%, по меньшей мере на 500% или более по сравнению со способом, в котором применяют линейную РНК. В некоторых воплощениях клетку приводят в контакт с комбинацией кольцевых РНК, где комбинация кольцевых РНК выбрана из: (1) *circOct3/4*, *circKlf4*, *circSox2*, *circNanog*, *circLin28* и *circ c-Myc*; (2) *circOct3/4*, *circKlf4*, *circSox2*, *circNanog* и *circLin28*; (3) *circOct3/4*, *circKlf4*, *circSox2*, *circNanog*, *circLin28* и *circL-Myc*; (4) *circOct3/4*, *circKlf4*, *circSox2*, *circNanog* и *circLin28* (5) *circOct3/4*, *circKlf4*, *circSox2* и *circC-Myc*; (6) *circOct3/4*, *circKlf4*, *circSox2* и *circL-Myc*; или (7) *circOct3/4*, *circKlf4* и *circSox2*. В некоторых воплощениях клетку приводят в контакт с *circMyoD*.

[235] Также предложен способ увеличения длительности экспрессии белка в клетке, включающий приведение клетки в контакт с кольцевой РНК, комплексом, вектором или композицией, описанными в данном документе, и поддержание клетки в условиях, при которых экспрессируется белок. В некоторых воплощениях длительность экспрессии белка увеличивается по сравнению со способом, включающим трансфекцию клетки линейной РНК, кодирующей тот же самый белок. В некоторых воплощениях длительность экспрессии белка увеличивается по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 100%, по меньшей мере на 200%, по меньшей мере на 500% или более по сравнению со способом, включающим трансфекцию клетки линейной РНК, кодирующей тот же самый белок. В некоторых воплощениях длительность экспрессии белка увеличивается по меньшей мере на 1 час, по меньшей мере на 8 часов, по меньшей мере на 12 часов, по меньшей мере на 1 сутки, по меньшей мере на 2 суток, по меньшей мере на 3 суток, по меньшей мере на 4 суток, по меньшей мере на 5 суток, по меньшей мере на 6 суток, по меньшей мере на 1 неделю, по меньшей мере на 2 недели, по меньшей мере на 3 недели или более по сравнению со способом,

включающим трансфекцию клетки линейной РНК, кодирующей тот же самый белок. В некоторых воплощениях клетку приводят в контакт с комбинацией кольцевых РНК, где комбинация кольцевых РНК выбрана из: (1) *circOct3/4*, *circKlf4*, *circSox2*, *circNanog*, *circLin28* и *circ c-Myc*; (2) *circOct3/4*, *circKlf4*, *circSox2*, *circNanog* и *circLin28*; (3) *circOct3/4*, *circKlf4*, *circSox2*, *circNanog*, *circLin28* и *circL-Myc*; (4) *circOct3/4*, *circKlf4*, *circSox2*, *circNanog* и *circLin28* (5) *circOct3/4*, *circKlf4*, *circSox2* и *circC-Myc*; (6) *circOct3/4*, *circKlf4*, *circSox2* и *circL-Myc*; или (7) *circOct3/4*, *circKlf4* и *circSox2*. В некоторых воплощениях клетку приводят в контакт с *circMyoD*.

[236] Также предложен способ улучшения эффективности перепрограммирования клетки, включающий приведение клетки в контакт с кольцевой РНК, комплексом, вектором или композицией, описанными в данном документе, и поддержание клетки в условиях, при которых экспрессируется белок, где эффективность перепрограммирования клетки увеличивается по сравнению со способом перепрограммирования, в котором применяют линейную РНК. В некоторых воплощениях эффективность перепрограммирования клетки увеличивается по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 100%, по меньшей мере на 200%, по меньшей мере на 500% или более по сравнению со способом, в котором применяют линейную РНК. Усиленная эффективность перепрограммирования клетки может наблюдаться на основе количественной и/или количественной оценки, включая, без ограничения, уменьшение клеточной гибели, уменьшение стресса, вызванного иммунным ответом, по результатам секреции IFN-гамма, пониженное индуцирование генов в ответ на стресс. В некоторых воплощениях клетку приводят в контакт с комбинацией кольцевых РНК, где комбинация кольцевых РНК выбрана из: (1) *circOct3/4*, *circKlf4*, *circSox2*, *circNanog*, *circLin28* и *circ c-Myc*; (2) *circOct3/4*, *circKlf4*, *circSox2*, *circNanog* и *circLin28*; (3) *circOct3/4*, *circKlf4*, *circSox2*, *circNanog*, *circLin28* и *circL-Myc*; (4) *circOct3/4*, *circKlf4*, *circSox2*, *circNanog* и *circLin28* (5) *circOct3/4*, *circKlf4*, *circSox2* и *circC-Myc*; (6) *circOct3/4*, *circKlf4*, *circSox2* и *circL-Myc*; или (7) *circOct3/4*, *circKlf4* и *circSox2*. В некоторых воплощениях клетку приводят в контакт с *circMyoD*.

[237] В данном документе также предложен способ увеличения числа колоний перепрограммированной клетки, образующихся после перепрограммирования, включающий приведение клетки в контакт с кольцевой РНК, комплексом, вектором или

композицией и поддержание клетки в условиях, при которых экспрессируется белок, где число колоний перепрограммированной клетки, образующихся после перепрограммирования, увеличивается по сравнению со способом перепрограммирования клетки, в котором применяют линейную РНК. В некоторых воплощениях число колоний перепрограммированной клетки увеличивается по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 100%, по меньшей мере на 200%, по меньшей мере на 500% или более по сравнению со способом, в котором применяют линейную РНК. В некоторых воплощениях увеличенное число колоний может наблюдаться приблизительно через 7, приблизительно через 8, приблизительно через 9, приблизительно через 10, приблизительно через 11, приблизительно через 12, приблизительно через 13, приблизительно через 14, приблизительно через 15, приблизительно через 16, приблизительно через 17, приблизительно через 18, приблизительно через 19 или приблизительно через 20 суток после трансфекции одной или более *circRNA*, кодирующими фактор транскрипции. В некоторых воплощениях клетку приводят в контакт с комбинацией кольцевых РНК, где комбинация кольцевых РНК выбрана из: (1) *circOct3/4*, *circKlf4*, *circSox2*, *circNanog*, *circLin28* и *circ c-Myc*; (2) *circOct3/4*, *circKlf4*, *circSox2*, *circNanog* и *circLin28*; (3) *circOct3/4*, *circKlf4*, *circSox2*, *circNanog*, *circLin28* и *circL-Myc*; (4) *circOct3/4*, *circKlf4*, *circSox2*, *circNanog* и *circLin28* (5) *circOct3/4*, *circKlf4*, *circSox2* и *circC-Myc*; (6) *circOct3/4*, *circKlf4*, *circSox2* и *circL-Myc*; или (7) *circOct3/4*, *circKlf4* и *circSox2*. В некоторых воплощениях клетку приводят в контакт с *circMyoD*.

[238] Также предложен способ перепрограммирования клеток в суспензии, включающий приведение клетки в контакт в суспензии с кольцевой РНК, комплексом, вектором или композицией, описанными в данном документе, и поддержание клетки в условиях, при которых экспрессируется белок. В некоторых воплощениях клетки экспрессируют CD34 (то есть они являются CD34+). В некоторых воплощениях клетку приводят в контакт с комбинацией кольцевых РНК, где комбинация кольцевых РНК выбрана из: (1) *circOct3/4*, *circKlf4*, *circSox2*, *circNanog*, *circLin28* и *circ c-Myc*; (2) *circOct3/4*, *circKlf4*, *circSox2*, *circNanog* и *circLin28*; (3) *circOct3/4*, *circKlf4*, *circSox2*, *circNanog*, *circLin28* и *circL-Myc*; (4) *circOct3/4*, *circKlf4*, *circSox2*, *circNanog* и *circLin28* (5) *circOct3/4*, *circKlf4*, *circSox2* и *circC-Myc*; (6) *circOct3/4*, *circKlf4*, *circSox2* и *circL-*

Мус; или (7) *circOct3/4*, *circKlf4* и *circSox2*. В некоторых воплощениях клетку приводят в контакт с *circMyoD*.

[239] Также предложен способ улучшения морфологического созревания перепрограммированных колоний, включающий приведение клетки в контакт в суспензии с кольцевой РНК, комплексом, вектором или композицией, описанными в данном документе, и поддержание клетки в условиях, при которых экспрессируется белок, где морфологическое созревание улучшается по сравнению со способом перепрограммирования клетки, в котором применяют линейную РНК. Улучшенное морфологическое созревание может включать, например, более плотно упакованные колонии, колонии, где больше клеток имеют единообразную форму и диаметр, колонии, имеющие четко выраженную границу и клетки в колониях iPSC, имеющие высокое ядерно-цитоплазменное соотношение и/или заметное ядрышко. В некоторых воплощениях морфологическое созревание перепрограммированных колоний увеличивается по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 100%, по меньшей мере на 200%, по меньшей мере на 500% или более по сравнению со способом, в котором применяют линейную РНК. В некоторых воплощениях клетку приводят в контакт с комбинацией кольцевых РНК, где комбинация кольцевых РНК выбрана из: (1) *circOct3/4*, *circKlf4*, *circSox2*, *circNanog*, *circLin28* и *circ c-Myc*; (2) *circOct3/4*, *circKlf4*, *circSox2*, *circNanog* и *circLin28*; (3) *circOct3/4*, *circKlf4*, *circSox2*, *circNanog*, *circLin28* и *circL-Myc*; (4) *circOct3/4*, *circKlf4*, *circSox2*, *circNanog* и *circLin28* (5) *circOct3/4*, *circKlf4*, *circSox2* и *circC-Myc*; (6) *circOct3/4*, *circKlf4*, *circSox2* и *circL-Myc*; или (7) *circOct3/4*, *circKlf4* и *circSox2*. В некоторых воплощениях клетку приводят в контакт с *circMyoD*.

[240] В данном документе также предложена суспензионная культура, содержащая одну или более CD34-экспрессирующих клеток, где CD34-экспрессирующие клетки содержат одну или более *circRNA*, кодирующих фактор перепрограммирования. В некоторых воплощениях фактор перепрограммирования выбран из *Oct3/4*, *Klf4*, *Sox2*, *Nanog*, *Lin28*, *c-Myc* и/или *L-Myc*.

[241] Также предложен способ индуцирования мезенхимально-эпителиального перехода (MET) соматической клетки в iPSC, включающий приведение соматической клетки в контакт с одной или более кольцевыми РНК, кодирующими фактор

перепрограммирования.

[242] Также предложен способ индуцирования мезенхимально-эпителиального перехода (MET) соматической клетки в iPSC, включающий приведение соматической клетки в контакт с одной или более кольцевыми РНК, кодирующими фактор перепрограммирования.

Векторы, композиции и клетки

[243] В настоящем изобретении также предложены векторы, содержащие нуклеиновую кислоту (то есть молекулу ДНК), кодирующую кольцевую РНК, как описано в настоящем изобретении. В некоторых воплощениях вектор представляет собой вектор, не являющийся вектором на основе вируса, такой как плаزمид. В некоторых воплощениях вектор представляет собой вектор на основе вируса. Примеры векторов на основе вирусов включают векторы на основе ретровирусов, векторы на основе герпесвирусов, векторы на основе аденовирусов, векторы на основе аденоассоциированных вирусов (AAV), векторы на основе бакуловирусов, векторы на основе альфавирусов, векторы на основе пикорнавирусов, векторы на основе вируса осповакцины и векторы на основе лентивирусов, без ограничения ими. В некоторых воплощениях вектор на основе вируса представляет собой дефектный по репликации вектор на основе вируса. Дефектные по репликации векторы на основе вируса сохраняют свои инфекционные свойства и проникают в клетку схожим образом с реплицирующимися векторами, однако, оказавшись в клетке, дефектный по репликации вектор на основе вируса не реплицируется или не размножается.

[244] На **ФИГ. 4** приведена схема приведенных в качестве примера векторных конструкций, которые можно применять для получения кольцевых РНК, описанных в данном документе. В некоторых воплощениях нуклеиновая кислота, кодирующая кольцевую РНК, содержит последовательность, кодирующую фактор перепрограммирования, функционально связанную с IRES. В некоторых воплощениях нуклеиновая кислота, кодирующая кольцевую РНК, содержит последовательность, кодирующую фактор перепрограммирования, функционально связанную с IRES, фланкированную переставленным интроном I типа. В некоторых воплощениях нуклеиновая кислота, кодирующая кольцевую РНК, содержит промотор и последовательность, кодирующую фактор перепрограммирования, функционально связанную с IRES. В некоторых воплощениях нуклеиновая кислота, кодирующая кольцевую РНК, содержит промотор и последовательность, кодирующую фактор

перепрограммирования, функционально связанную с IRES, фланкированную переставленным интроном I типа. В некоторых воплощениях нуклеиновая кислота дополнительно содержит экзон или его часть.

[245] Приведенные в качестве иллюстрации последовательности векторов, которые можно применять для получения кольцевой РНК, показаны в SEQ ID NO: 23-30. Эти векторы обозначены в данном документе как «предшественники» кольцевой РНК, поскольку они кодируют линейные РНК, которые, будучи транскрибированы, могут циркуляризоваться с образованием кольцевой РНК (то есть кольцевых РНК с SEQ ID NO: 30-38).

[246] В некоторых воплощениях предшественник кольцевой РНК кодирует фактор перепрограммирования nGFP. В некоторых воплощениях предшественник кольцевой РНК содержит последовательность SEQ ID NO: 23 или последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99%. В некоторых воплощениях кольцевая РНК кодирует фактор перепрограммирования nGFP. В некоторых воплощениях кольцевая РНК содержит последовательность SEQ ID NO: 31 или последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99%.

[247] В некоторых воплощениях предшественник кольцевой РНК кодирует фактор перепрограммирования MyoD. В некоторых воплощениях предшественник кольцевой РНК содержит последовательность SEQ ID NO: 24 или последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99%. В некоторых воплощениях кольцевая РНК кодирует фактор перепрограммирования MyoD. В некоторых воплощениях кольцевая РНК содержит последовательность SEQ ID NO: 32 или последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99%.

[248] В некоторых воплощениях предшественник кольцевой РНК кодирует фактор перепрограммирования OCT4. В некоторых воплощениях предшественник кольцевой РНК содержит последовательность SEQ ID NO: 25 или последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по

[250] В некоторых воплощениях предшественник кольцевой РНК кодирует фактор перепрограммирования LIN28. В некоторых воплощениях предшественник кольцевой РНК содержит последовательность SEQ ID NO: 27 или последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99%. В некоторых воплощениях кольцевая РНК кодирует фактор перепрограммирования LIN28. В некоторых воплощениях кольцевая РНК содержит последовательность SEQ ID NO: 35 или последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99%.

[251] В некоторых воплощениях предшественник кольцевой РНК кодирует фактор перепрограммирования NANOG. В некоторых воплощениях предшественник кольцевой РНК содержит последовательность SEQ ID NO: 28 или последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99%. В некоторых воплощениях кольцевая РНК кодирует фактор перепрограммирования NANOG. В некоторых воплощениях кольцевая РНК содержит последовательность SEQ

ID NO: 36 или последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99%.

[252] В некоторых воплощениях предшественник кольцевой РНК кодирует фактор перепрограммирования KLF4. В некоторых воплощениях предшественник кольцевой РНК содержит последовательность SEQ ID NO: 29 или последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99%. В некоторых воплощениях кольцевая РНК кодирует фактор перепрограммирования KLF4. В некоторых воплощениях кольцевая РНК содержит последовательность SEQ ID NO: 37 или последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99%.

[253] В некоторых воплощениях предшественник кольцевой РНК кодирует фактор перепрограммирования cMYC. В некоторых воплощениях предшественник кольцевой РНК содержит последовательность SEQ ID NO: 30 или последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99%. В некоторых воплощениях кольцевая РНК кодирует фактор перепрограммирования cMYC. В некоторых воплощениях кольцевая РНК содержит последовательность SEQ ID NO: 38 или последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99%.

[254] Также предложены композиции, содержащие кольцевую РНК или вектор, описанные в данном документе. В некоторых воплощениях композиция содержит (1) кольцевую РНК и (2) носитель или наполнитель. В некоторых воплощениях композиция содержит (1) вектор и (2) носитель или наполнитель. Подходящие носители или наполнители включают, например, стерильную воду, стерильные буферные растворы (например, растворы, забуференные фосфатом, цитратом или ацетатом и так далее), стерильные среды, полиалкиленгликоли, гидрогенизированные нафталены (например, биосовместимые полимеры на основе лактида), сополимеры лактида/гликолида или сополимеры полиоксиэтилена/полиоксипропилена. В некоторых воплощениях носитель или наполнитель могут содержать лактозу, маннит, вещества для ковалентного

присоединения полимеров, таких как полиэтиленгликоль, комплексообразования с ионами металлов или включения материалов в или на конкретные препараты полимерных соединений, таких как полилактат, полигликолевая кислота, гидрогель, или на липосомы, микроэмульсии, мицеллы, однослойные или многослойные везикулы, фрагменты эритроцитов или сферопласты. В некоторых воплощениях рН носителя или наполнителя находится в диапазоне от 5,0 до 8,0, например в диапазоне от приблизительно 6,0 до приблизительно 7,0. В некоторых воплощениях носитель или наполнитель содержит компоненты соли (например, хлорид натрия, хлорид калия) или другие компоненты, которые делают раствор, например, изотоническим. Кроме того, носитель или наполнитель могут содержать дополнительные компоненты, такие как эмбриональная телячья сыворотка, факторы роста, человеческий сывороточный альбумин (HSA), полисорбат 80, сахара или аминокислоты.

[255] Также предложены клетки, содержащие рекомбинантную кольцевую РНК, вектор или композицию, описанные в данном документе. В некоторых воплощениях клетка представляет собой прокариотическую клетку. В некоторых воплощениях клетка представляет собой эукариотическую клетку. В некоторых воплощениях клетка представляет собой клетку млекопитающего (например, мышиную, коровью, обезьянью, свиную, лошадиную, овечью клетку или клетку человека). В некоторых воплощениях клетка представляет собой клетку человека.

Наборы

[256] Также предложены наборы для экспрессии белка в клетке. В некоторых воплощениях набор содержит по меньшей мере одну кольцевую РНК, описанную в данном документе, или вектор, содержащий кодирующую ее нуклеиновую кислоту (например, молекулу ДНК). В некоторых воплощениях набор содержит сосуд, содержащий кольцевую РНК или молекулу ДНК, кодирующую ее. В некоторых воплощениях набор содержит множество сосудов, где каждый сосуд содержит кольцевую РНК или молекулу ДНК, кодирующую ее. В некоторых воплощениях набор содержит сосуд, содержащий множество молекул кольцевых РНК, где каждая молекула кольцевой РНК содержит последовательность, кодирующую белок. В некоторых воплощениях набор содержит сосуд, содержащий множество молекул ДНК, где каждая молекула ДНК кодирует молекулу кольцевой РНК, которую можно применять для экспрессии белка в клетке. В некоторых воплощениях набор также содержит набор инструкций для применения по меньшей мере одной кольцевой РНК (или молекулы

ДНК, кодирующей ее) для экспрессии белка в клетке.

[257] В некоторых воплощениях набор содержит одну или более кольцевых РНК или молекул ДНК, кодирующих их, где каждая кольцевая РНК или молекула ДНК, кодирующая кольцевую РНК, содержит последовательность, которая кодирует по меньшей мере один белок. В некоторых воплощениях набор может дополнительно содержать кольцевую РНК, которая не кодирует никакой белок или миРНК, или молекулу ДНК, кодирующую ее. В некоторых воплощениях набор может дополнительно содержать кольцевую РНК, которая кодирует миРНК, или молекулу ДНК, кодирующую ее. В некоторых воплощениях набор может содержать один сосуд, содержащий каждое из: (1) одной или более кольцевых РНК или кодирующих их молекул ДНК, где каждая кольцевая РНК (или последовательность ДНК) кодирует белок, (2) возможно кольцевую РНК, которая не кодирует никакой белок или миРНК, или кодирующую ее молекулу ДНК, (3) возможно кольцевую РНК, которая кодирует миРНК, или кодирующую ее молекулу ДНК. В некоторых воплощениях набор может содержать множество сосудов, где каждый сосуд содержит одно из: (1) по меньшей мере одной или более кольцевых РНК, кодирующих белок, или кодирующих их молекул ДНК, (2) возможно кольцевую РНК, которая не кодирует никакой белок или миРНК, или кодирующую ее молекулу ДНК, (3) возможно кольцевую РНК, которая кодирует миРНК, или кодирующую ее молекулу ДНК. В некоторых воплощениях набор также содержит набор инструкций для применения по меньшей мере одной кольцевой РНК (или кодирующей ее последовательности ДНК) для экспрессии белка в клетке.

[258] В некоторых воплощениях также предложен набор для перепрограммирования соматических клеток и/или создания iPSC. В некоторых воплощениях набор содержит по меньшей мере одну кольцевую РНК, кодирующую фактор перепрограммирования (например, фактор транскрипции), или вектор, содержащий кодирующую ее нуклеиновую кислоту (например, молекулу ДНК). В некоторых воплощениях набор содержит сосуд, содержащий кольцевую РНК или кодирующую ее молекулу ДНК. В некоторых воплощениях набор содержит множество сосудов, где каждый сосуд содержит кольцевую РНК или кодирующую ее молекулу ДНК. В некоторых воплощениях набор содержит сосуд, содержащий множество молекул кольцевой РНК, где каждая молекула кольцевой РНК содержит последовательность, кодирующую фактор транскрипции. В некоторых воплощениях набор содержит множество молекул ДНК, где каждая молекула ДНК кодирует молекулу кольцевой РНК, которую можно

применять для экспрессирования фактора транскрипции в клетке. В некоторых воплощениях набор также содержит набор инструкций для применения по меньшей мере одной кольцевой РНК для перепрограммирования соматических клеток и/или создания iPSC.

[259] В некоторых воплощениях набор содержит одну или более кольцевых РНК или кодирующих их молекул ДНК, где каждая кольцевая РНК или молекула ДНК, кодирующая кольцевую РНК, содержит последовательность, которая кодирует по меньшей мере один фактор перепрограммирования. Факторы перепрограммирования могут, например, представлять собой любой из факторов перепрограммирования, перечисленных в Таблице 1. В некоторых воплощениях набор может дополнительно содержать кольцевую РНК, которая не кодирует никакой белок или миРНК, или кодирующую ее молекулу ДНК. В некоторых воплощениях набор может дополнительно содержать кольцевую РНК, которая кодирует миРНК, или кодирующую ее молекулу ДНК. В некоторых воплощениях набор может содержать один сосуд, содержащий каждое из: (1) одной или более кольцевых РНК или кодирующих их молекул ДНК, где каждая кольцевая РНК (или последовательность ДНК) кодирует фактор перепрограммирования, (2) возможно кольцевую РНК, которая не кодирует никакой белок или миРНК, или кодирующую ее молекулу ДНК, (3) возможно кольцевую РНК, которая кодирует миРНК, или кодирующую ее молекулу ДНК. В некоторых воплощениях набор может содержать множество сосудов, где каждый сосуд содержит одно из: (1) по меньшей мере одной или более кольцевых РНК, кодирующих фактор перепрограммирования, или кодирующих их молекул ДНК, (2) возможно кольцевую РНК, которая не кодирует никакой белок или миРНК, или кодирующую ее молекулу ДНК, (3) возможно кольцевую РНК, которая кодирует миРНК, или кодирующую ее молекулу ДНК. В некоторых воплощениях набор также содержит набор инструкций для применения по меньшей мере одной кольцевой РНК (или кодирующей ее последовательности ДНК) для экспрессирования фактора перепрограммирования в клетке.

[260] В некоторых воплощениях предложен набор для трансдифференцировки клеток. В некоторых воплощениях набор содержит по меньшей мере одну кольцевую РНК, кодирующую фактор перепрограммирования (например, фактор транскрипции) или вектор, содержащий кодирующую ее нуклеиновую кислоту (например, молекулу ДНК). В некоторых воплощениях набор содержит сосуд, содержащий кольцевую РНК

или кодирующую ее молекулу ДНК. В некоторых воплощениях набор содержит множество сосудов, где каждый сосуд содержит кольцевую РНК или кодирующую ее молекулу ДНК. В некоторых воплощениях набор содержит сосуд, содержащий множество молекул кольцевых РНК, где каждая молекула кольцевой РНК содержит последовательность, кодирующую фактор трансдифференцировки. В некоторых воплощениях набор содержит сосуд, содержащий множество молекул ДНК, где каждая молекула ДНК кодирует молекулу кольцевой РНК, которую можно применять для экспрессирования фактора трансдифференцировки в клетке. В некоторых воплощениях набор также содержит набор инструкций для применения по меньшей мере одной кольцевой РНК для трансдифференцировки клеток.

[261] В некоторых воплощениях набор содержит одну или более кольцевых РНК или кодирующих их молекул ДНК, где каждая кольцевая РНК или молекула ДНК, кодирующая кольцевую РНК, содержит последовательность, которая кодирует по меньшей мере один фактор трансдифференцировки. Факторы трансдифференцировки могут, например, представлять собой любой из факторов трансдифференцировки, перечисленных в Таблице 6. В некоторых воплощениях набор может дополнительно содержать кольцевую РНК, которая не кодирует никакой белок или миРНК, или кодирующую ее молекулу ДНК. В некоторых воплощениях набор может дополнительно содержать кольцевую РНК, которая кодирует миРНК, или кодирующую ее молекулу ДНК. В некоторых воплощениях набор может содержать один сосуд, содержащий каждое из: (1) одной или более кольцевых РНК или кодирующих их молекул ДНК, где каждая кольцевая РНК (или последовательность ДНК) кодирует фактор трансдифференцировки, (2) возможно кольцевую РНК, которая не кодирует никакой белок или миРНК, или кодирующую ее молекулу ДНК, (3) возможно кольцевую РНК, которая кодирует миРНК, или кодирующую ее молекулу ДНК. В некоторых воплощениях набор может содержать множество сосудов, где каждый сосуд содержит одно из: (1) по меньшей мере одной кольцевой РНК, кодирующей фактор трансдифференцировки, или кодирующей ее молекулы ДНК, (2) возможно, кольцевой РНК, которая не кодирует никакой белок или миРНК, или кодирующей ее молекулы ДНК, (3) возможно, кольцевой РНК, которая кодирует миРНК, или кодирующей ее молекулы ДНК. В некоторых воплощениях набор также содержит набор инструкций для применения по меньшей мере одной кольцевой РНК (или кодирующей ее последовательности ДНК) для экспрессирования фактора трансдифференцировки в

клетке.

[262] В некоторых воплощениях набор содержит множество кольцевых РНК (или кодирующих их молекул ДНК), где каждая кольцевая РНК кодирует фактор перепрограммирования, выбранный из Oct3/4, Klf4, Sox2, Nanog, Lin28, c-Мyc и L-Мyc. Каждая кольцевая РНК (или кодирующая ее молекула ДНК) может быть представлена в отдельных сосудах или может быть представлена в одном сосуде.

[263] В некоторых воплощениях набор содержит множество кольцевых РНК (или кодирующих их молекул ДНК), где каждая кольцевая РНК кодирует фактор перепрограммирования, выбранный из Oct3/4, Sox2 и Klf4. Каждая кольцевая РНК (или кодирующая ее молекула ДНК) может быть представлена в отдельных сосудах или может быть представлена в одном сосуде.

[264] В некоторых воплощениях набор содержит множество кольцевых РНК (или кодирующих их молекул ДНК), где каждая кольцевая РНК кодирует фактор перепрограммирования, выбранный из Oct3/4, Sox2 c-Мyc и Klf4. Каждая кольцевая РНК (или кодирующая ее молекула ДНК) может быть представлена в отдельных сосудах или может быть представлена в одном сосуде.

[265] В некоторых воплощениях набор содержит множество кольцевых РНК (или кодирующих их молекул ДНК), где каждая кольцевая РНК кодирует фактор перепрограммирования, выбранный из Oct3/4, Sox2, L-Мyc и Klf4. Каждая кольцевая РНК (или кодирующая ее молекула ДНК) может быть представлена в отдельных сосудах или может быть представлена в одном сосуде.

[266] В некоторых воплощениях набор может содержать линейную РНК, способную к циркуляризации, или кодирующую ее последовательность ДНК. В некоторых воплощениях набор может дополнительно содержать один или более реагентов для циркуляризации линейной РНК, такой как РНК- или ДНК-лигаза или Mg^{2+} и гуанозин-5'-трифосфат (GTP).

[267] В некоторых воплощениях набор содержит: (1) сосуд, содержащий кольцевую РНК, кодирующую OCT4, и буфер (например, 1-10 mM цитрат натрия, pH 6,5); (2) сосуд, содержащий кольцевую РНК, кодирующую SOX2, и буфер (например, 1-10 mM цитрат натрия, pH 6,5); (3) сосуд, содержащий *circRNA*, кодирующую KLF4, и буфер (например, 1-10 mM цитрат натрия, pH 6,5); и (4) упаковку и инструкции. Набор может дополнительно содержать сосуд, содержащий кольцевую РНК, кодирующую c-MYC или L-MYC, и буфер (например, 1-10 mM цитрат натрия, pH 6,5); сосуд, содержащий *circRNA*,

кодирующую LIN28, и буфер (например, 1-10 мМ цитрат натрия, pH 6,5); сосуд, содержащий *siRNA*, кодирующую NANOG, и буфер (например, 1-10 мМ цитрат натрия, pH 6,5); или их комбинацию.

[268] В некоторых воплощениях набор содержит: (1): (а) кольцевую РНК фактора(ов) перепрограммирования из одной или более комбинаций циркуляризованных факторов перепрограммирования, указанных в Таблице 2, где каждый фактор содержится отдельно в индивидуальном сосуде или где два или более таких факторов комбинированы вместе в одном или множестве сосудов; и/или (б) кольцевую(ые) РНК из одной или более комбинаций кольцевых РНК для создания iPSC, указанных в Таблице 3, где каждая такая кольцевая РНК содержится отдельно в индивидуальном сосуде или где две или более таких кольцевых РНК комбинированы вместе в одном или множестве сосудов; и (2) упаковку и инструкции.

[269] В некоторых воплощениях набор содержит: (1): (а) кольцевую РНК фактора(ов) перепрограммирования из одной или более комбинаций циркуляризованных факторов перепрограммирования, указанных в Таблице 2, где каждый фактор содержится отдельно в индивидуальном сосуде или где два или более таких факторов комбинированы вместе в одном или множестве сосудов; и/или (б) кольцевую(ые) РНК из одной или более комбинаций кольцевых РНК для создания iPSC, указанных в Таблице 3, где каждая такая кольцевая РНК содержится отдельно в индивидуальном сосуде или где две или более таких кольцевых РНК комбинированы вместе в одном или множестве сосудов; и где для любого из (1)(а) и (1)(б) циркуляризованные факторы перепрограммирования и/или кольцевые РНК из Таблицы 2 и Таблицы 3, соответственно, суспендированы в буфере; и (3) упаковку и инструкции.

[270] В любом из наборов, описанных выше, кольцевая РНК или кодирующая ее молекула ДНК может быть представлена в композиции, которая дополнительно содержит буфер. Буфер может содержать, например, 1-10 мМ цитрат натрия. В некоторых воплощениях pH буфера находится в диапазоне от приблизительно 2 до приблизительно 12, например приблизительно 6,5.

ПРИМЕРЫ

[271] Приведенные ниже Примеры включены в данное описание исключительно в целях иллюстрации и не являются исчерпывающими.

Пример 1. Создание кольцевых РНК и линейных мРНК

[272] Создавали векторы для экспрессии кольцевой РНК, содержащие

последовательность РНК, кодирующую circOct3/4 (SEQ ID NO: 1), circKlf4 (SEQ ID NO: 2, 3), circSox2 (SEQ ID NO: 4), circNanog (SEQ ID NO: 5, 6), circLin28 (SEQ ID NO: 7), circC-Myc (SEQ ID NO: 8, 9) или circL-Myc (SEQ ID NO: 10-12). Создавали дополнительные векторы для экспрессии, кодирующие circBIRC6 (SEQ ID NO: 13), circCORO1C (SEQ ID NO: 14) или circMAN1A2 (SEQ ID NO: 15). Получали векторы для экспрессии кольцевой РНК, кодирующие circnGFP или circmCherry, для применения в качестве репортеров.

[273] Общий протокол для получения кольцевой РНК показан на Фиг. 4. Конструкция circRNA с перестановкой интрон-экзон (PIE) содержит 3'-интрон и фрагмент экзона рибозима группы I, за которым следует последовательность, представляющая интерес (например, участок внутренней посадки рибосомы (IRES) и кодирующая последовательность (CDS) для желаемого белкового продукта), за которой следует 5'-фрагмент экзона и 5'-интрон. Конструкцию PIE клонировали в соответствующую плазмиду, что позволяло амплифицировать и очищать плазмидную ДНК. Плазмидную ДНК линейаризовали при помощи рестрикционного фермента и использовали в качестве матрицы для транскрипции *in-vitro* РНК-предшественника. 5'- и 3'-концы РНК-предшественника соединяются вместе в результате спаривания отдаленных оснований и взаимодействия третичных структур с образованием рибозима. В присутствии Mg^{2+} и свободного гуанозина (например, гуанозин-5'-трифосфата (GTP)) рибозим спонтанно осуществляет сплайсинг фрагментов экзонов посредством последовательных реакций трансэстерификации с образованием кольцевой РНК и высвобождением интронов. Дополнительное нагревание или другие манипуляции могут вызвать диссоциацию половинок интронов. Никирование кольцевой РНК может привести к образованию ре-линеаризованных продуктов расщепления никированной circRNA. Это проиллюстрировано на **Фиг. 5**.

[274] Дизайн и синтез конструкции: Плазмиды, содержащие желаемые циркуляризованные конструкции, приобретали в компании, поставляющей синтезированные гены. Циркуляризованные конструкции содержат промотор T7, за которым расположены последовательности, соответствующие 3'-половине рибозима с перестановкой (состоящего из 3'-интрона, 3'-фрагмента экзона и фланкирующих последовательностей), за которыми следует последовательность, представляющая интерес (IRES и ген, представляющий интерес), за которой следует 5'-половина рибозима с перестановкой (фланкирующие последовательности, 5'-фрагмент экзона и

5'-интрон) и сайт рестрикции для линеаризации плазмиды.

[275] Линеаризация плазмиды: Плазмиду (как правило, 20 мкг) линеаризовали путем инкубации в течение 1 часа с соответствующим рестрикционным ферментом в реакционной смеси, приготовленной в соответствии с прилагавшейся инструкцией (Thermo Scientific: Fast Digest Eco32I или MssI), полученные реакционные смеси очищали на центрифужной колонке на основе диоксида кремния (Thermo Scientific: Набор для очистки продуктов PCR (полимеразная цепная реакция) GeneJET) согласно прилагавшейся инструкции.

[276] Транскрипция *in vitro* Линеаризованную плазмиду использовали в качестве матрицы для транскрипции *in-vitro* РНК-предшественников для циркуляризации. Примеры последовательностей РНК-предшественников представлены в SEQ ID NO: 23-20, описаны ниже в Таблице 7. Реакционные смеси для транскрипции *in-vitro* готовили в соответствии с прилагавшимися инструкциями (Набор для транскрипции MEGAscript T7 от Invitrogen), инкубировали от 2 до 3 часов при 37°C, после чего к реакционной смеси добавляли ДНКазу (ДНКазу Turbo от Invitrogen) (ДНКазу добавляли в соотношении 4 единицы ДНКазы на мкг ДНК-матрицы), смешивали и инкубировали дополнительно в течение 30 минут при 37°C.

Таблица 7. Примеры РНК-предшественников

Идентификатор	Кодируемый ген	SEQ ID NO:
nGFP_предшественник	nGFP	23
MyoD_предшественник	MyoD	24
OCT4_предшественник	OCT4	25
SOX2_предшественник	SOX2	26
LIN28_предшественник	LIN28	27
NANOG_предшественник	NANOG	28
KLF4_предшественник	KLF4	29
cMYC_предшественник	cMYC	30

[277] Пост-транскрипционная очистка и циркуляризация РНК 200 мкг РНК-предшественника, продукта IVT, получали при конечной концентрации 2 mM GTP (гуанозинтрифосфата) и 10 mM Mg²⁺ в общем объеме 100 мкл. Реакционную смесь инкубировали при 55°C в течение 15 минут, а затем немедленно очищали при помощи набора для очистки продуктов транскрипции MEGAClear. Элюированную РНК собирали и проводили количественную оценку при помощи Nanodrop One в режиме работы с РНК.

[278] Эксклюзионная хроматография Кольцевую РНК очищали от побочных

продуктов циркуляризации при помощи эксклюзионной хроматографии. от 50 до 500 мкг пост-транскрипционно циркуляризованного РНК-продукта инжестировали в систему FPLC, оборудованную соответствующей(ими) колонкой(ами) SEC и собирали и объединяли в пул фракции, соответствующие пиковой концентрации кольцевой РНК. Подвижная фаза представляла собой TE с pH 6. Объединенные в пул фракции концентрировали и осуществляли замену буфера на 10 mM Tris, pH 7,4, с применением центрифужного фильтра (Amicon Ultra 0,5 мл, NOMM 100K, Millipore-Sigma). Затем проводили количественную оценку полученной РНК при помощи Nanodrop One в режиме работы с РНК.

[279] Пиковые фракции кольцевой РНК обнаруживали путем разделения от 50 до 600 нг РНК из заданной фракции в 2% агарозном геле (Thermo Scientific 2% EX Gel) для визуализации относительной интенсивности полос, соответствующих кольцевой РНК или другим побочным продуктам циркуляризации. Пиковые фракции идентифицировали посредством визуального анализа или количественной оценки интенсивности полос с применением программного обеспечения ImageLab (Bio-Rad).

[280] Обработка фосфатазой Готовили реакционную смесь из РНК, очищенной посредством SEC, и щелочной фосфатазы в соотношении 1 Ед фосфатазы на мкг РНК согласно прилагавшейся инструкции (Thermo Scientific: FastAP) и инкубировали при 37°C в течение 1 часа. Затем реакционную смесь подвергали очистке с применением набора с колонкой на основе диоксида кремния (набор для очистки и концентрирования РНК GeneJET Micro, Thermo Scientific). РНК элюировали при помощи TE с pH 6 и хранили при -20 °C до применения.

[281] Примеры последовательностей циркуляризованной РНК представлены в SEQ ID NO: 31-38 и подробно описаны ниже в Таблице 8.

Таблица 8. Примеры циркуляризованных РНК

Идентификатор	Кодируемый ген	SEQ ID NO:
nGFP_circRNA	nGFP	31
MyoD_circRNA	MyoD	32
OCT4_circRNA	OCT4	33
SOX2_circRNA	SOX2	34
LIN28_circRNA	LIN28	35
NANOG_circRNA	NANOG	36
KLF4_circRNA	KLF4	37
cMYC_circRNA	cMYC	38

[282] Векторы с линейными РНК для получения линейных РНК, кодирующих репортерные гены (nGFP или mCherry), также получали в Trilink. Линейную РНК создавали при помощи IVT с применением модифицированных или немодифицированных нуклеотидтрифосфатов (NTP). До или во время IVT можно добавлять 5'-кэп и поли-А хвост. Линейные РНК, полученные с применением модифицированных NTP, обозначены в данном документе как «модифицированные линейные РНК», а линейные РНК, полученные с применением немодифицированных NTP, обозначены в данном документе как «немодифицированные линейные РНК».

Пример 2. Характеризация кольцевой РНК

[283] Проводили эксперименты для дальнейшей характеристики кольцевых РНК, полученных в Примере 1.

Получение кольцевой РНК на основе PIE зависит от автокаталитической сплайсирующей активности переставленного интрона группы I

[284] На **ФИГ. 6** показан электрофорез в агарозном геле продуктов транскрипции *in vitro* (100 нг) с ДНК-матрицы, соответствующей либо полноразмерному (WT), либо укороченному (Δ SS) РНК-предшественнику с перестановкой интрон-экзон (PIE). Полноразмерный РНК-предшественник ко-трансляционно циркуляризуется, что приводит к образованию кольцевой РНК, никированной кольцевой РНК и вырезанию половинок интронов. У укороченного по 3' РНК-предшественника (Δ SS) отсутствует переставленный 5' интрон и сайт сплайсинга, вследствие чего он не способен к циркуляризации, в результате чего образуется один РНК-продукт.

[285] Полосу РНК-предшественника идентифицировали путем сравнения его известной длины с маркером массы ssRNA (не показано) и известной длиной укороченного продукта РНК-предшественника. Аналогично, полосы никированной кольцевой РНК и интронов идентифицировали путем сравнения их известных длин с маркером массы и относительного расположения в геле.

[286] Известно, что при разделении в 2% агарозном геле кольцевая РНК мигрирует более медленно (с более высокой кажущейся молекулярной массой), чем линейная РНК того же размера (см. Wesselhoeft et al., Nat Commun 9, 2629 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05096-6>), что позволяет идентифицировать оставшуюся полосу как кольцевую РНК.

Подтверждение циркуляризации РНК

[287] На **ФИГ. 7** показаны результаты анализа посредством специфичной к границе

сплайсинга RT-PCR для подтверждения того, что полоса circRNA содержит циркуляризованную РНК. Как продукт IVT, так и полосу circRNA, выделенную из геля, использовали в качестве матриц для синтеза первой цепи кДНК с применением либо случайных гексамеров (Hex), либо специфичных к границе сплайсинга (SJ) праймеров. Полученную кДНК использовали в качестве матрицы для PCR-амплификации с применением пары прямого и обратного праймеров, охватывающих границу сплайсинга, которая, как ожидалось, образовывалась при циркуляризации.

[288] RT-PCR со всеми комбинациями РНК-матрицы и праймеров первой цепи кДНК позволяла получить ожидаемый продукт PCR из 507 нуклеотидов (полосы 3-6). Образование границы сплайсинга подтверждали секвенированием продуктов PCR по Сэнгеру (не показано).

[289] В качестве контроля использовали те же самые праймеры для амплификации плазмиды, содержащей конструкцию circRNA PIE. Поскольку плазида не содержит границы сплайсинга, праймеры располагаются «снаружи» от каждого конца конструкции PIE, и для получения ампликона ДНК-полимераза должна пройти через остов плазмиды. Полученный амплифицированный продукт соответствует ожидаемому продукту размером 3594 пар оснований (полоса 2).

Очистка и характеристика кольцевой РНК

[290] В ходе получения circRNA начальные продукты транскрипции *in vitro* (IVT) и ко-транскрипционной циркуляризации подвергали дополнительной стадии пост-транскрипционной циркуляризации (Circ) и разделяли посредством эксклюзионной хроматографии (SEC). Затем отобранные фракции SEC объединяли в пул и обрабатывали фосфатазой перед трансфекцией. На **ФИГ. 8А** показано распределение видов РНК, остающихся после каждого указанного этапа, для каждого из шести факторов перепрограммирования. Следует отметить, что большая часть РНК-предшественника, остающегося после реакции транскрипции *in vitro*, потребляется на стадии пост-транскрипционной циркуляризации, что приводит как к образованию дополнительной circRNA, так и к никированию circRNA. Стадия SEC эффективна для удаления высоко- и низкомолекулярных побочных продуктов, но обладает более скромной способностью очищать circRNA от линеаризованной никированной circRNA.

[291] РНКаза R представляет собой экзонуклеазу, расщепляющую линейную РНК в направлении 3' → 5'. У кольцевой РНК отсутствует 3'-конец, и поэтому ожидается, что она будет защищена от разрушения РНКазой. Отбирали фракции SEC, содержащие как

предполагаемую кольцевую, так и предполагаемую никированную кольцевую РНК, и инкубировали с РНКазой R и без нее для подтверждения подлинности circRNA и линейных контаминирующих продуктов. Затем полученные продукты разделяли при помощи электрофореза в агарозном геле. Как показано на **Фиг. 8В**, более медленно мигрирующая (А, кольцевая РНК) полоса на каждой дорожке оказывалось более устойчивой к расщеплению РНКазой R, тогда как более быстро мигрирующая полоса (В, линейная РНК) была чувствительна к ней.

Пример 3. Применение кольцевых РНК для экспрессирования белков

[292] Кольцевые РНК из Примера 1 использовали для экспрессии белков в фибробластах. Сравнивали стабильность экспрессии белков из кольцевых РНК, модифицированных линейных РНК и немодифицированных линейных мРНК.

[293] Фибробласты кожи человека (HDF) высевали в плотности 50000/лунку в 24-луночные планшеты и выращивали приблизительно в течение 24 часов в среде Cascade 106, содержащей ростовую добавку с низким содержанием сыворотки. Клетки трансфицировали 30 нг РНК (линейной мРНК от TriLink или CircRNA) линейными и кольцевыми РНК, кодирующими Oct4, Klf4, Sox2, cMyc, Nanog, Lin28 с применением реагента RNAiMax согласно инструкциям производителя. Спустя 24 часа культуры фиксировали и анализировали при помощи иммунофлуоресцентной химии (IFC) с применением антител, специфических к белку, представляющему интерес. Изображения получали с использованием инвертированного микроскопа Nikon Ti2 и делали снимки с использованием фотоаппарата с высоким разрешением PCO sCMOS. Проводили дополнительные эксперименты, в которых кольцевые РНК конъюгированы с липидными наночастицами («LNP») с образованием комплексов circRNA-LNP. Комплексы circRNA-LNP можно в дальнейшем применять для непосредственного внедрения кольцевой РНК в клетку, без необходимости в трансфицирующем реагенте.

[294] Результаты представлены на **Фиг. 16А** и **Фиг. 16В**. Все использованные факторы перепрограммирования представляли собой факторы транскрипции и почти исключительно демонстрировали ядерную локализацию (окрашивание при помощи DAPI). LIN28A представляет собой РНК-связывающий белок, который преимущественно является цитозольным. Как показано, конструкции circRNA обеспечивали экспрессию белка в трансдуцированных фибробластах. Следует отметить, что уровни экспрессии белка обычно ниже при использовании circRNA по сравнению с линейной мРНК. Представляет интерес, как показано в экспериментах с

перепрограммированием фибробластов, коктейль факторов перепрограммирования *circRNA* давал начало большему числу колоний iPSC по сравнению с коктейлем линейной мРНК. Не желая связывать себя какой-либо теорией, авторы изобретения тем не менее предполагают, что более низкая, но более продолжительная экспрессия факторов перепрограммирования больше благоприятствует перепрограммированию, чем высокая кратковременная экспрессия.

Пример 4. Исследование иммуногенности комплексов *circRNA* и *circRNA*-LNP

[295] Сравнивали иммуногенность комплексов кольцевой РНК и *circRNA*-LNP с таковой модифицированных и немодифицированных линейных мРНК.

[296] Вкратце, в клетки внедряли кольцевые РНК, комплексы *circRNA*-LNP, модифицированные линейные мРНК или немодифицированные линейные мРНК. В различные моменты времени исследовали уровни экспрессии генов, регулируемых интерфероном (например, одного или более генов, описанных на сайте www.interferome.org), посредством qPCR (количественная полимеразная цепная реакция) и/или ELISA (твердофазный иммуноферментный анализ) согласно стандартному протоколу. В некоторых экспериментах в клетки внедряли *circRNA* или линейные мРНК в комбинации с B18R, возможно в комбинации с дополнительными факторами ускользания от иммунологического надзора, такими как E3 и K3. B18R и дополнительные факторы ускользания от иммунологического надзора представлены в форме линейной мРНК, кольцевой РНК или добавляются непосредственно в среды в виде белков.

[297] Для определения, влияют ли *circRNA* и/или линейные мРНК на жизнеспособность клеток, наблюдали за жизнеспособностью клеток после внедрения РНК в клетки. В частности, отслеживали кинетику клеточного роста/жизнеспособность от 24 часов до 10 суток после внедрения РНК в клетку. Также измеряли жизнеспособность клеток после однократной или многократных трансфекций.

Пример 5. Получение iPSC с применением перепрограммирования адгезивных клеток посредством *circRNA*

[298] Проводили эксперименты для сравнения перепрограммирования фибробластов в iPSC с применением немодифицированных линейных мРНК и кольцевых РНК, кодирующих различные факторы перепрограммирования.

[299] Экспериментальные группы были следующими:

- (а) Группа 1 - ложнотрансфицированные - без РНК
- (б) Группа 2 - набор для перепрограммирования фибробластов человека RepoCell's Stemgent StemRNA 3rd Gen (немодифицированная линейная мРНК)
- (в) Группа 3 - немодифицированная линейная мРНК, синтезированная в Trilink
- (г) Группа 4 - немодифицированная кольцевая РНК

[300] Для каждой группы объединяли 3 коктейля РНК, кодирующих факторы перепрограммирования, иммуносуппрессорные белки вируса осповакцины и миметики миРНК, и делили на аликвоты для желаемого количества трансфекций (Human Gene Therapy, 26(11), DOI: 10.1089/hum.2015.045). Коктейли РНК были следующими:

- (а) Коктейль мРНК факторов перепрограммирования, содержащий мРНК, кодирующие Oct4, Sox2, Klf4, Lin28, cMyc и Nanog (OSKLMN) – РНК присутствовала в молярном соотношении 3:1:1:1:1:1.
- (б) Коктейль мРНК факторов ускользания от иммунологического надзора вируса осповакцины, содержащий мРНК, кодирующие E3, K3 и B18R (ЕКВ)
- (в) Коктейль миметиков микроРНК, содержащий миметики miR302a, miR302b, miR302c, miR302d и miR367.

[301] Для группы 4 (группа кольцевой РНК) для коктейля генов ЕКВ вируса осповакцины использовали линейную мРНК. В каждой группе добавляли небольшое количество РНК, кодирующей nGFP, чтобы помочь визуализировать доставку РНК в клетки. Для группы 2 и группы 3 использовали линейную мРНК nGFP, а для группы 4 использовали кольцевую РНК nGFP. Миметик микроРНК приобретали в Dharmason. Набор Repocell Stemgent использовали в качестве общего контроля перепрограммирования. Конструкции РНК в группах 3 и 4 имели идентичные последовательности ORF (открытая рамка считывания) для каждого фактора перепрограммирования. Таким образом, линейные мРНК в группе 3 являются непосредственным контролем кольцевых РНК в группе 4.

[302] Фибробласты кожи человека (HDF) высевали в 6-луночные планшеты в 3 различных плотностях: 25000 клеток/лунку, 50000 клеток/лунку и 75000 клеток/лунку. В 1 сутки среду фибробластов заменяли на среду Nutristem-hPSC-XF. Осуществляли трансфекции с применением реагента липофектамин RNAiMax согласно инструкциям производителя. Клетки культивировали при гипоксии (5% O₂, 5% CO₂ при 37°C) до

конца эксперимента. На 2, 3 и 4 сутки выполняли три дополнительные трансфекции (см. схему на **Фиг. 9А**). Перепрограммирование фибробластов осуществляли в 6-луночных планшетах, покрытых iMatrix-511, при гипоксии, от 1 до 16/18 суток, когда вручную собирали колонии iPSC. На 16 или 18 сутки отобранные колонии собирали в 24-луночные планшеты, покрытые витронектином, и культуральную среду iPSC заменяли на E8. Отдельные колонии iPSC продолжали размножать в среде E8 и осуществляли пассажи с применением версена.

[303] Клетки визуализировали и исследовали фенотипические изменения (например, выживаемость, мезенхимально-эпителиальный переход (MET) на ранних стадиях перепрограммирования, а также приобретение характеристик, подобно плюрипотентным стволовым клеткам (PSC), таких как высокое ядерно-цитоплазмное соотношение и образование колоний).

[304] На 16 сутки, когда PSC-подобные колонии были достаточно крупными (несли по несколько тысяч клеток на колонию), от 3 до 10 колоний оценивали вручную при помощи стереомикроскопа и собирали для дальнейшего размножения и характеристики. Планшеты для перепрограммирования фиксировали на 18 сутки и исследовали при помощи IFC. Совместное окрашивание с применением анти-OCT4 и анти-TRA 1-81 осуществляли наряду с DAPI и для визуализации использовали микроскоп Nikon Ti2 для получения изображений с высоким разрешением. Планшеты также визуализировали с применением Incucyte для получения изображений лунок целиком.

[305] Хронология перепрограммирования HDF с применением линейной и кольцевой РНК представлена на **Фиг. 9А**. HDF высевали в трех плотностях (25 тыс., 50 тыс. и 75 тыс. на лунку в 6-луночных планшетах) в сутки 0, после чего осуществляли четыре ежедневных трансфекции. Колонии iPSC образовывались и становились заметными приблизительно на 8~10 сутки.

[306] В коктейли для ежедневных трансфекций включали небольшое количество РНК nGFP для отслеживания доставки РНК в фибробласты. И в коктейль мРНК Stemgent, и в коктейль мРНК Trilink включали мРНК Trilink, кодирующую nGFP, тогда как в коктейль circRNA включали circRNA, кодирующую nGFP. Для ежедневной визуализации перепрограммированных культур и измерения экспрессии белка nGFP использовали IncuCyte. На **ФИГ. 9В** показана нормализованная экспрессия nGFP в процентах от пиковой экспрессии. Белок nGFP, кодируемый circRNA, демонстрировал пролонгированную экспрессию (более медленный оборот) по сравнению с белком nGFP,

кодируемым линейной мРНК.

[307] Мезенхимально-эпителиальный переход (MET), характерные морфологические изменения в ходе перепрограммирования iPSC наблюдали во всех трех экспериментальных группах (StemgentmRNA, TrilinkmRNA и circRNA). Однако, трансфицированные circRNA культуры демонстрировали ускоренный морфологический переход от фибробласто-подобных клеток в кластеры полигональных клеток (стрелки) с последующим переходом в кластеры плотноупакованных клеток, напоминающих колонии ранних iPSC (звездочки) по сравнению с группами линейной мРНК (**Фиг. 9С**).

[308] На **ФИГ. 9D** показаны изображения лунок целиком с культурами перепрограммированных iPSC на 18 сутки, окрашенных на маркер плюрипотентности Tra-1-81. Зеленый означает области, в которых клетки Tra-1-81+ предположительно представляют iPSCs. Трансфицированные circRNA культуры дали начало существенно большему количеству положительных по Tra-1-81 областей по сравнению с лунками, где для трансфекции использовали мРНК Stemgent или мРНК Trilink, что позволяет предположить, что circRNA обеспечивала повышенную эффективность перепрограммирования (то есть результатом было больше плюрипотентных клеток на 18 сутки перепрограммирования по сравнению со способами, где применяли линейную мРНК). В результате перепрограммирования мРНК с использованием набора Stemgent эффективность перепрограммирования была выше, чем при перепрограммировании мРНК с использованием мРНК Trilink. Полученные с мРНК Trilink iPSC появлялись только по краям лунок. На **ФИГ. 9E** представлены репрезентативные изображения перепрограммирования circRNA iPSC на 18 сутки культивирования и окрашивания на экспрессию Tra-1-81 и Oct4. Количественные результаты представлены на **Фиг. 9F**. Вкратце, количественную оценку перепрограммирования выполняли для каждого условия перепрограммирования на 18 сутки с применением IncuCyte. В каждой лунке анализировали площадь, покрытую колониями iPSC, на основании морфологии на изображениях, полученных при фазовом контрасте, как процент конфлюэнтности лунки. Для всех плотностей посева (25 тыс., 50 тыс. и 75 тыс.) в лунках после перепрограммирования с помощью circRNA образовывались наибольшие площади, покрытые колониями iPSC, по сравнению с лунками, где для перепрограммирования использовали мРНК Stemgent или мРНК Trilink, что позволяло предположить наибольшую эффективность перепрограммирования с применением circRNA.

[309] Для дальнейшей характеристики iPSC, полученных при перепрограммировании

при помощи *circRNA* снимали дополнительные показатели. На **ФИГ. 10А** представлены репрезентативные изображения iPSC, полученных с применением набора для перепрограммирования мРНК Stemgent (вверху), мРНК, синтезированной в Trilink (в середине) и *circRNA* (внизу), на культурах между 3 и 5 пассажами. Каждый из указанных клонов iPSC демонстрировал характерную морфологию iPSC. На **ФИГ. 10В** показано время удвоения популяции (PDT) iPSC, полученных путем перепрограммирования РНК. Скорость роста клонов iPSC на ранних пассажах (то есть до 6 пассажа) является динамичной, что часто отражается флуктуациями времени удвоения. После 6 пассажа время удвоения для большинства клонов стабилизировалось и оставалось приблизительно 30 часов, что находится в диапазоне типичного для iPSC времени удвоения. На **ФИГ. 10С** показана экспрессия маркера плюрипотентности SSEA4 в клонах iPSC (на ранних пассажах с P6 по P9), полученных с применением различных перепрограммирующих коктейлей РНК. Клоны S1 и S2 получали с применением набора Stemgent. Клоны L1, L2 и L3 получали с применением линейных мРНК от Trilink. Клоны C2, C3, C8, C9 и C10 получали с применением *circRNA*. Все клоны демонстрировали $\geq 90\%$ SSEA4⁺ клеток в популяции. Линию Epi-iPSC использовали в качестве положительного контроля, тогда как клетки HEK293 служили отрицательным контролем. Для оценки экспрессии OCT4 проводили дополнительные эксперименты. Эти исследования подтвердили, что iPSC, перепрограммированные с применением *circRNA*, демонстрируют морфологические, ростовые и экспрессионные характеристики, схожие с таковыми у iPSC, перепрограммированных с применением линейной мРНК.

[310] Вышеупомянутые эксперименты показывают, что экспрессия белка в ходе перепрограммирования пролонгируется благодаря *circRNA* (на основании экспрессии nGFP, см. **Фиг. 9В**), и что кинетика MET ускоряется благодаря *circRNA* (**Фиг. 9С**). В целом, с применением *circRNA* образовывалось больше колоний iPSC, то есть перепрограммирование при помощи *circRNA* демонстрировало более высокую эффективность перепрограммирования по сравнению со способами с линейной мРНК (**Фиг. 9Д**). Кроме того, iPSC, полученные с применением *circRNA*, стабильно размножаются и экспрессируют маркеры плюрипотентности (**Фиг. 10**).

[311] Для оценки паттернов экспрессии генов, эпигенетики и дифференцировки в трех направлениях проводили дополнительные эксперименты. Представляющие интерес клоны размножали, замораживали и хранили в жидком азоте для дальнейшего

применения.

Пример 6. Оптимизированные протоколы перепрограммирования с применением кольцевой РНК

[312] Проводили эксперименты для определения оптимальных протоколов перепрограммирования для адгезивных клеток. Создавали экспериментальные группы с сокращенным числом трансфекций и отсутствием или присутствием коктейля факторов ускользания от иммунологического надзора ЕКВ из вируса осповакцины. РНК, кодирующие факторы перепрограммирования, были такими же, как описанные в Примере 5:

- (а) Ложнотрансфицированные - без РНК
- (б) Набор для перепрограммирования фибробластов человека RepoCell's Stemgent StemRNA 3rd Gen (немодифицированная мРНК)
- (в) Немодифицированная мРНК, синтезированная в Trilink
- (г) Немодифицированная circRNA.

[313] В каждой группе РНК тестировали 4 условия трансфекции:

- (а) 4 трансфекции (4 Тх, + коктейль ЕКВ) - 1, 2, 3, 4 сутки после посева
- (б) 2 трансфекции (2 Тх, + коктейль ЕКВ) - 1 сутки и 3 сутки после посева
- (в) 1 трансфекция (1 Тх, + коктейль ЕКВ) - 1 сутки после посева
- (г) 4 трансфекции без коктейля ЕКВ (4 Тх - коктейль ЕКВ) - 1, 2, 3, 4 сутки после посева

[314] Каждая трансфекция включала 3 коктейля (за исключением условия -ЕКВ, которое включало только (а) и (б))

- (а) Коктейль мРНК факторов перепрограммирования OSKLMN (Oct4/Sox2/Klf4/Lin28/cMyc/Nanog)
- (б) Коктейль миметика микроРНК
- (в) Коктейль мРНК факторов ускользания от иммунологического надзора ЕКВ (Е3/К3/В18R) вируса осповакцины.

[315] Трансфекции осуществляли согласно способу, описанному в Примере 4. График трансфекций схематически представлен на **Фиг. 11**.

[316] На **ФИГ. 12** показаны морфологические изменения в культурах каждой экспериментальной группы. В подгруппе, трансфицированной circRNA, из группы 4 Тх +ЕКВ (**Фиг. 12А**) колонии демонстрировали iPSC-подобную морфологию уже на 5 сутки, а на 9 сутки имелись сотни колоний. Напротив, в условиях с линейной РНК

Stemgent и Trilink у колоний не наблюдалось iPSC-подобной морфологии вплоть до 7 суток, а на 9 сутки имелись лишь десятки колоний. На **ФИГ. 12В** показано изменение морфологии в ходе перепрограммирования в группе 4 Тх -ЕКВ. На **ФИГ. 12С** показано изменение морфологии в ходе перепрограммирования в группе 2 Тх. Вставки в условии с трансфекцией *circRNA* демонстрировали iPSC-подобную морфологию колоний уже на 5 сутки и сотни колоний на 9 сутки. На **ФИГ. 12D** показано изменение морфологии в ходе перепрограммирования в группе 1 Тх. Изображения получали с объективом 4X для захвата как можно большего поля зрения. Ни в одной группе после 1 трансфекции не наблюдалось колоний iPSC.

[317] Дальнейший анализ проводили в группах с 4 трансфекциями (4Тх с коктейлем ЕКВ и без). Изображения получали на 6 сутки культивирования (через 2 суток после четвертой и последней трансфекции) и оценивали клеточную токсичность по числу округлых мертвых клеток в культурах (**Фиг. 13**). В культурах с *circRNA* имелись единичные округлые отражающие свет клетки независимо от присутствия или отсутствия ЕКВ, что указывало на низкую клеточную токсичность. Напротив, и мРНК Trilink, и набор Stemgent приводили к большому числу округлых или плавающих клеток в культурах, что позволяло предположить токсичность. Кроме того, на этой ранней стадии морфологический мезенхимально-эпителиальный переход (MET) гораздо более выражен в культурах с *circRNA* по сравнению с культурами Trilink и Stemgent (Trilink показывал наименьшую величину MET, по-прежнему наблюдалась веретенообразная морфология фибробластов). На основании указанных данных, в результате трансфекции и перепрограммирования при помощи *circRNA* клеточная гибель была меньше, чем при трансфекции/перепрограммировании при помощи мРНК, следовательно, в ходе раннего перепрограммирования (то есть в сутки активной трансфекции) наблюдалась меньшая токсичность. См. **Фиг. 13**.

[318] Эффективность перепрограммирования определяли посредством полуколичественного анализа окрашивания 16-дневных культур на Tra-1-81/Oct4. На 16 сутки перепрограммирования культуры фиксировали и окрашивали на Tra-1-81 и Oct4, и сканировали изображения лунок целиком с применением IncuCyte (**Фиг. 14**). Области, положительные по двум маркерам Tra-1-81 и Oct4, предположительно являются колониями iPSC. Ни один из типов РНК не обеспечивал успешное получение колоний iPSC только после 1 трансфекции (левая часть). В условиях трансфекции 2Тх+ЕКВ, 4Тх+ЕКВ и 4Тх-ЕКВ в культурах, трансфицированных *circRNA*, получалось

наибольшее количество областей, положительных по двум маркерам Tra-1-81/Oct4 по сравнению с мРНК Stemgent или Trilink. Это было справедливо независимо от плотности посева (25 тыс., 50 тыс. или 75 тыс.), что предполагало наибольшую эффективность перепрограммирования при помощи circRNA.

[319] Эффективность перепрограммирования для каждой экспериментальной группы приведена в Таблице 9 ниже.

Таблица 9. Эффективность перепрограммирования на 16 сутки

Условия трансфекции	Плотность посева	Тип РНК		
		circRNA	мРНК Trilink	мРНК Stemgent
1 Tx +ЕКВ	25 тыс.	(-)	(-)	(-)
	50 тыс.	(-)	(-)	(-)
	75 тыс.	НД	(-)	(-)
2 TxS +ЕКВ	25 тыс.	(++)	(-)	(+)
	50 тыс.	(+++)	(-/+)	(+)
	75 тыс.	(+++)	(-/+)	(+)
4 TxS +ЕКВ	25 тыс.	(++)	(-/+)	(+)
	50 тыс.	(+++)	(+)	ND
	75 тыс.	(+++)	(+)	(-/+)
4 TxS -ЕКВ	25 тыс.	(++)	(-/+)	(+)
	50 тыс.	(+++)	(+)	(++)
	75 тыс.	(+++)	(+)	(++)

ND - нет данных

(-) колоний iPSC не наблюдалось

(+), (++) , (+++) обозначают повышение уровней эффективности

перепрограммирования, где +++ является наиболее высоким, наиболее эффективным

[320] Как проиллюстрировано в Таблице 9, перепрограммирование фибробластов circRNA приводило к увеличению эффективности перепрограммирования независимо от использовавшегося в эксперименте протокола трансфекции и независимо от исходной плотности посева фибробластов. Количественные результаты дополнительно представлены на **Фиг. 14В**. Количественную оценку перепрограммирования выполняли для каждого условия перепрограммирования на 16 сутки с применением IncuCyte. В каждой лунке анализировали площадь, покрытую колониями iPSC, на основании морфологии на изображениях, полученных при фазовом контрасте, как процент конфлюэнтности лунки. Для всех условий трансфекции, за исключением 1Tx+ЕКВ, circRNA обеспечивала наибольшие площади, покрытые колониями iPSC (то есть больше

всего колоний iPSC) по сравнению мРНК Stemgent или мРНК Trilink. Ни один из типов РНК не обеспечивал успешное образование колоний iPSC только после 1 трансфекции. Среди различных условий трансфекции наибольшее различие между circRNA и мРНК наблюдалось при 2Тх+ЕКВ (2 трансфекции с применением коктейлей circRNA позволяли получить большое количество колоний iPSC, тогда как 2 трансфекции с применением мРНК Stemgent или Trilink не позволяли).

[321] В целом, перепрограммирование на основе circRNA более эффективно для перепрограммирования фибробластов по сравнению со способами, в которых применяется линейная мРНК. Перепрограммирование при помощи circRNA демонстрировало более низкую токсичность в ходе раннего перепрограммирования (в сутки активной трансфекции, **Фиг. 13**), в результате в более ранние моменты времени образовывалось больше iPSC-подобных колоний (**Фиг. 12**), в результате количество iPSC-подобных колоний было таким же или большим при меньшем количестве клеток на старте по сравнению с линейной мРНК (Таблица 9 и **Фиг. 14**), в результате скорость перепрограммирования была выше (колонии образовывались уже на 5 сутки или на 6 сутки, **Фиг. 12**) и в результате колонии созревали быстрее (на основании морфологии, **Фиг. 13**).

Пример 7. Доставка circRNA в CD34+ клетки

[322] Суспензионную культуру CD34+ клеток не удастся успешно перепрограммировать традиционными способами, поскольку низкая эффективность указанных способов делает необходимыми повторные трансфекции; однако, это токсично для клеток. Результаты, приведенные в предыдущих Примерах, демонстрируют, что перепрограммирование кольцевой РНК более эффективно и вызывает существенно меньшую клеточную гибель по сравнению с традиционными способами. Соответственно, предположили, что перепрограммирование CD34+ станет возможным с применением circRNA. Проводили эксперименты для определения оптимального способа доставки линейной и кольцевой РНК в гемопоэтические CD34+ стволовые клетки. Оценивали эффективность трансфекции РНК nGFP (линейной и кольцевой) с применением системы электропорации Neon и реагентов на основе липосом.

[323] Очищенные CD34+ клетки трансфицировали линейной или кольцевой РНК (nGFP), применяя один из трех способов трансфекции, указанных ниже, и оценивали экспрессию белка nGF после трансфекции РНК:

- (а) Нуклеофекция Neon (с применением системы трансфекции Neon от ThermoFisher)
- (б) Реагент липофектамин RNAiMAX (реагент, использованный для трансфекции фибробластов)
- (в) Липосомальный реагент для трансфекции DOTAP (MilliporeSigma)

[324] В результате нуклеофекции эффективность трансфекции составляла 80~100% (большинство клеток получали pGFP, независимо от применения мРНК или circRNA). В результате трансфекции RNAiMAX эффективность трансфекции была очень низкой. Трансфекция DOTAP приводила к слипанию клеток и отсутствию трансфекции.

Пример 8. Создание iPSC посредством перепрограммирования клеток в суспензии с применением circRNA

[325] Клетки в суспензии (такие как CD34⁺ клетки) перепрограммировали с применением circRNA для создания iPSC. Вкратце, очищенные CD34⁺ клетки (Hemacare) размножали в течение 3 суток («дни от -3 до 0») в среде для гемопоэтических стволовых клеток (HSC), содержащей коктейль из 5 цитокинов (SCF, TPO, FLT3-L, IL3 и IL6 по 100 нг/мл каждый).

[326] В сутки 0 (3 сутки после размножения) 100 тыс. клеток объединяли с коктейлями РНК для перепрограммирования и осуществляли электропорацию с применением устройства для электропорации Neon. Подвергнутые электропорации клетки переносили в 0,5 мл среды SCGM с цитокинами (SCF, TPO, FLT3-L, IL3 и IL6 по 100 нг/мл каждый) в неадгезивные лунки 24-луночного планшета. Клеткам давали восстановиться приблизительно в течение 48 часов перед переносом их в покрытый VTN 6-луночный планшет на 3 сутки или трансфицировали во второй раз.

[327] Трансфицированные клетки культивировали в покрытых VTN лунках и постепенно переводили в среду для плюрипотентных стволовых клеток (PSC) следующим образом:

- (а) На 4 и 6 сутки 1 мл отработанной среды заменяли 1 мл «минус» среды (среда для HSC без цитокинов)
- (б) На 7 сутки 1 мл отработанной среды из каждой заменяли 1 мл среды для PSC
- (в) В сутки 8-18 отработанную среду в лунках заменяли 100% средой для культивирования PSC
- (г) Появление предполагаемых клонов iPSC ожидалось на 12-18 сутки.

[328] В некоторых экспериментах клетки также приводили в контакт с B18R, возможно, в комбинации с дополнительными факторами ускользания от иммунологического надзора, такими как E3 и K3. В некоторых экспериментах клетки также приводили в контакт с BIRC6, circCORO1C или circMAN1A2.

[329] Отслеживали морфологические изменения клеток в направлении плюрипотентного состояния и количественно оценивали эффективности перепрограммирования. Отбирали и характеризовали клоны iPSC. В частности, анализировали экспрессию маркера плюрипотентности (с применением в качестве контроля эмбриональных стволовых клеток человека (hES) или iPSC), наряду с паттернами экспрессии генов, эпигенетикой и дифференцировкой в трех направлениях. Представляющие интерес клоны размножали, замораживали и хранили в жидком азоте для дальнейшего применения.

Пример 9. Применение кольцевой РНК, кодирующей MyoD, для индуцирования мышечной дифференцировки клеток

[330] Показали, что трансдукция MyoD в фибробласты (немышечные клетки) является достаточной, чтобы вызвать у них трансдифференцировку в миообласты (мышечные клетки). В данном Примере для создания мышечных клеток использовали circRNA, кодирующие MyoD.

[331] Вкратце, фибробласты кожи человека (HDF) высевали в 3 различных плотностях: 25 тыс., 50 тыс. или 75К тыс. на лунку в 6-луночные планшеты в сутки 0 в 10% среде для размножения фибробластов (FEM). В сутки 1 в 10% FEM добавляли 200 нг/мл рекомбинантного белка B18R. Клетки культивировали при нормоксии (и 5% CO₂ при 37°C) до конца эксперимента. Клетки трансфицировали ежедневно в течение 6 суток при помощи 50 нг circRNA или линейной мРНК (Trilink), кодирующих MyoD, с применением RNAiMAX. Среду заменяли приблизительно через 16 часов после трансфекции на 10% FEM, содержащую 200 нг/мл белка B18R. 10% среду FEM заменяли ежедневно и получали изображения клеток и исследовали изменения фенотипа (например, выживаемость, образование многоядерных мышечных трубочек). После финальной трансфекции на 6 сутки среду заменяли на 2% FEM, содержащую 200 нг/мл белка B18R, начиная с 7 суток.

[332] После перепрограммирования планшеты фиксировали на 12 сутки и исследовали при помощи IFC. Совместное окрашивание с применением антител, специфичных к десмину, тяжелой цепи миозина (MHC) и миогенину (MYOG)

осуществляли наряду с окрашиванием DAPI и для визуализации использовали микроскоп Nikon Ti2.

[333] Результаты показаны на **Фиг. 15А - Фиг. 15С**. На **ФИГ. 15А** показана экспрессия MyoD в трансдуцированных клетках. Культуры, трансфицированные как *circRNA*, так и линейной мРНК, положительно окрашивались на белок MyoD, тогда как ложнотрансфицированные культуры не окрашивались, что подтверждало экспрессию белка с применением обоих типов РНК. Через 24 ч после трансфекции количество белка, экспрессированного с применением *circRNA*, было ниже чем с применением линейной мРНК.

[334] На 6 сутки после финальной трансфекции культуральную среду заменяли на среду с пониженным содержанием сыворотки (от 10% до 2% сыворотки) для индуцирования слияния миобластов и образования многоядерных мышечных трубочек. На фазовоконтрастных изображениях, приведенных на **Фиг. 15В**, показаны примеры мышечных трубочек (стрелки), наблюдавшихся в культурах, трансфицированных как *circRNA* MyoD, так и линейной мРНК MyoD.

[335] На **ФИГ. 15С** и **Фиг. 15D** показана экспрессия специфических мышечных маркеров в культурах, трансфицированных MyoD. Мышечные трубочки, полученные в культурах, трансфицированных *circRNA* MyoD (**Фиг. 15С**), экспрессировали специфичные мышечные маркеры миогенин, десмин и тяжелую цепь миозина (МНС). На совмещенном изображении с окрашиванием на миогенин и десмин стрелками указаны многоядерные слитые клетки. При этом, мышечные трубочки, полученные из культур, трансфицированных линейной мРНК MyoD, экспрессировали десмин, но не миогенин и не МНС (**Фиг. 15D**). Количественная оценка данных этого эксперимента представлена на **Фиг. 17А-17С**.

[336] Десмин, миогенин и тяжелая цепь миозина (МНС) обычно считаются ранним, промежуточным и поздним маркерами мышечной дифференцировки, соответственно. Наблюдение, что мышечные трубочки, индуцированные *circRNA* MyoD, экспрессировали все три маркера, тогда как мышечные трубочки, индуцированные линейной мРНК MyoD, экспрессировали только десмин, но не миогенин и не МНС, указывало, что в случае *circRNA* MyoD обеспечивалась более терминальная мышечная дифференцировка, чем в случае линейной мРНК в том же временном интервале (12 суток).

[337] Взятые вместе, эти результаты указывают на лучшую общую выживаемость

клеток в культуре в ходе раннего перепрограммирования (сутки 6, см. **Фиг. 13**), и после полного перепрограммирования (см., например, **Фиг. 9D** и **Фиг. 9F** (сравните лунки с 25 тыс. для Stemgent, линейной и circRNA); см. также **Фиг. 14A** (сравните лунки с 25 тыс. для Stemgent, линейной и circRNA, когда выполняли 4 трансфекции (+ или – ЕКВ)) и **Фиг. 14B**).

Пример 10. Применение кольцевой РНК в комбинированном способе перепрограммирования и редактирования генома клетки

[338] Готовили композицию, содержащую (1) рекомбинантные кольцевые РНК, каждая из которых содержала последовательность, кодирующую по меньшей мере один фактор перепрограммирования, (2) нуклеиновую кислоту, кодирующую нуклеазу Cas9, и (3) нуклеиновую кислоту, кодирующую gRNA, нацеленную на последовательность, представляющую интерес. Композицию приводили в контакт с клеткой. Cas9 редактирует ДНК клетки в последовательности, представляющей интерес. Фактор перепрограммирования перепрограммирует клетку в плюрипотентное состояние. Соответственно, генотип и фенотип клетки изменяются.

Пример 11. Применение кольцевой РНК в комбинированном способе трансдифференцировки и редактирования генома клетки

[339] Готовили композицию, содержащую (1) рекомбинантные кольцевые РНК, каждая из которых содержала последовательность, кодирующую по меньшей мере один фактор трансдифференцировки, (2) нуклеиновую кислоту, кодирующую нуклеазу Cas9, и (3) нуклеиновую кислоту, кодирующую gRNA, нацеленную на последовательность, представляющую интерес. Композицию приводили в контакт с дифференцированной клеткой. Cas9 редактирует ДНК клетки в последовательности, представляющей интерес. Фактор трансдифференцировки перепрограммирует дифференцированную клетку в дифференцированную клетку другого типа. Соответственно, генотип и фенотип клетки изменяются.

[340] Приведенное выше описание настоящего изобретения является иллюстративным и не должно считаться исчерпывающим. Сущность изобретения определена формулой изобретения, приведенной далее, при этом эквиваленты входят в объем изобретения.

Литература

1. *Cell Stem Cell* (2010) 7: 618
2. *SCIENTIFIC REPORTS* (2012) 2: 657

3. *Nature Review Genetics* (2019) 20:675
4. *NATURE COMMUNICATIONS* (2017) 8: 1149

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Рекомбинантная кольцевая РНК, содержащая последовательность, кодирующую белок, где указанная последовательность, кодирующая белок, кодирует по меньшей мере один фактор перепрограммирования, где указанный по меньшей мере один фактор перепрограммирования представляет собой Oct3/4, Klf4, Sox2, Nanog, Lin28, c-Мус или L-Мус или их фрагмент или вариант.

2. Рекомбинантная кольцевая РНК по п. 1, где указанный по меньшей мере один фактор перепрограммирования представляет собой человеческий или гуманизированный фактор перепрограммирования.

3. Рекомбинантная кольцевая РНК по п. 1 или п. 2, где указанный по меньшей мере один фактор перепрограммирования представляет собой Oct3/4, и где Oct3/4 имеет последовательность SEQ ID NO: 1 или последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95%.

4. Рекомбинантная кольцевая РНК по п. 3, содержащая нуклеиновокислотную последовательность SEQ ID NO: 33 или последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95%.

5. Рекомбинантная кольцевая РНК по п. 1 или п. 2, где указанный по меньшей мере один фактор перепрограммирования представляет собой Klf4, и где Klf4 имеет последовательность SEQ ID NO: 2 или 3 или последовательность, идентичную им по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95%.

6. Рекомбинантная кольцевая РНК по п. 4, содержащая нуклеиновокислотную последовательность SEQ ID NO: 37 или последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95%.

7. Рекомбинантная кольцевая РНК по п. 1 или п. 2, где указанный по меньшей мере один фактор перепрограммирования представляет собой Sox2, и где Sox2 имеет последовательность SEQ ID NO: 4 или последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95%.

8. Рекомбинантная кольцевая РНК по п. 7, содержащая нуклеиновокислотную последовательность SEQ ID NO: 34 или последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95%.

9. Рекомбинантная кольцевая РНК по п. 1 или п. 2, где указанный по меньшей мере один фактор перепрограммирования представляет собой Nanog, и где Nanog имеет

последовательность SEQ ID NO: 5 или 6 или последовательность, идентичную им по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95%.

10. Рекомбинантная кольцевая РНК по п. 9, содержащая нуклеиновокислотную последовательность SEQ ID NO: 36 или последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95%.

11. Рекомбинантная кольцевая РНК по п. 1 или п. 2, где указанный по меньшей мере один фактор перепрограммирования представляет собой Lin28, и где Lin28 имеет последовательность SEQ ID NO: 7 или последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95%.

12. Рекомбинантная кольцевая РНК по п. 11, содержащая нуклеиновокислотную последовательность SEQ ID NO: 35 или последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95%.

13. Рекомбинантная кольцевая РНК по п. 1 или п. 2, где указанный по меньшей мере один фактор перепрограммирования представляет собой с-Мус, и где с-Мус имеет последовательность SEQ ID NO: 8 или 9 или последовательность, идентичную им по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95%.

14. Рекомбинантная кольцевая РНК по п. 13, содержащая нуклеиновокислотную последовательность SEQ ID NO: 38 или последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95%.

15. Рекомбинантная кольцевая РНК по п. 1 или п. 2, где указанный по меньшей мере один фактор перепрограммирования представляет собой L-Мус, и где L-Мус имеет последовательность любой из SEQ ID NO: 10-12 или последовательность, идентичную им по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95%.

16. Рекомбинантная кольцевая РНК по любому из пп. 1-15, где кольцевая РНК по существу является неиммуногенной.

17. Рекомбинантная кольцевая РНК по п. 16, содержащая один или более остатков М-6-метиладенозина (m^6A).

18. Рекомбинантная кольцевая РНК по любому из пп. 1-17, содержащая от приблизительно 200 нуклеотидов до приблизительно 5000 нуклеотидов.

19. Рекомбинантная кольцевая РНК по любому из пп. 1-18, содержащая участок внутренней посадки рибосомы (IRES), функционально связанный с последовательностью, кодирующей белок.

20. Комплекс, содержащий рекомбинантную кольцевую РНК по любому из

пп. 1-19 и липидную наночастицу (LNP).

21. Комплекс по п. 20, где LNP содержит катионный липид.

22. Комплекс по п. 20 или п. 21, где рекомбинантная кольцевая РНК и LNP конъюгированы.

23. Комплекс по п. 22, где рекомбинантная кольцевая РНК и LNP ковалентно конъюгированы.

24. Комплекс по п. 22, где рекомбинантная кольцевая РНК и LNP нековалентно конъюгированы.

25. Вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую рекомбинантную кольцевую РНК по любому из пп. 1-19.

26. Вектор по п. 25, который представляет собой вектор, не являющийся вектором на основе вируса.

27. Вектор по п. 26, где вектор, не являющийся вектором на основе вируса, представляет собой плазмиду.

28. Вектор по п. 25, который представляет собой вектор на основе вируса.

29. Вектор по п. 28, где вектор на основе вируса представляет собой вектор на основе ретровируса, вектор на основе герпесвируса, вектор на основе аденовируса, вектор на основе аденоассоциированного вируса (AAV), вектор на основе бакуловируса, вектор на основе альфавируса, вектор на основе пикорнавируса, вектор на основе вируса осповакцины или вектор на основе лентивируса.

30. Композиция, содержащая рекомбинантную кольцевую РНК по любому из пп. 1-19, комплекс по любому из пп. 20-24 или вектор по любому из пп. 25-29.

31. Композиция по п. 30, содержащая носитель и/или наполнитель.

32. Композиция, содержащая две или более рекомбинантных кольцевых РНК по любому из пп. 1-19, где композиция содержит комбинацию рекомбинантных кольцевых РНК, кодирующих факторы перепрограммирования, выбранные из приведенных в Таблице 2.

33. Композиция, содержащая две или более рекомбинантных кольцевых РНК, где композиция содержит комбинацию рекомбинантных кольцевых РНК, кодирующих факторы перепрограммирования, выбранные из:

- (1) Oct3/4, Klf4, Sox2 и c-Myc;
- (2) Oct3/4, Klf4, Sox2 и L-Myc;
- (3) Oct3/4, Klf4 и Sox2;

(4) Oct3/4, Klf4, Sox2, Nanog, Lin28 и c-Myc; или

(4) Oct3/4, Klf4, Sox2, Nanog, Lin28 и L-Myc.

34. Набор, содержащий рекомбинантную кольцевую РНК по любому из пп. 1-19, комплекс по любому из пп. 20-24, вектор по любому из пп. 25-29 или композицию по любому из пп. 30-33.

35. Клетка, содержащая рекомбинантную кольцевую РНК по любому из пп. 1-19, комплекс по любому из пп. 20-24, вектор по любому из пп. 25-29 или композицию по любому из пп. 30-33.

36. Клетка по п. 35, которая представляет собой эукариотическую клетку.

37. Клетка по п. 36, которая представляет собой клетку млекопитающего.

38. Клетка по п. 37, которая представляет собой клетку человека.

39. Клетка по любому из пп. 35-38, которая представляет собой CD34+ клетку.

40. Способ экспрессирования белка в клетке, включающий приведение клетки в контакт с кольцевой РНК по любому из пп. 1-19, комплексом по любому из пп. 20-24, вектором по любому из пп. 25-29 или композицией по любому из пп. 30-33 и поддержание клетки в условиях, при которых экспрессируется белок.

41. Способ по п. 40, включающий приведение клетки в контакт с дополнительной кольцевой РНК, где указанная дополнительная кольцевая РНК представляет собой circBIRC6, circCORO1C или circMAN1A2.

42. Способ по п. 41, где указанная дополнительная кольцевая РНК представляет собой circBIRC6, и где circBIRC6 имеет последовательность SEQ ID NO: 13 или последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95%.

43. Способ по п. 41, где указанная дополнительная кольцевая РНК представляет собой circCORO1C, и где circCORO1C имеет последовательность SEQ ID NO: 14 или последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95%.

44. Способ по п. 41, где указанная дополнительная кольцевая РНК представляет собой circMAN1A2, и где circMAN1A2 имеет последовательность SEQ ID NO: 15 или последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95%.

45. Способ по любому из пп. 40-44, включающий приведение клетки в контакт с кольцевой РНК, кодирующей B18R.

46. Способ по п. 45, где B18R имеет последовательность SEQ ID NO: 16 или последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95%.

47. Способ получения индуцированной плюрипотентной стволовой клетки (iPSC), включающий приведение соматической клетки в контакт с по меньшей мере одной рекомбинантной кольцевой РНК по любому из пп. 1-19, комплексом по любому из пп. 20-24, вектором по любому из пп. 25-29 и/или композицией по любому из пп. 30-33 и поддержание клетки в условиях, при которых получают перепрограммированную iPSC.

48. Способ по п. 47, включающий приведение клетки в контакт с по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8 или по меньшей мере 9 кольцевыми РНК.

49. Способ по п. 47 или п. 48, включающий приведение клетки в контакт с первой кольцевой РНК, кодирующей Oct4, второй кольцевой РНК, кодирующей Sox2, третьей кольцевой РНК, кодирующей Klf4, четвертой кольцевой РНК, кодирующей C-Мус или L-Мус, и пятой кольцевой РНК, кодирующей Lin28.

50. Способ по п. 47 или п. 48, включающий приведение клетки в контакт с первой кольцевой РНК, кодирующей Oct4, второй кольцевой РНК, кодирующей Sox2, третьей кольцевой РНК, кодирующей Klf4, четвертой кольцевой РНК, кодирующей C-Мус или L-Мус, пятой кольцевой РНК, кодирующей Lin28, и шестой кольцевой РНК, кодирующей Nanog.

51. Способ по п. 47, включающий приведение соматической клетки с по меньшей мере одной нуклеиновой кислотой, не являющейся кольцевой РНК, кодирующей один или более факторов перепрограммирования.

52. Способ по п. 51, где одна нуклеиновая кислота, не являющаяся кольцевой РНК, выбрана из мРНК (матричная РНК) или плазмиды.

53. Способ по любому из пп. 47-52, включающий приведение клетки в контакт с по меньшей мере одной дополнительной кольцевой РНК, где по меньшей мере одна дополнительная кольцевая РНК представляет собой circBIRC6, circCORO1C или circMAN1A2.

54. Способ по п. 53, где по меньшей мере одна дополнительная кольцевая РНК представляет собой BIRC6, и где BIRC6 имеет последовательность SEQ ID NO: 13 или последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на

95%.

55. Способ по п. 53, где по меньшей мере одна дополнительная кольцевая РНК представляет собой CORO1C, и где CORO1C имеет последовательность SEQ ID NO: 14 или последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95%.

56. Способ по п. 53, где по меньшей мере одна дополнительная кольцевая РНК представляет собой MAN1A2, и где MAN1A2 имеет последовательность SEQ ID NO: 15 или последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95%.

57. Способ по любому из пп. 47-56, включающий приведение клетки в контакт с кольцевой РНК, кодирующей B18R.

58. Способ по п. 57, где B18R имеет последовательность SEQ ID NO: 16 или последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95%.

59. Способ по любому из пп. 47-58, где клетка представляет собой фибробласт, клетку, имеющую происхождение из периферической крови, эндотелиальную клетку-предшественник, клетку, имеющую происхождение из пуповинной крови, кератиноцит, меланоцит, клетку, имеющую происхождение из жировой клетчатки, или клетку, имеющую происхождение из мочи.

60. Способ по любому из пп. 47-58, где клетка представляет собой CD34+ клетку.

61. Способ по любому из пп. 47-60, где клетка представляет собой адгезивную клетку.

62. Способ по любому из пп. 47-60, где клетка находится в суспензии.

63. Способ получения индуцированной плюрипотентной стволовой клетки (iPSC), включающий приведение CD34+ клетки в суспензии в контакт с по меньшей мере одной рекомбинантной кольцевой РНК по любому из пп. 1-19, комплексом по любому из пп. 20-24, вектором по любому из пп. 25-29 и/или композицией по любому из пп. 30-33 и поддержание клетки в условиях, при которых получают перепрограммированную iPSC.

64. Способ по любому из пп. 47-63, который обеспечивает одно или более из:

(1) увеличения количества перепрограммированных iPSC, присутствующих в конце культивирования, по сравнению со способом получения iPSC с применением

одной или более линейных РНК;

(2) увеличения скорости созревания перепрограммированных iPSC по сравнению со способом получения iPSC с применением одной или более линейных РНК; и/или

(3) уменьшения клеточной токсичности в один или более моментов времени в ходе перепрограммирования по сравнению со способом получения iPSC с применением одной или более линейных РНК.

65. Способ по любому из пп. 47-63, который обеспечивает одно или более из:

(1) увеличения количества перепрограммированных iPSC, присутствующих в конце культивирования, по сравнению со способом получения iPSC с применением одной или более линейных РНК;

(2) увеличения скорости созревания перепрограммированных iPSC по сравнению со способом получения iPSC с применением одной или более линейных РНК; и

(3) уменьшения клеточной токсичности в один или более моментов времени в ходе перепрограммирования по сравнению со способом получения iPSC с применением одной или более линейных РНК.

66. Способ по любому из пп. 47-65, включающий приведение клетки один или более раз в контакт с по меньшей мере одной из рекомбинантных кольцевых РНК по любому из пп. 1-19, комплексом по любому из пп. 20-24, вектором по любому из пп. 25-29 и/или композицией по любому из пп. 30-33.

67. Способ по п. 66, включающий приведение клетки в контакт два, три, четыре или более раз.

68. Способ по п. 66, включающий приведение клетки в контакт менее четырех раз.

69. Способ по п. 66, включающий приведение клетки в контакт от 2 до 4 раз.

70. iPSC, полученная способом по любому из пп. 47-69.

71. Дифференцированная клетка, полученная из iPSC по п. 70.

72. Дифференцированная клетка по п. 71, которая представляет собой мышечную клетку, нейрон, кардиомиоцит, гепатоцит, островковую клетку, кератиноцит, Т-клетку или NK-клетку.

73. Способ непосредственного превращения клетки из клетки первого типа в клетку второго типа, включающий приведение клетки в контакт с рекомбинантной кольцевой РНК по любому из пп. 1-19, комплексом по любому из пп. 20-24, вектором по любому из пп. 25-29 и/или композицией по любому из пп. 30-33 и поддержание клетки в

условиях, при которых клетка превращается в клетку второго типа.

74. Способ по п. 73, где клетка первого типа представляет собой соматическую клетку и клетка второго типа представляет собой соматическую клетку.

75. Способ по п. 73, где клетка второго типа представляет собой мышечную клетку, нейрон, кардиомиоцит, гепатоцит, островковую клетку, кератиноцит, Т-клетку или NK-клетку.

76. Способ по п. 74 или п. 75, где клетка первого типа представляет собой фибробласт.

77. Способ по п. 76, где клетку приводят в контакт с множеством рекомбинантных кольцевых РНК, где множество кольцевых РНК содержит кольцевые РНК, кодирующие любую из комбинаций факторов трансдифференцировки, перечисленных в столбце В Таблицы 6.

78. Способ по любому из пп. 73-77, где клетка не входит в промежуточное плюрипотентное состояние.

79. Способ по любому из пп. 73-78, где клетка превращается непосредственно из клетки первого типа в клетку второго типа, не становясь клеткой-предшественником.

80. Способ по п. 78 или п. 79, где клетка первого типа представляет собой фибробласт, клетка второго типа представляет собой мышечную клетку, а рекомбинантная кольцевая РНК кодирует myoD.

81. Клетка, полученная способом по любому из пп. 73-80.

82. Способ перепрограммирования и редактирования генома клетки, включающий:

приведение клетки в контакт с:

(1) рекомбинантной кольцевой РНК, содержащей последовательность, кодирующую белок, где последовательность, кодирующая белок, кодирует по меньшей мере один фактор перепрограммирования, и

(2) ферментом, способным редактировать ДНК или РНК клетки, или кодирующей его нуклеиновой кислотой.

83. Способ по п. 82, где рекомбинантная кольцевая РНК представляет собой рекомбинантную кольцевую РНК по любому из пп. 1-19.

84. Способ по п. 82 или п. 83, где фермент представляет собой TALEN (эффektorная нуклеаза, подобная активаторам транскрипции), NgAgo (эндонуклеаза argonaute), SGN (эндонуклеаза, направляемая структурой) или RGN (РНК-направляемая

эндонуклеаза) или их модифицированный или укороченный вариант.

85. Способ по любому из пп. 82-84, где фермент представляет собой нуклеазу Cas9 (CRISPR-ассоциированный белок 9), нуклеазу Cas12(a) (Cpf1), нуклеазу Cas12b, нуклеазу Cas12c, TrpB-подобную нуклеазу, нуклеазу Cas13a (C2c2), нуклеазу Cas13b, нуклеазу Cas 14 или их модифицированный или укороченный вариант.

86. Способ по п. 85, где фермент представляет собой нуклеазу Cas9, и нуклеаза Cas9 выделена или имеет происхождение из *S. pyogenes* или *S. aureus*.

87. Способ по п. 82 или п. 83, где фермент представляет собой ADAR (аденозин-дезаминаза, действующая на РНК).

88. Способ по любому из пп. 82-84, где фермент представляет собой РНК-направляемую нуклеазу.

89. Способ по п. 88, где РНК-направляемая нуклеаза выбрана из любой из APG05083.1, APG07433.1, APG07513.1, APG08290.1, APG05459.1, APG04583.1 и APG1688.1, APG05733.1, APG06207.1, APG01647.1, APG08032.1, APG05712.1, APG01658.1, APG06498.1, APG09106.1, APG09882.1, APG02675.1, APG01405.1, APG06250.1, APG06877.1, APG09053.1, APG04293.1, APG01308.1, APG06646.1, APG09748, APG07433.1, APG00969, APG03128, APG09748, APG00771, APG02789, APG09106, APG02312, APG07386, APG09980, APG05840, APG05241, APG07280, APG09866 и APG00868.

90. Способ по любому из пп. 82-89, дополнительно включающий приведение клетки в контакт с направляющей РНК или кодирующей ее нуклеиновой кислотой.

91. Способ по любому из пп. 82-90, где клетку приводят в контакт с рекомбинантной кольцевой РНК перед приведением ее в контакт с ферментом или кодирующей его нуклеиновой кислотой.

92. Способ по любому из пп. 82-90, где клетку приводят в контакт с рекомбинантной кольцевой РНК после приведения ее в контакт с ферментом или кодирующей его нуклеиновой кислотой.

93. Способ по любому из пп. 82-90, где клетку приводят в контакт с рекомбинантной кольцевой РНК приблизительно в то же время, когда ее приводят в контакт с ферментом или кодирующей его нуклеиновой кислотой.

94. Клетка, полученная способом по любому из пп. 82-93.

95. Способ трансдифференцировки и редактирования генома клетки, включающий:

приведение клетки в контакт с:

(1) рекомбинантной кольцевой РНК, содержащей последовательность, кодирующую белок, где последовательность, кодирующая белок, кодирует по меньшей мере один фактор трансдифференцировки, и

(2) ферментом, способным редактировать ДНК или РНК клетки, или кодирующей его нуклеиновой кислотой.

96. Способ по п. 95, где указанный по меньшей мере один фактор трансдифференцировки представляет собой любой из MyoD, C/EBP α , C/EBP β , Pdx1, Ngn3, Mafa, Pdx1, Hnf4 α , Foxa1, Foxa2, Foxa3, Ascl1 (также известный как Mash1), Brn2, Myt1l, miR-124, Brn2, Myt1l, Ascl1, Nurr1, Lmx1a, Ascl1, Brn2, Myt1l, Lmx1a, FoxA2, Oct4, Sox2, Klf4 и c-Myc, Tbx5, Mef2c, Gata-4 или Mesp1.

97. Способ по п. 95, где указанный по меньшей мере один фактор трансдифференцировки представляет собой любой из факторов трансдифференцировки, указанных в Таблице 6.

98. Способ по п. 95, включающий два или более факторов трансдифференцировки, выбранных из перечисленных в Таблице 6.

99. Способ по любому из пп. 95-98, где фермент представляет собой TALEN, NgAgo, SGN или RGN или их модифицированный или укороченный вариант.

100. Способ по любому из пп. 95-98, где фермент представляет собой нуклеазу Cas9, нуклеазу Cas12(a) (Cpf1), нуклеазу Cas12b, нуклеазу Cas12c, TrpB-подобную нуклеазу, нуклеазу Cas13a (C2c2), нуклеазу Cas13b, нуклеазу Cas 14 или их модифицированный или укороченный вариант.

101. Способ по п. 100, где нуклеаза представляет собой нуклеазу Cas9, которая выделена или имеет происхождение из *S. pyogenes* или *S. aureus*.

102. Способ по любому из пп. 95-98, где фермент представляет собой ADAR (аденозин-дезаминаза, действующая на РНК).

103. Способ по любому из пп. 95-98, где фермент представляет собой РНК-направляемую нуклеазу.

104. Способ по п. 103, где РНК-направляемая нуклеаза выбрана из любой из APG05083.1, APG07433.1, APG07513.1, APG08290.1, APG05459.1, APG04583.1 и APG1688.1, APG05733.1, APG06207.1, APG01647.1, APG08032.1, APG05712.1, APG01658.1, APG06498.1, APG09106.1, APG09882.1, APG02675.1, APG01405.1, APG06250.1, APG06877.1, APG09053.1, APG04293.1, APG01308.1, APG06646.1,

APG09748, APG07433.1, APG00969, APG03128, APG09748, APG00771, APG02789, APG09106, APG02312, APG07386, APG09980, APG05840, APG05241, APG07280, APG09866 и APG00868.

105. Способ по любому из пп. 95-104, дополнительно включающий приведение клетки в контакт с направляющей РНК или кодирующей ее нуклеиновой кислотой.

106. Способ по любому из пп. 95-105, где клетку приводят в контакт с рекомбинантной кольцевой РНК перед приведением ее в контакт с ферментом или кодирующей его нуклеиновой кислотой.

107. Способ по любому из пп. 95-105, где клетку приводят в контакт с рекомбинантной кольцевой РНК после приведения ее в контакт с ферментом или кодирующей его нуклеиновой кислотой.

108. Способ по любому из пп. 95-105, где клетку приводят в контакт с рекомбинантной кольцевой РНК приблизительно в то же время, когда ее приводят в контакт с ферментом или кодирующей его нуклеиновой кислотой.

109. Клетка, полученная способом по любому из пп. 95-108.

110. Способ перепрограммирования клетки, включающий приведение клетки в контакт с одним или более из:

- (1) кольцевой РНК, кодирующей фактор перепрограммирования;
- (2) кольцевой РНК, не кодирующей какой-либо белок или миРНК (малая интерферирующая РНК);
- (3) кольцевой или линейной РНК, кодирующей миРНК; и/или
- (4) кольцевой или линейной РНК, кодирующей вирусный белок.

111. Способ перепрограммирования клетки, включающий приведение клетки в контакт с каждым из:

- (1) кольцевой РНК, кодирующей фактор перепрограммирования;
- (2) кольцевой РНК, не кодирующей какой-либо белок или миРНК;
- (3) кольцевой или линейной РНК, кодирующей миРНК; и
- (4) кольцевой или линейной РНК, кодирующей вирусный белок.

112. Способ перепрограммирования клетки, включающий приведение клетки в контакт с каждым из:

- (1) кольцевой РНК, кодирующей фактор перепрограммирования;
- (3) кольцевой или линейной РНК, кодирующей миРНК; и
- (4) кольцевой или линейной РНК, кодирующей вирусный белок.

113. Способ перепрограммирования клетки, включающий приведение клетки в контакт с каждым из:

- (1) кольцевой РНК, кодирующей фактор перепрограммирования; и
- (2) кольцевой или линейной РНК, кодирующей миРНК.

114. Способ по любому из пп. 110-113, где любая из кольцевой РНК или линейной РНК конъюгирована с липидной наночастицей.

115. Способ по любому из пп. 110-113, где фактор перепрограммирования представляет собой любой из факторов перепрограммирования, указанных в Таблице 1, Таблице 2 или Таблице 3.

116. Способ по любому из пп. 110-115, где кольцевая РНК представляет собой рекомбинантную кольцевую РНК по любому из пп. 1-19.

117. Способ по п. 111, где кольцевая РНК, не кодирующая какой-либо белок или миРНК, представляет собой *circBIRC6*, *circCORO1c* или *circMAN1A2*.

118. Способ по любому из пп. 111-113, где миРНК представляет собой *miR302d*, *miR302a*, *miR302c*, *miR302b* или *miR367*.

119. Способ по любому из пп. 111-113, где миРНК представляет собой *miR146a*, *miR485*, *miR182*, *nc886*, *miR-155*, *miR526a* или *miR132*.

120. Способ по любому из пп. 111-112, где вирусный белок представляет собой B18R, E3 или K3.

121. Способ по любому из пп. 111-112, где вирусный белок представляет собой любой из вирусных белков, указанных в Таблице 4.

122. Способ по любому из пп. 111-112, где вирусный белок представляет собой B18R, E3 и K3.

123. Клетка, полученная способом по любому из пп. 111-122.

124. Композиция, содержащая выделенную соматическую клетку, содержащую одну или более экзогенных кольцевых РНК, кодирующих фактор перепрограммирования.

125. Композиция по п. 124, где соматическая клетка содержит одну или более экзогенных кольцевых РНК, кодирующих фактор перепрограммирования, выбранный из факторов перепрограммирования, указанных в Таблице 1, Таблице 2 или Таблице 3.

126. Композиция по п. 124, где соматическая клетка содержит одну или более экзогенных кольцевых РНК, где каждая из одной или более экзогенных кольцевых РНК кодирует фактор перепрограммирования, выбранный из Oct3/4, Klf4, Sox2, Nanog, Lin28

и c-Myc.

127. Композиция по п. 124, где соматическая клетка содержит шесть экзогенных кольцевых РНК, где каждая из кольцевых РНК кодирует один из Oct3/4, Klf4, Sox2, Nanog, Lin28 и c-Myc.

128. Композиция по п. 124, где соматическая клетка содержит одну или более экзогенных кольцевых РНК, где каждая из одной или более эндогенных кольцевых РНК кодирует фактор перепрограммирования, выбранный из Oct3/4, Klf4, Sox2, Nanog, Lin28 и L-Myc.

129. Композиция по п. 124, где соматическая клетка содержит шесть экзогенных кольцевых РНК, где каждая из кольцевых РНК кодирует один из Oct3/4, Klf4, Sox2, Nanog, Lin28 и L-Myc.

130. Композиция по п. 124, где соматическая клетка содержит четыре экзогенных кольцевых РНК, где каждая из кольцевых РНК кодирует один из Oct3/4, Klf4, Sox2 и c-Myc.

131. Композиция по п. 124, где соматическая клетка содержит четыре экзогенных кольцевых РНК, где каждая из кольцевых РНК кодирует один из Oct3/4, Klf4, Sox2 и L-Myc.

132. Композиция по п. 124, где соматическая клетка содержит четыре экзогенных кольцевых РНК, где каждая из кольцевых РНК кодирует один из Oct3/4, Klf4 и Sox2.

133. Композиция по любому из пп. 124-132, где клетка содержит по меньшей мере один, по меньшей мере два или все три экзогенных вирусных белка, выбранных из B18R, E3 и K3.

134. Композиция по любому из пп. 124-133, где клетка содержит экзогенную миРНК.

135. Композиция по любому из пп. 124-133, где клетка содержит кольцевую РНК, кодирующую экзогенную миРНК.

136. Композиция по п. 134 или п. 135, где миРНК выбрана из miR302a, miR302b, miR302c, miR302d и miR367.

137. Композиция, содержащая трансдифференцированную клетку, где трансдифференцированная клетка содержит одну или более экзогенных кольцевых РНК, кодирующих фактор трансдифференцировки.

138. Композиция по п. 137, где фактор трансдифференцировки представляет

собой любой из факторов трансдифференцировки или комбинаций факторов трансдифференцировки, указанных в Таблице 6.

139. Композиция по п. 137 или п. 138, где трансдифференцированная клетка представляет собой любую из клеток второго типа, указанных в Таблице 6.

140. Композиция по п. 137 или п. 138, где трансдифференцированная клетка имеет происхождение от клетки первого типа, представляющей собой любую из клеток первого типа, указанных в Таблице 6.

141. Способ перепрограммирования клетки, обеспечивающий меньшую гибель клеток по сравнению со способом с применением линейной РНК, включающий приведение клетки в контакт с кольцевой РНК по любому из пп. 1-19, комплексом по любому из пп. 20-24, вектором по любому из пп. 25-29 или композицией по любому из пп. 30-33 и поддержание клетки в условиях, при которых экспрессируется белок.

142. Способ по п. 141, включающий приведение клетки в контакт с множеством кольцевых РНК, где каждая кольцевая РНК кодирует один из следующих факторов перепрограммирования:

- (1) Oct3/4, Klf4, Sox2, Nanog, Lin28 и c-Myc;
- (2) Oct3/4, Klf4, Sox2, Nanog и Lin28;
- (3) Oct3/4, Klf4, Sox2, Nanog, Lin28 и L-Myc;
- (4) Oct3/4, Klf4, Sox2, Nanog и Lin28;
- (5) Oct3/4, Klf4, Sox2 и c-Myc;
- (6) Oct3/4, Klf4, Sox2 и L-Myc; или
- (7) Oct3/4, Klf4 и Sox2.

143. Способ сокращения времени от перепрограммирования до сбора, включающий приведение клетки в контакт с кольцевой РНК по любому из пп. 1-19, комплексом по любому из пп. 20-24, вектором по любому из пп. 25-29 или композицией по любому из пп. 30-33 и поддержание клетки в условиях, при которых экспрессируется белок, где время сокращается по сравнению со способом перепрограммирования с применением линейной РНК.

144. Способ по п. 143, включающий приведение клетки в контакт с множеством кольцевых РНК, где каждая кольцевая РНК кодирует один из следующих факторов перепрограммирования:

- (1) Oct3/4, Klf4, Sox2, Nanog, Lin28 и c-Myc;
- (2) Oct3/4, Klf4, Sox2, Nanog и Lin28;

- (3) Oct3/4, Klf4, Sox2, Nanog, Lin28 и L-Myc;
- (4) Oct3/4, Klf4, Sox2, Nanog и Lin28;
- (5) Oct3/4, Klf4, Sox2 и c-Myc;
- (6) Oct3/4, Klf4, Sox2 и L-Myc; или
- (7) Oct3/4, Klf4 и Sox2.

145. Способ сокращения числа трансфекций для индуцирования эффекта перепрограммирования клетки по сравнению со способом с применением линейной РНК, включающий приведение клетки в контакт с кольцевой РНК по любому из пп. 1-19, комплексом по любому из пп. 20-24, вектором по любому из пп. 25-29 или композицией по любому из пп. 30-33 и поддержание клетки в условиях, при которых экспрессируется белок.

146. Способ по п. 145, включающий приведение клетки в контакт с множеством кольцевых РНК, где каждая кольцевая РНК кодирует один из следующих факторов перепрограммирования:

- (1) Oct3/4, Klf4, Sox2, Nanog, Lin28 и c-Myc;
- (2) Oct3/4, Klf4, Sox2, Nanog и Lin28;
- (3) Oct3/4, Klf4, Sox2, Nanog, Lin28 и L-Myc;
- (4) Oct3/4, Klf4, Sox2, Nanog и Lin28;
- (5) Oct3/4, Klf4, Sox2 и c-Myc;
- (6) Oct3/4, Klf4, Sox2 и L-Myc; или
- (7) Oct3/4, Klf4 и Sox2.

147. Способ увеличения длительности экспрессии белка в клетке, включающий приведение клетки в контакт с кольцевой РНК по любому из пп. 1-19, комплексом по любому из пп. 20-24, вектором по любому из пп. 25-29 или композицией по любому из пп. 30-33 и поддержание клетки в условиях, при которых экспрессируется белок, и где длительность экспрессии белка увеличивается по сравнению с трансфекцией клетки линейной РНК, кодирующей тот же самый белок.

148. Способ по п. 147, включающий приведение клетки в контакт с множеством кольцевых РНК, где каждая кольцевая РНК кодирует один из следующих факторов перепрограммирования:

- (1) Oct3/4, Klf4, Sox2, Nanog, Lin28 и c-Myc;
- (2) Oct3/4, Klf4, Sox2, Nanog и Lin28;
- (3) Oct3/4, Klf4, Sox2, Nanog, Lin28 и L-Myc;

- (4) Oct3/4, Klf4, Sox2, Nanog и Lin28;
- (5) Oct3/4, Klf4, Sox2 и c-Myc;
- (6) Oct3/4, Klf4, Sox2 и L-Myc; или
- (7) Oct3/4, Klf4 и Sox2.

149. Способ улучшения эффективности перепрограммирования клетки, включающий приведение клетки в контакт с кольцевой РНК по любому из пп. 1-19, комплексом по любому из пп. 20-24, вектором по любому из пп. 25-29 или композицией по любому из пп. 30-33 и поддержание клетки в условиях, при которых экспрессируется белок, и где эффективность перепрограммирования клетки увеличивается по сравнению со способом перепрограммирования клетки с применением линейной РНК.

150. Способ по п. 149, включающий приведение клетки в контакт с множеством кольцевых РНК, где каждая кольцевая РНК кодирует один из следующих факторов перепрограммирования:

- (1) Oct3/4, Klf4, Sox2, Nanog, Lin28 и c-Myc;
- (2) Oct3/4, Klf4, Sox2, Nanog и Lin28;
- (3) Oct3/4, Klf4, Sox2, Nanog, Lin28 и L-Myc;
- (4) Oct3/4, Klf4, Sox2, Nanog и Lin28;
- (5) Oct3/4, Klf4, Sox2 и c-Myc;
- (6) Oct3/4, Klf4, Sox2 и L-Myc; или
- (7) Oct3/4, Klf4 и Sox2.

151. Способ увеличения числа колоний перепрограммированной клетки, образованных после перепрограммирования, включающий приведение клетки в контакт с кольцевой РНК по любому из пп. 1-19, комплексом по любому из пп. 20-24, вектором по любому из пп. 25-29 или композицией по любому из пп. 30-33 и поддержание клетки в условиях, при которых экспрессируется белок, где число колоний перепрограммированной клетки, образованных после перепрограммирования, увеличивается по сравнению со способом перепрограммирования клетки с применением линейной РНК.

152. Способ по п. 151, включающий приведение клетки в контакт с множеством кольцевых РНК, где каждая кольцевая РНК кодирует один из следующих факторов перепрограммирования:

- (1) Oct3/4, Klf4, Sox2, Nanog, Lin28 и c-Myc;
- (2) Oct3/4, Klf4, Sox2, Nanog и Lin28;

- (3) Oct3/4, Klf4, Sox2, Nanog, Lin28 и L-Myc;
- (4) Oct3/4, Klf4, Sox2, Nanog и Lin28;
- (5) Oct3/4, Klf4, Sox2 и c-Myc;
- (6) Oct3/4, Klf4, Sox2 и L-Myc; или
- (7) Oct3/4, Klf4 и Sox2.

153. Способ перепрограммирования клетки в суспензии, включающий приведение клетки в суспензии в контакт с кольцевой РНК по любому из пп. 1-19, комплексом по любому из пп. 20-24, вектором по любому из пп. 25-29 или композицией по любому из пп. 30-33 и поддержание клетки в условиях, при которых экспрессируется белок.

154. Способ по п. 153, включающий приведение клетки в суспензии в контакт с множеством кольцевых РНК, где каждая кольцевая РНК кодирует один из следующих факторов перепрограммирования:

- (1) Oct3/4, Klf4, Sox2, Nanog, Lin28 и c-Myc;
- (2) Oct3/4, Klf4, Sox2, Nanog и Lin28;
- (3) Oct3/4, Klf4, Sox2, Nanog, Lin28 и L-Myc;
- (4) Oct3/4, Klf4, Sox2, Nanog и Lin28;
- (5) Oct3/4, Klf4, Sox2 и c-Myc;
- (6) Oct3/4, Klf4, Sox2 и L-Myc; или
- (7) Oct3/4, Klf4 и Sox2.

155. Способ по п. 153 или п. 154, где клетка экспрессирует CD34.

156. Способ улучшения морфологического созревания перепрограммированных колоний, включающий приведение клетки в суспензии в контакт с кольцевой РНК по любому из пп. 1-19, комплексом по любому из пп. 20-24, вектором по любому из пп. 25-29 или композицией по любому из пп. 30-33 и поддержание клетки в условиях, при которых экспрессируется белок, где морфологическое созревание улучшается по сравнению со способом перепрограммирования клетки с применением линейной РНК.

157. Способ по п. 156, включающий приведение клетки в суспензии в контакт с множеством кольцевых РНК, где каждая кольцевая РНК кодирует один из следующих факторов перепрограммирования:

- (1) Oct3/4, Klf4, Sox2, Nanog, Lin28 и c-Myc;
- (2) Oct3/4, Klf4, Sox2, Nanog и Lin28;

(3) Oct3/4, Klf4, Sox2, Nanog, Lin28 и L-Myc;

(4) Oct3/4, Klf4, Sox2, Nanog и Lin28;

(5) Oct3/4, Klf4, Sox2 и c-Myc;

(6) Oct3/4, Klf4, Sox2 и L-Myc; или

(7) Oct3/4, Klf4 и Sox2.

158. Суспензионная культура, содержащая одну или более клеток, экспрессирующих CD34, где клетки, экспрессирующие CD34, содержат одну или более экзогенных *circRNA* (кольцевых РНК), кодирующих фактор перепрограммирования.

159. Суспензионная культура по п. 158, где фактор перепрограммирования выбран из Oct3/4, Klf4, Sox2, Nanog, Lin28, c-Myc и L-Myc.

160. Суспензионная культура по п. 158, где каждая из клеток, экспрессирующих CD34, содержит множество *circRNA*, кодирующих одну из следующих комбинаций факторов перепрограммирования:

(1) Oct3/4, Klf4, Sox2, Nanog, Lin28 и c-Myc;

(2) Oct3/4, Klf4, Sox2, Nanog и Lin28;

(3) Oct3/4, Klf4, Sox2, Nanog, Lin28 и L-Myc;

(4) Oct3/4, Klf4, Sox2, Nanog и Lin28;

(5) Oct3/4, Klf4, Sox2 и c-Myc;

(6) Oct3/4, Klf4, Sox2 и L-Myc; или

(7) Oct3/4, Klf4 и Sox2.

161. Набор, содержащий:

(1) сосуд, содержащий кольцевую РНК, кодирующую OCT4, и буфер;

(2) сосуд, содержащий кольцевую РНК, кодирующую SOX2, и буфер;

(3) сосуд, содержащий *circRNA*, кодирующую KLF4, и буфер; и

(4) упаковку и инструкции для этого.

162. Набор по п. 161, содержащий:

сосуд, содержащий кольцевую РНК, кодирующую c-MYC или L-MYC, и буфер;

сосуд, содержащий *circRNA*, кодирующую LIN28, и буфер;

сосуд, содержащий *circRNA*, кодирующую NANOG, и буфер;

или их комбинацию.

163. Способ индуцирования мезенхимально-эпителиального перехода (MET) соматической клетки в iPSC, включающий приведение соматической клетки в контакт с одной или более кольцевыми РНК, кодирующими фактор перепрограммирования.

164. Способ индуцирования мезенхимально-эпителиального перехода (MET) соматической клетки в iPSC, включающий приведение соматической клетки в контакт с одной или более кольцевыми РНК, кодирующими фактор перепрограммирования.

165. Способ трансдифференцировки клетки, включающий приведение клетки в контакт с рекомбинантной кольцевой РНК, содержащей последовательность, кодирующую белок, где последовательность, кодирующая белок, кодирует по меньшей мере один фактор трансдифференцировки.

166. Способ по п. 165, где указанный по меньшей мере один фактор трансдифференцировки представляет собой любой из MyoD, C/EBP α , C/EBP β , Pdx1, Ngn3, Mafa, Pdx1, Hnf4 α , Foxa1, Foxa2, Foxa3, Ascl1 (также известный как Mash1), Brn2, Myt1l, miR-124, Brn2, Myt1l, Ascl1, Nurr1, Lmx1a, Ascl1, Brn2, Myt1l, Lmx1a, FoxA2, Oct4, Sox2, Klf4 и c-Myc, Tbx5, Mef2c, Gata-4 или Mesp1.

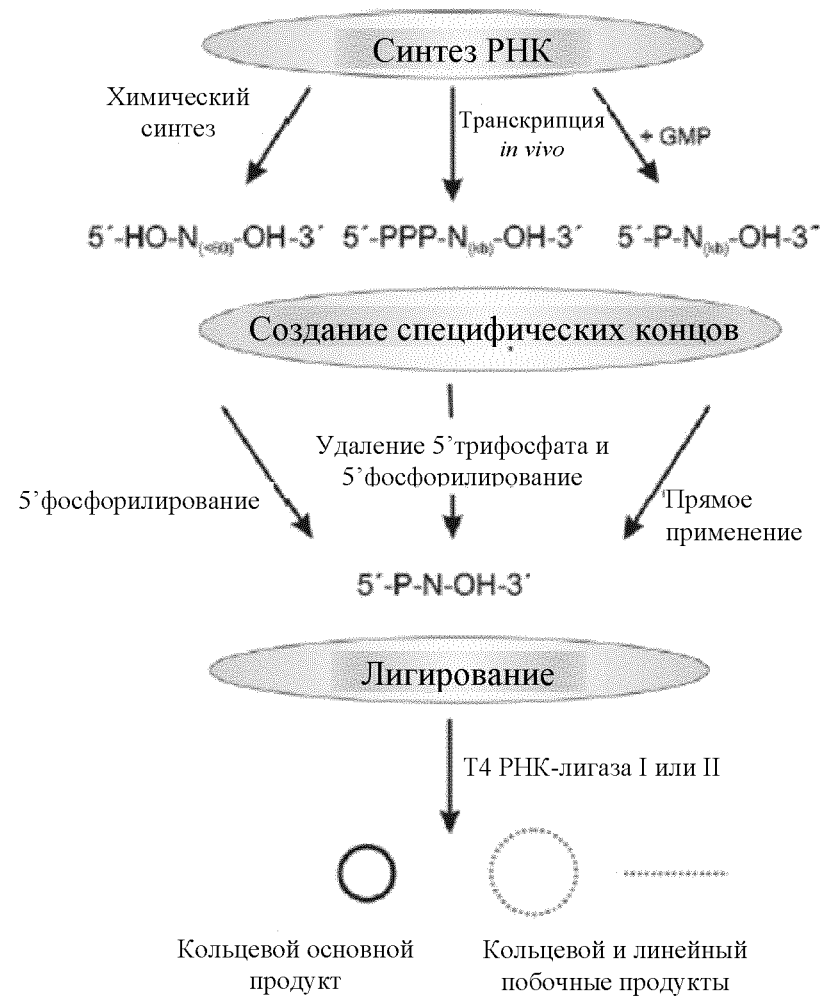
167. Способ по п. 165, где указанный по меньшей мере один фактор трансдифференцировки представляет собой любой из факторов трансдифференцировки, указанных в Таблице 6.

168. Способ по п. 167, где клетку приводят в контакт с кольцевыми РНК, кодирующими комбинацию факторов трансдифференцировки, перечисленных в любой из комбинаций, указанных в столбце В Таблицы 6.

169. Способ дифференцировки iPSC, включающий приведение iPSC в контакт с кольцевой РНК, кодирующей один или более следующих факторов дифференцировки: RORA, HLF, MYB, KLF4, ERG, SOX4, LUC, HOXA9, HOXA10 или HOXA5.

170. Способ по п. 169, где iPSC трансдифференцируется в Т-клетку.

171. Клетка, полученная способом по любому из пп. 165-170.



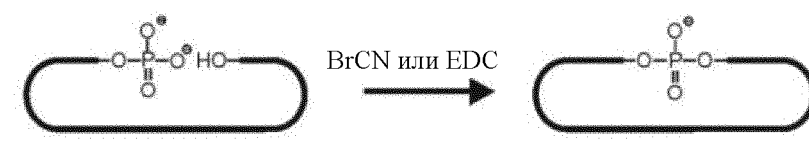
Фиг. 1

Композиции и способы для
перепрограммирования клеток
с применением кольцевой ДНК

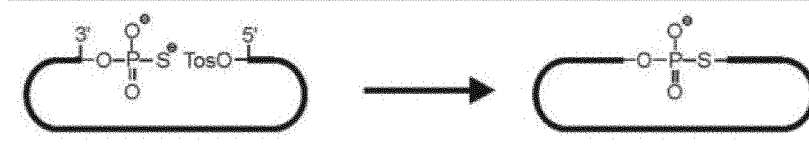
Фиг. 2А



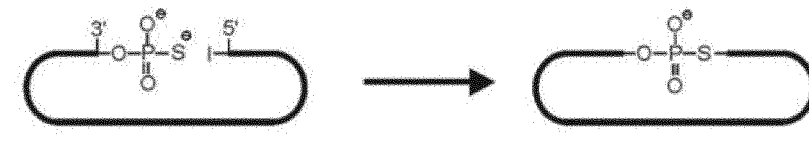
Фиг. 2В



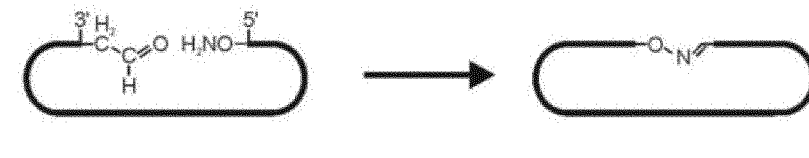
Фиг. 2С



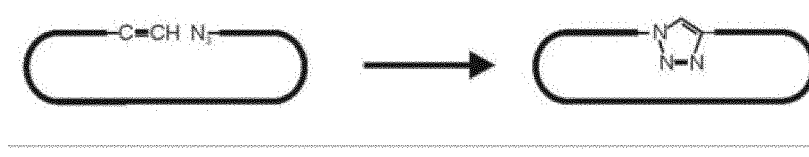
Фиг. 2D



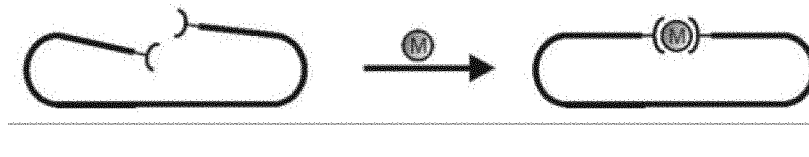
Фиг. 2Е

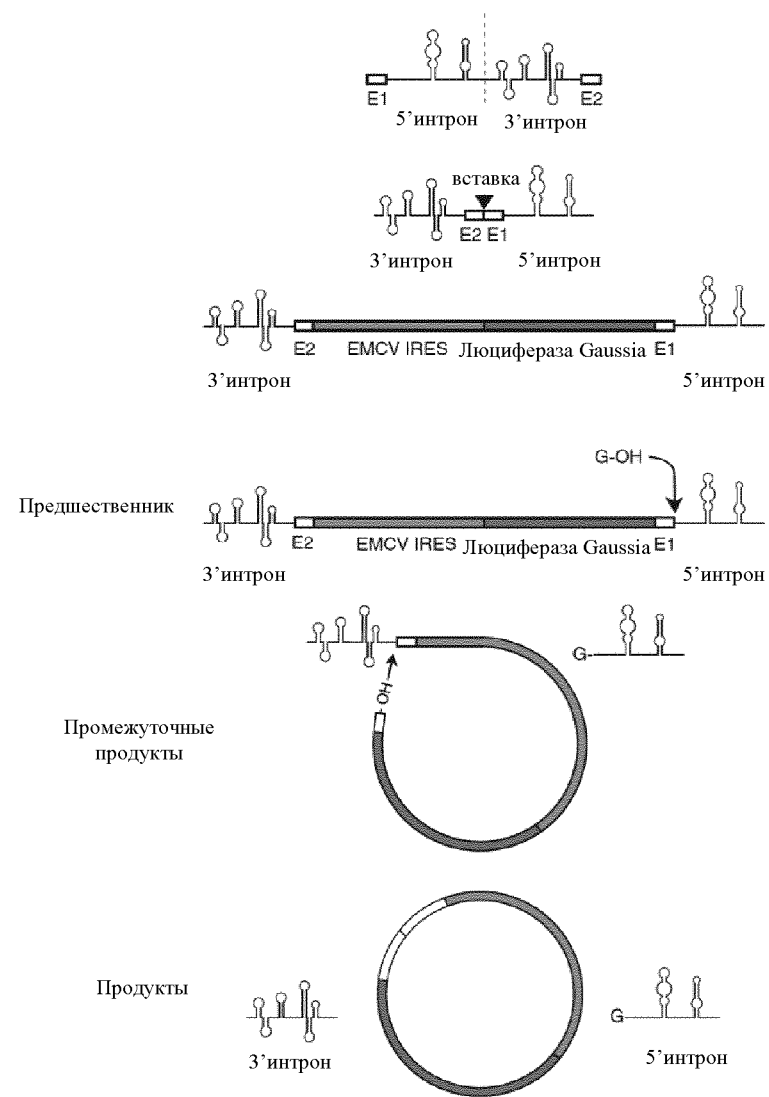


Фиг. 2F

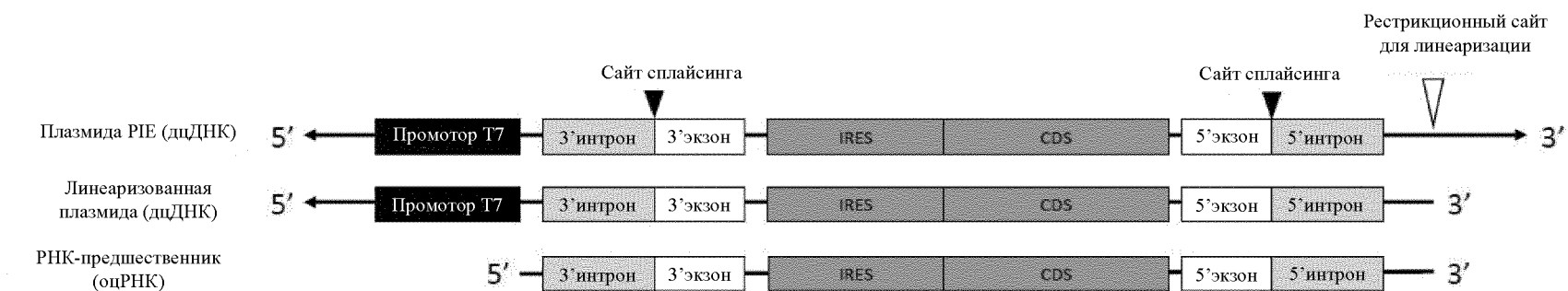


Фиг. 2G

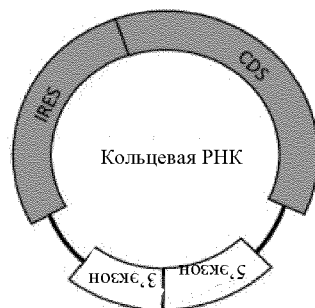




Фиг. 3



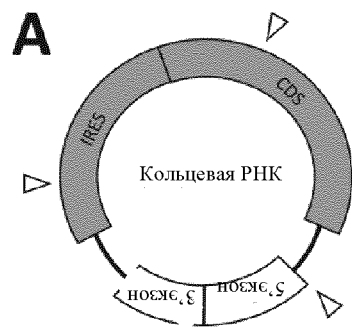
Кольцевая РНК и интроны



Фиг. 4

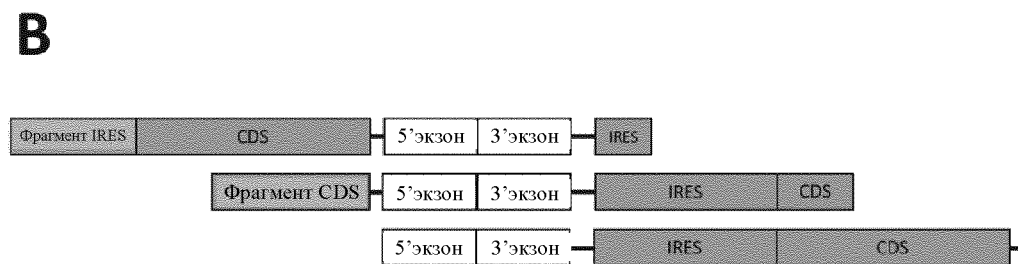
Композиции и способы для перепрограммирования клеток с применением кольцевой ДНК

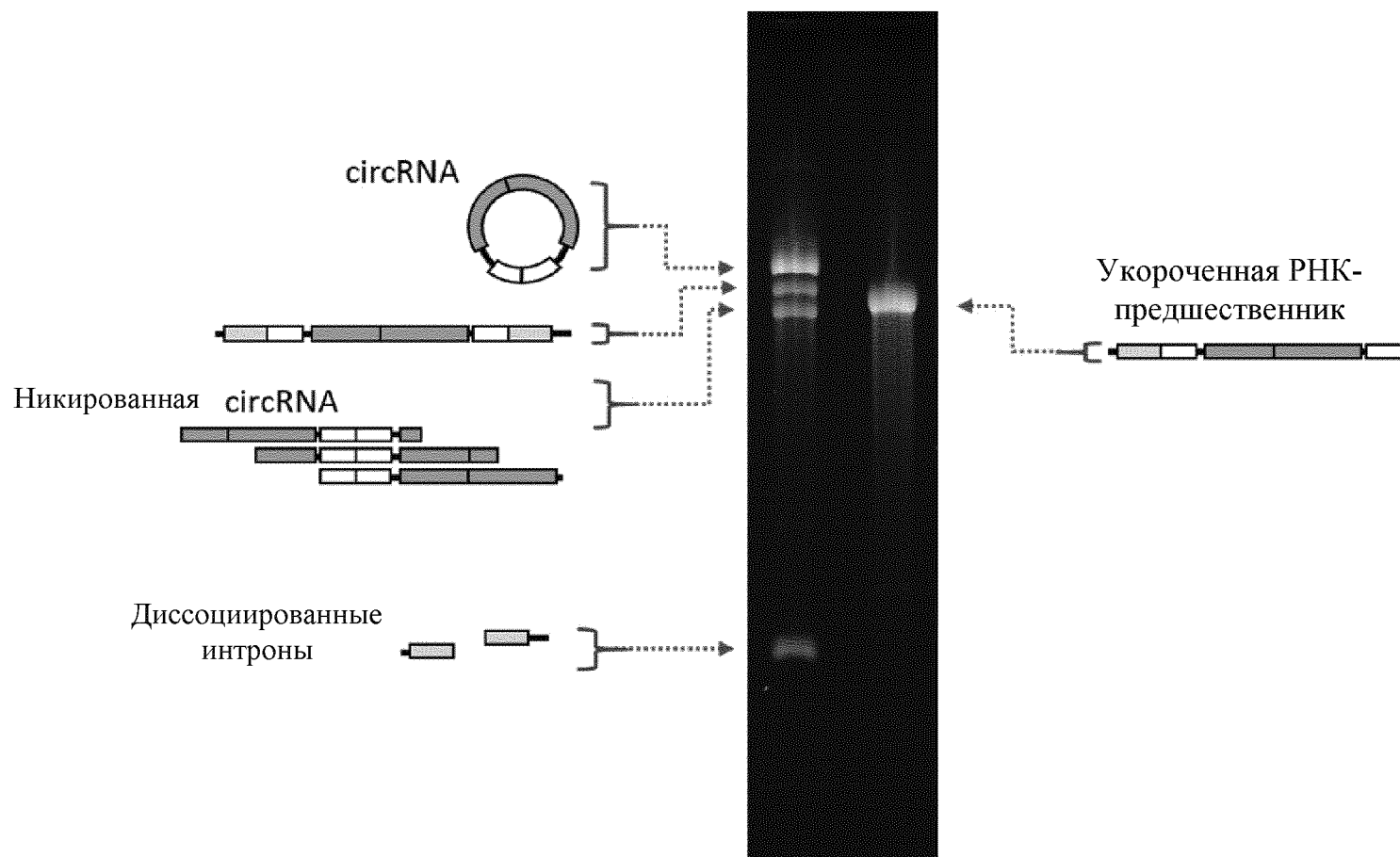
Фиг. 5А



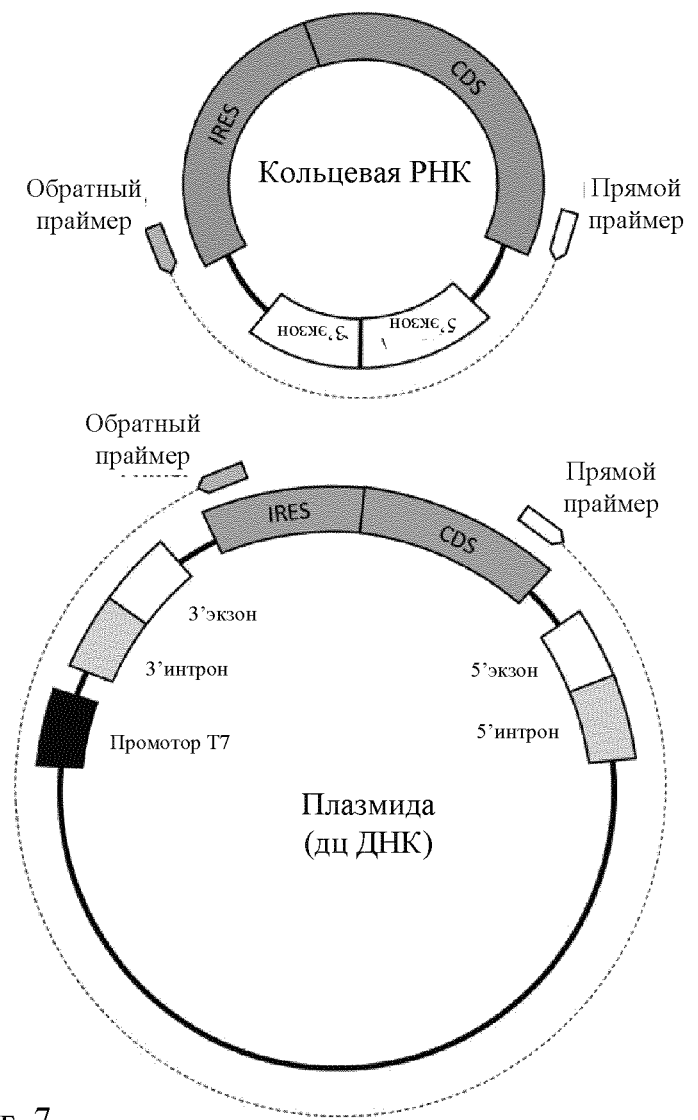
Повреждение
РНК
(никирование)

Фиг. 5В

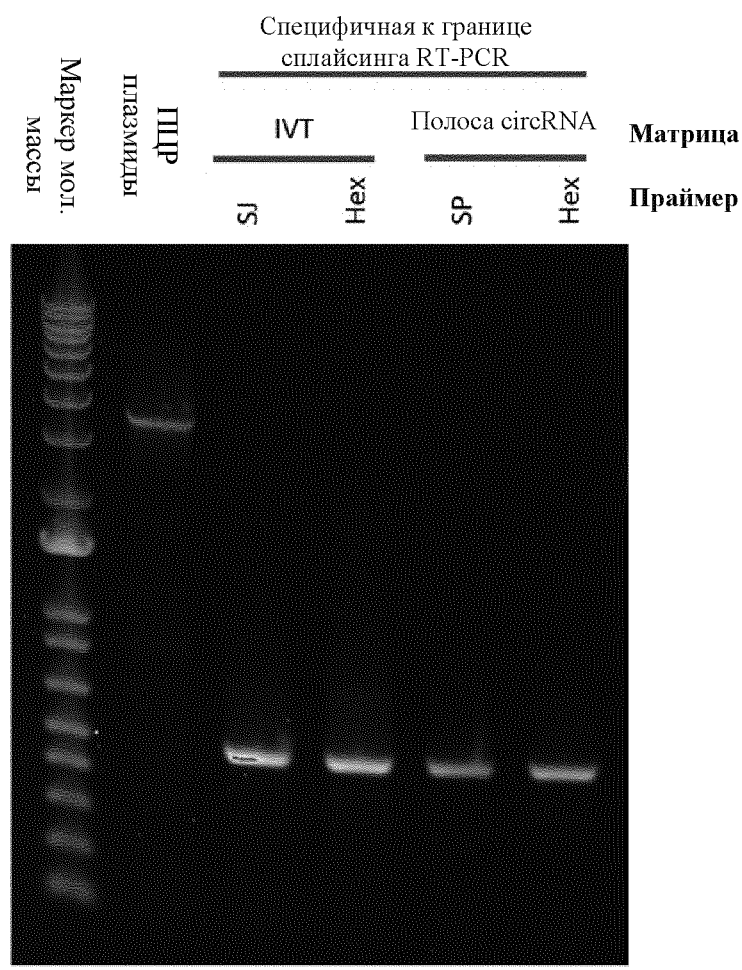


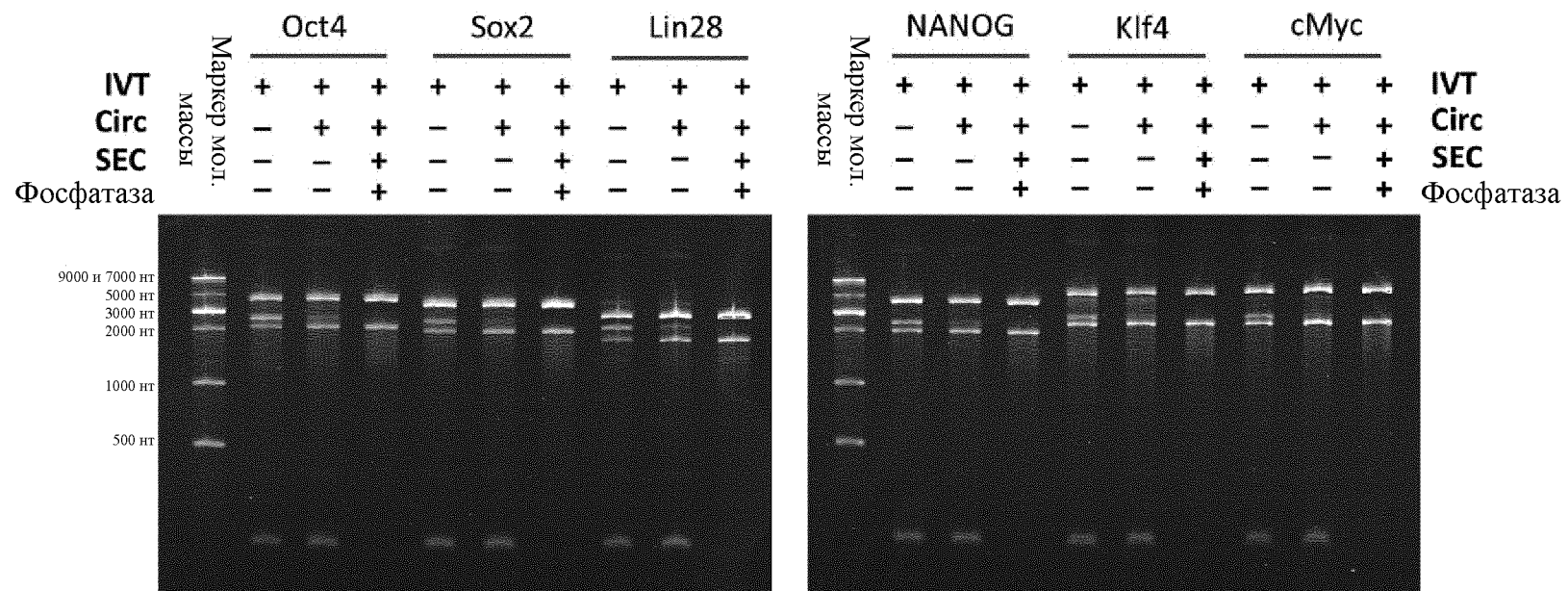


Фиг. 6

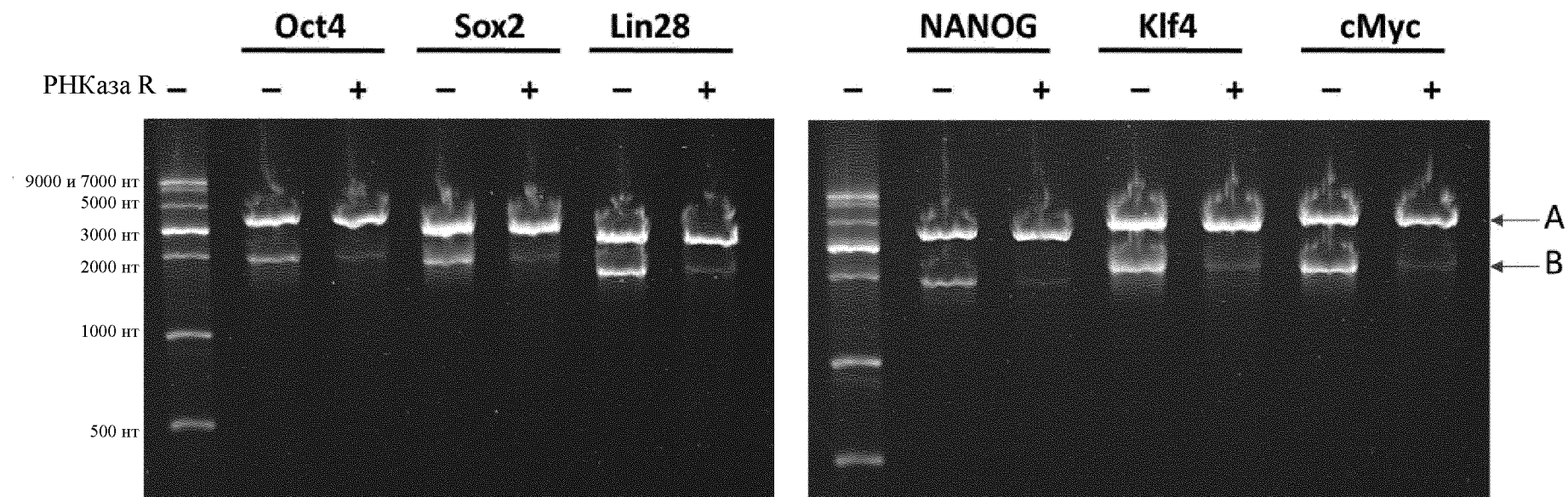


Фиг. 7





Фиг. 8А



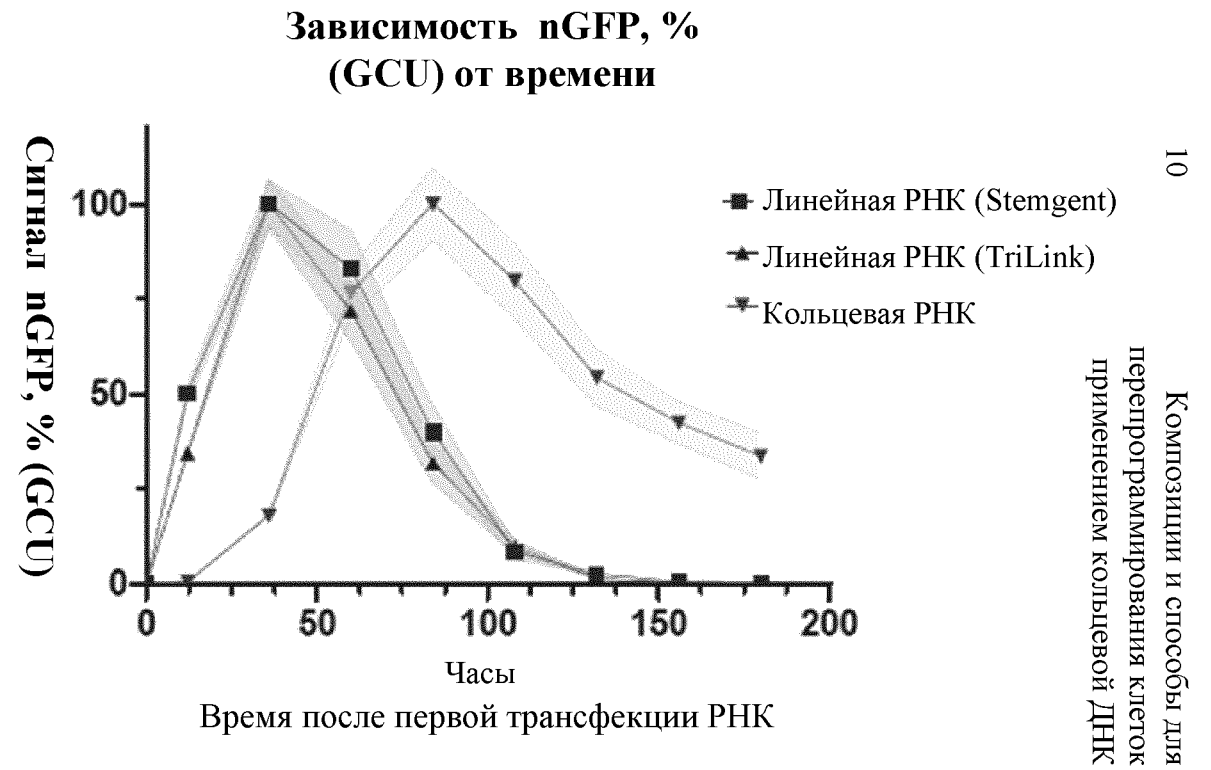
Фиг. 8В

Композиции и способы для
перепрограммирования клеток
с применением кольцевой ДНК

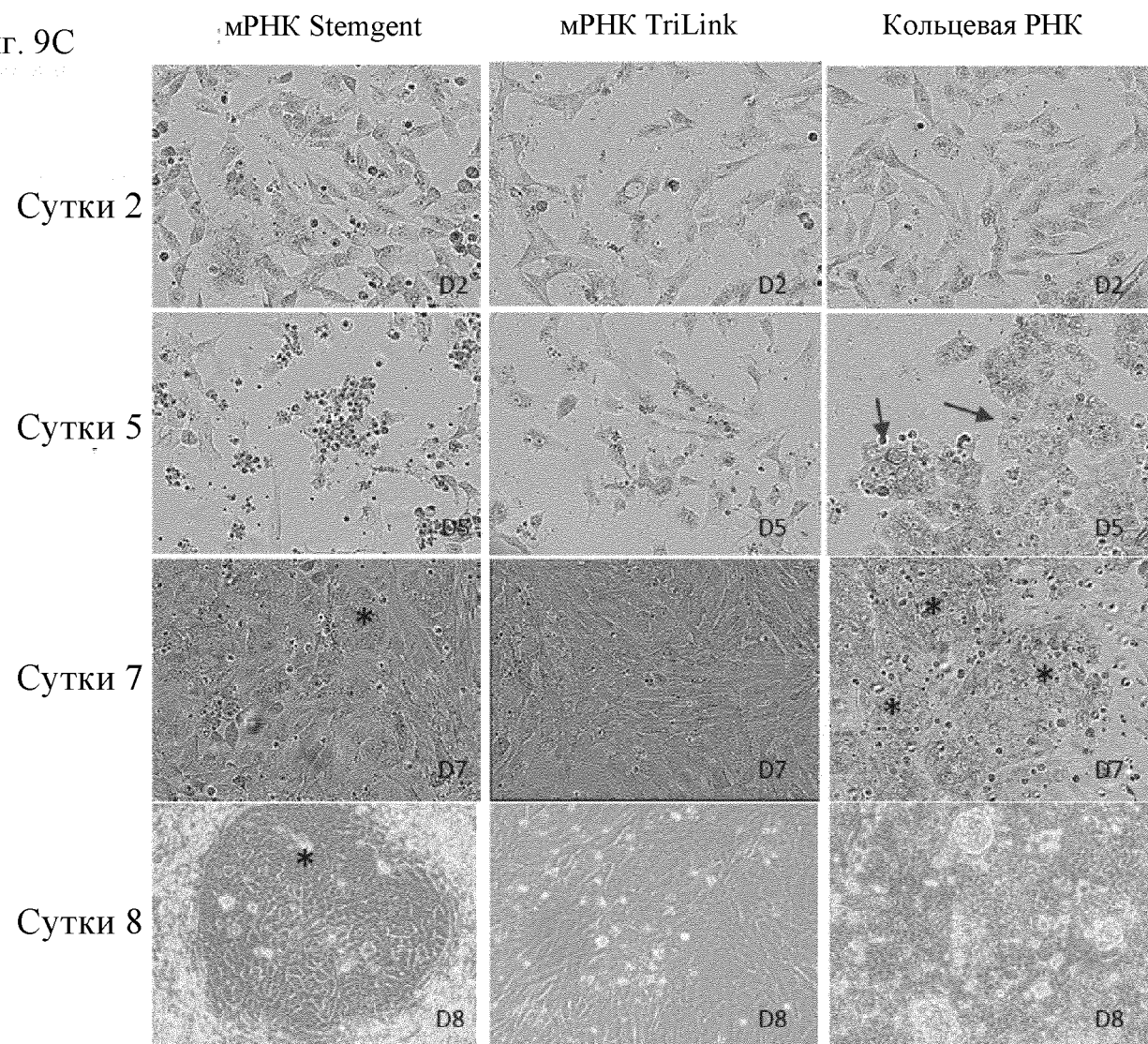
Фиг. 9А



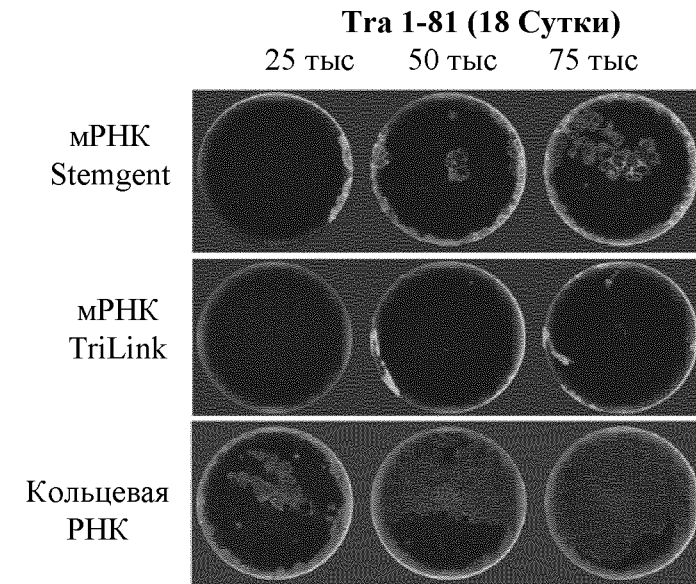
Фиг. 9В



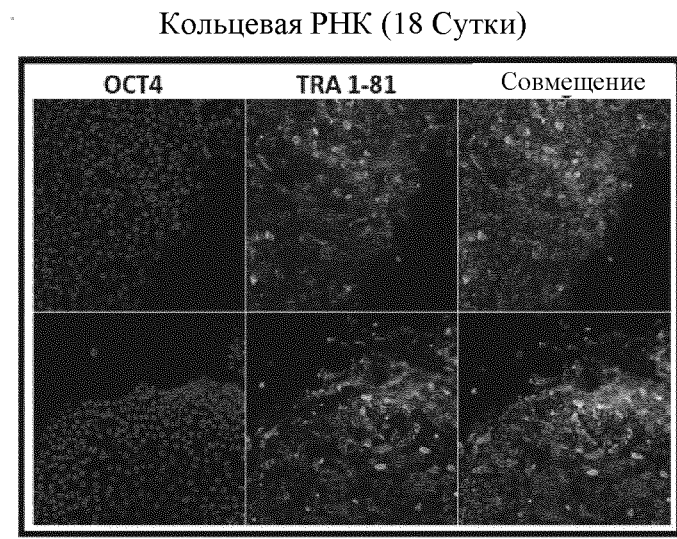
Фиг. 9С



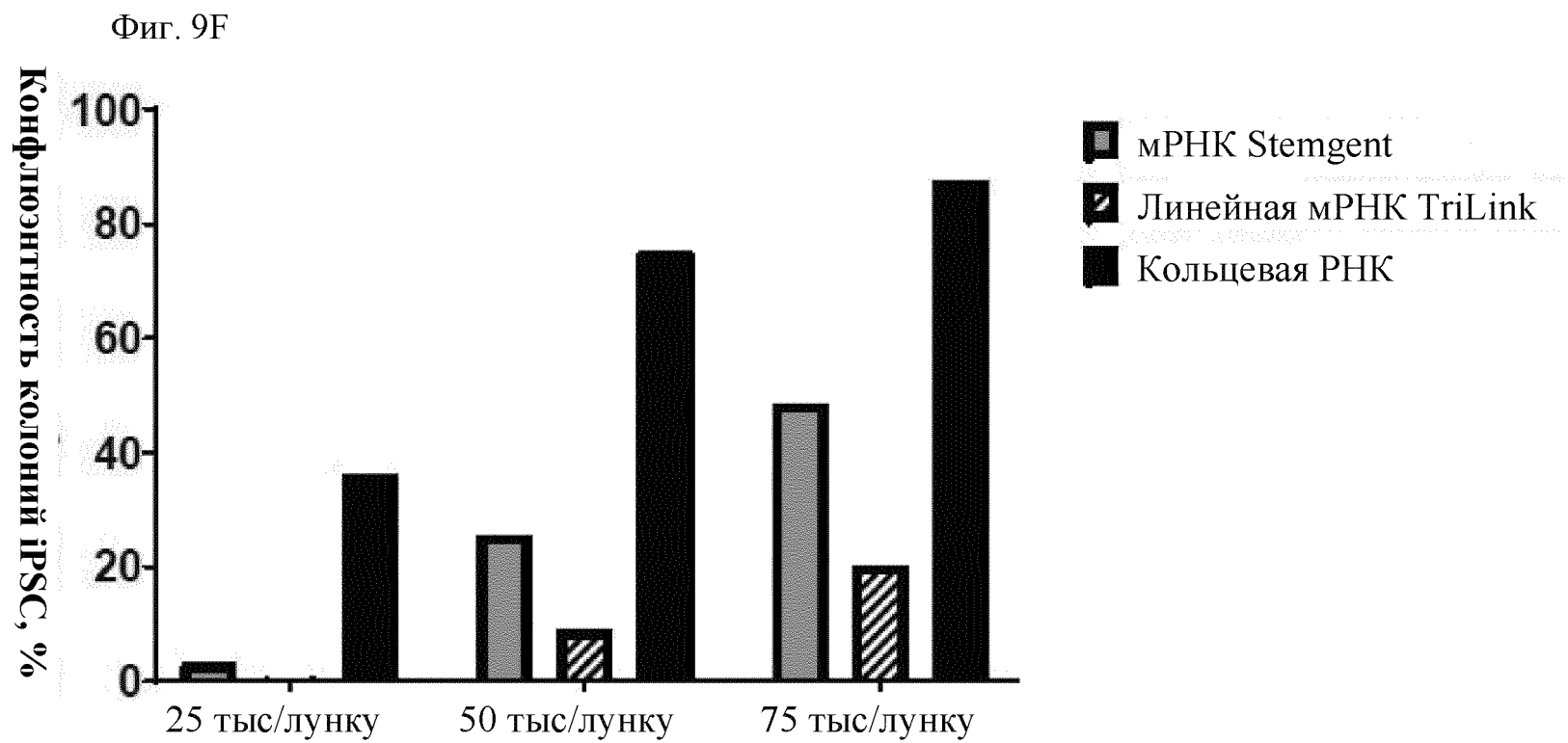
Фиг. 9D



Фиг. 9Е

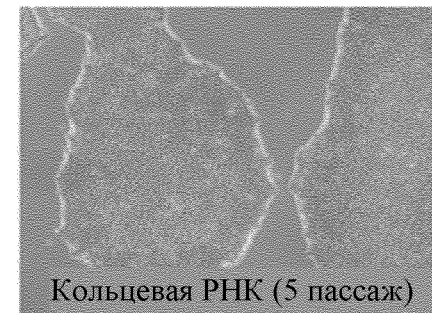
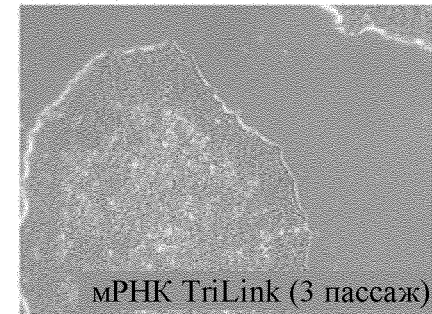
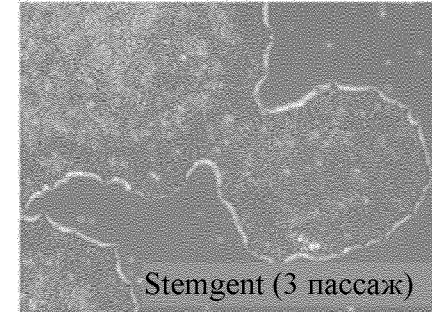


Композиции и способы для
перепрограммирования клеток
с применением кольцевой ДНК

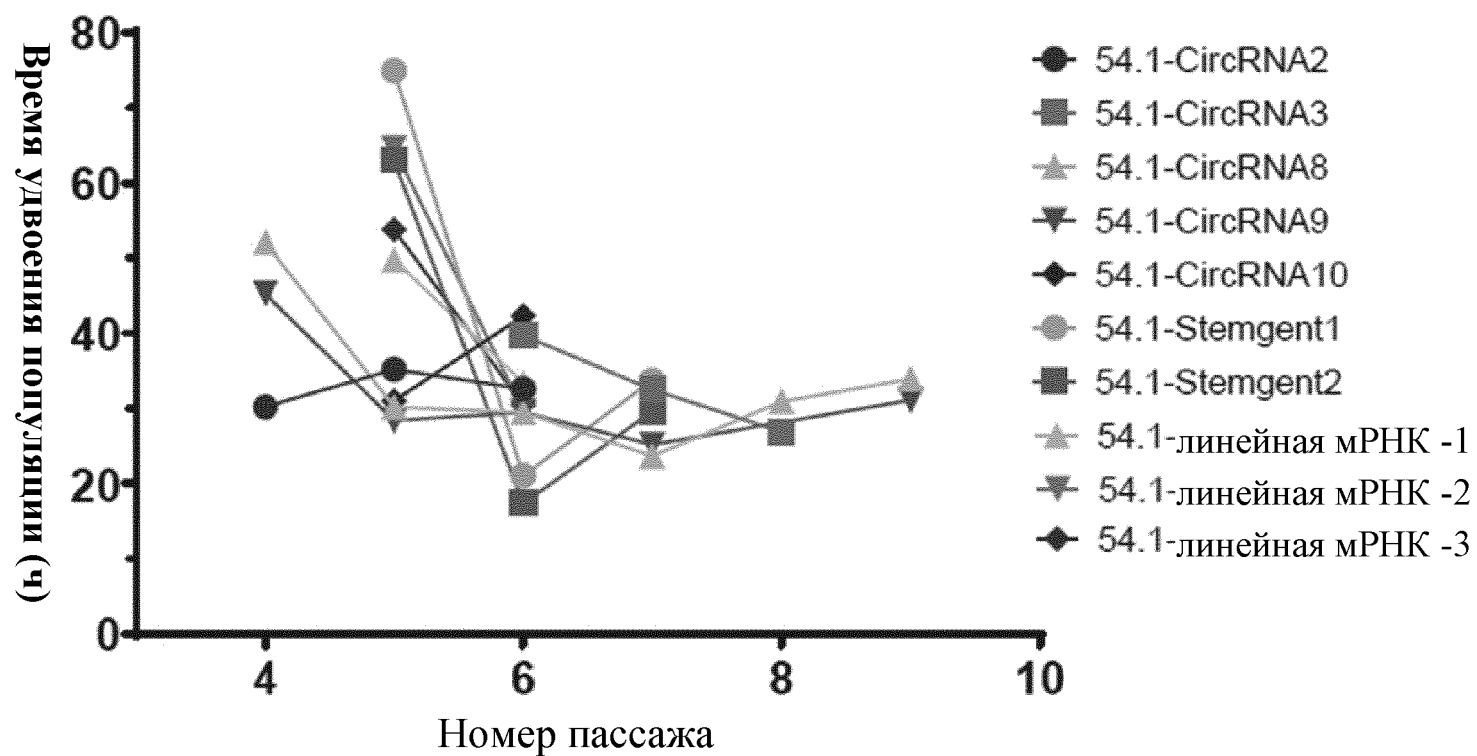


Фиг. 10А

Клоны iPSC



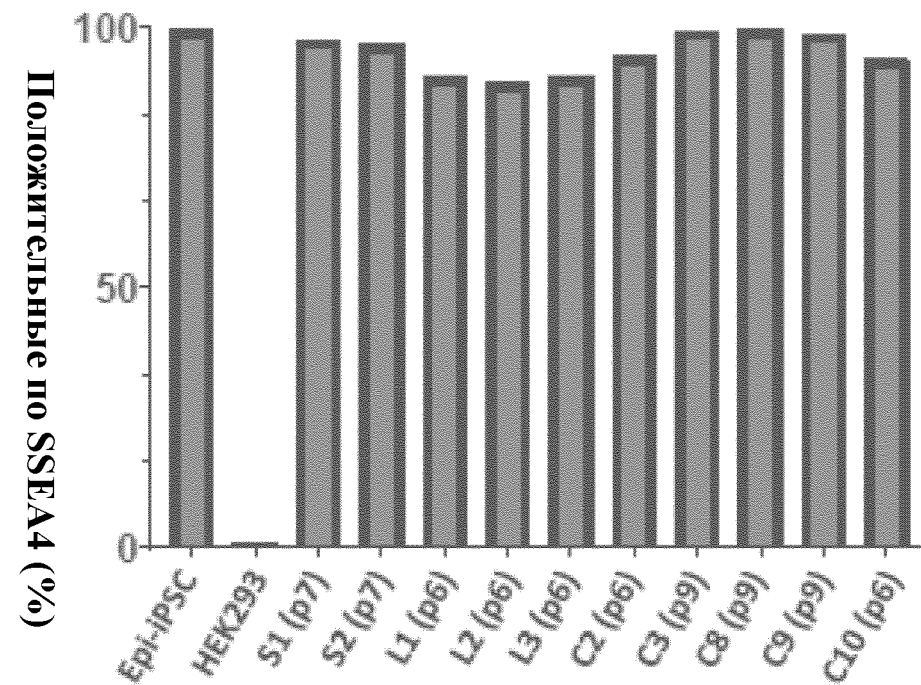
Зависимость времени удвоения популяции от пассажа



Фиг. 10В

Экспрессия маркера плюрипотентности SSEA4 по результатам проточной цитометрии

Положительные по SSEA4 (%) в различных клонах hiPSC

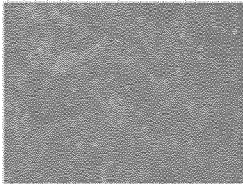
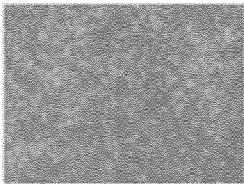
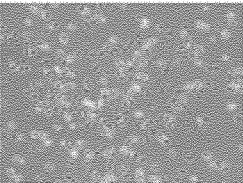
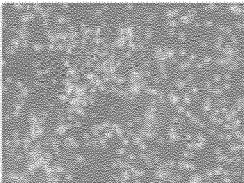
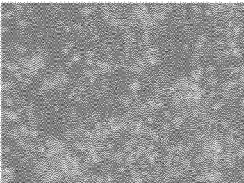
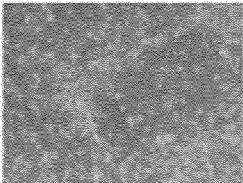
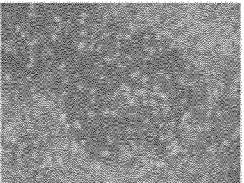
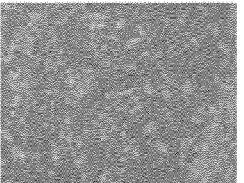
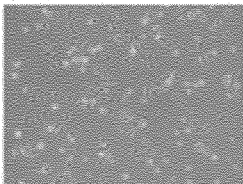
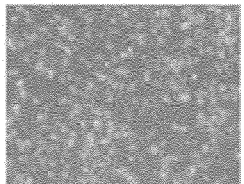
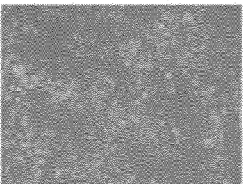
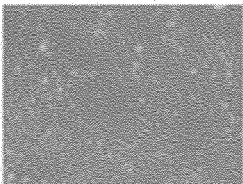
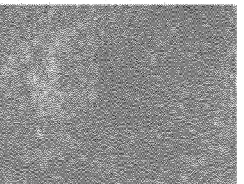
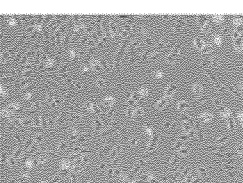
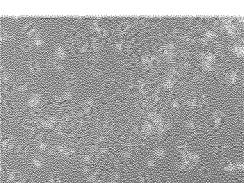
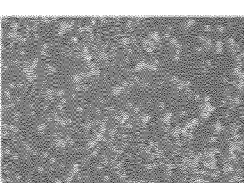
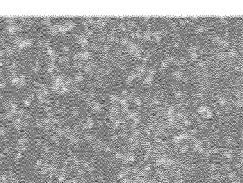
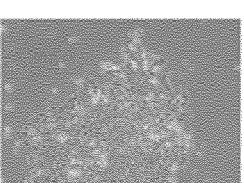
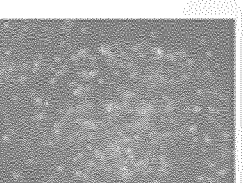


Фиг. 10С

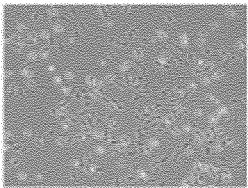
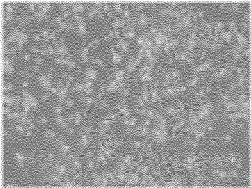
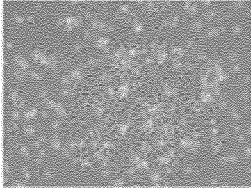
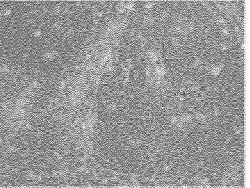
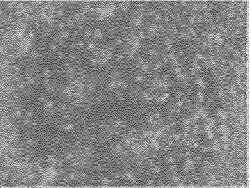
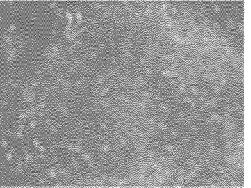
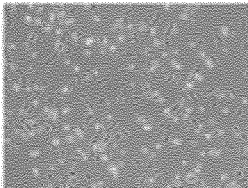
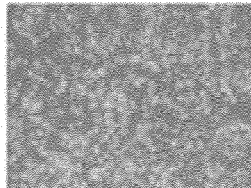
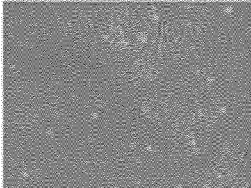
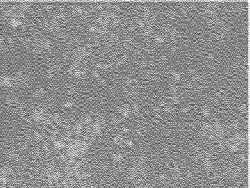
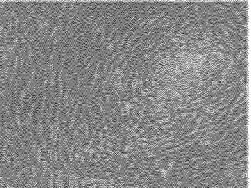
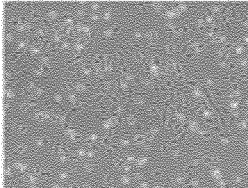
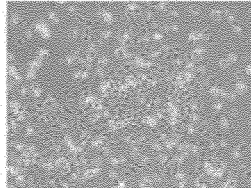
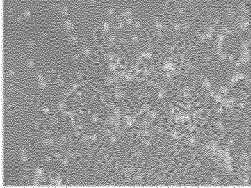
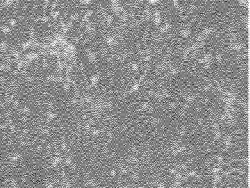
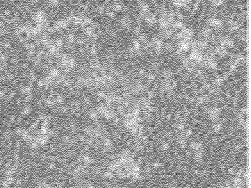
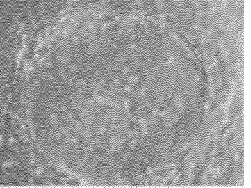
Фиг. 11

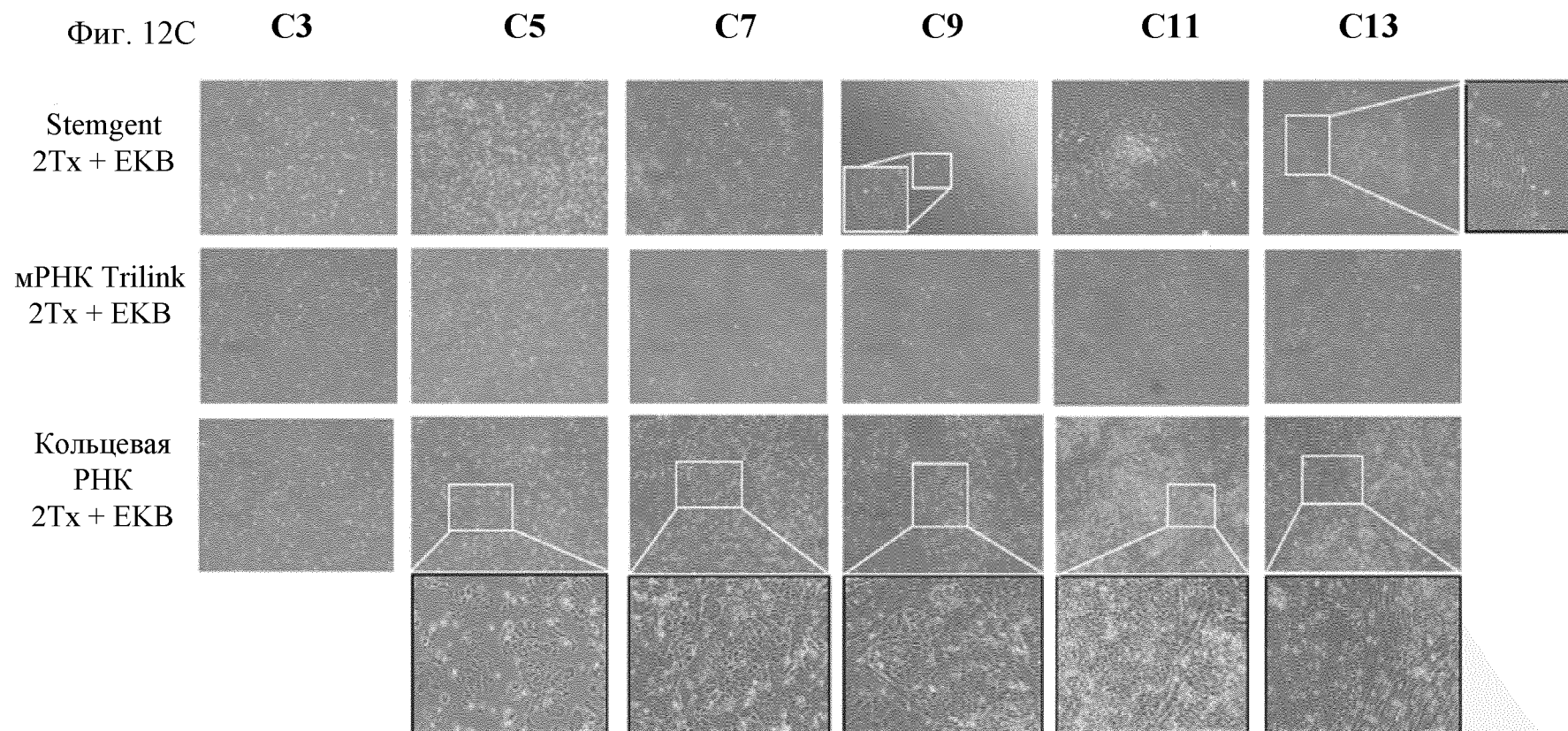


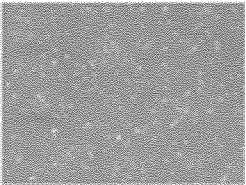
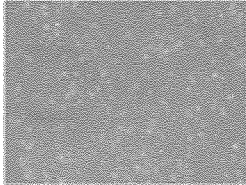
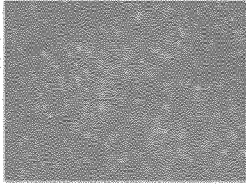
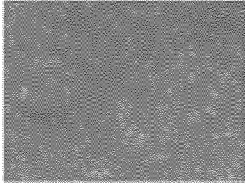
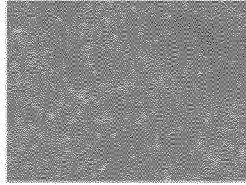
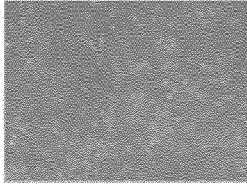
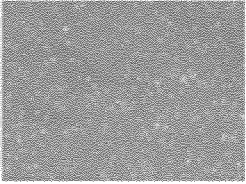
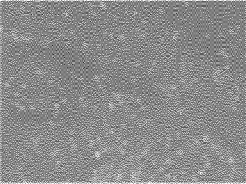
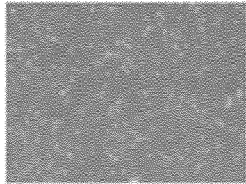
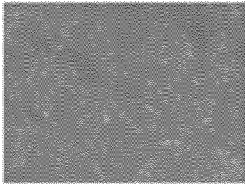
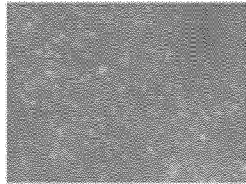
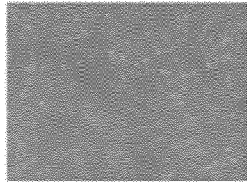
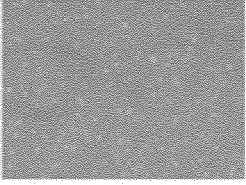
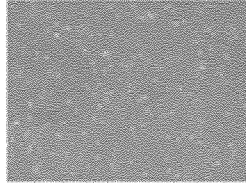
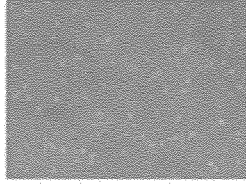
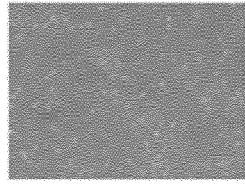
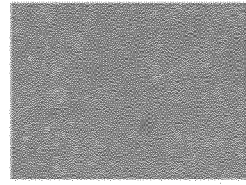
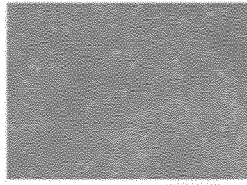
Фиг. 12А

	C3	C5	C7	C9	C11	C13
Ложно- трансфици- рованные			ND	ND	ND	ND
Stemgent 4Tx + ЕКВ						
мРНК Trilink 4Tx + ЕКВ					ND	
Кольцевая РНК 4Tx + ЕКВ						

Фиг. 12В

	C3	C5	C7	C9	C11	C13
Stemgent 4Tx + ЕКВ						
мРНК Trilink 4Tx + ЕКВ						ND
Кольцевая РНК 4Tx + ЕКВ						



Фиг. 12D	C3	C5	C7	C9	C11	C13
Stemgent 1Tx + ЕКВ						
мРНК Trilink 1Tx + ЕКВ						
Кольцевая РНК 1Tx + ЕКВ						

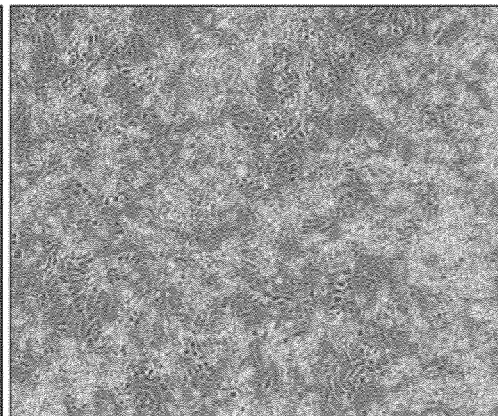
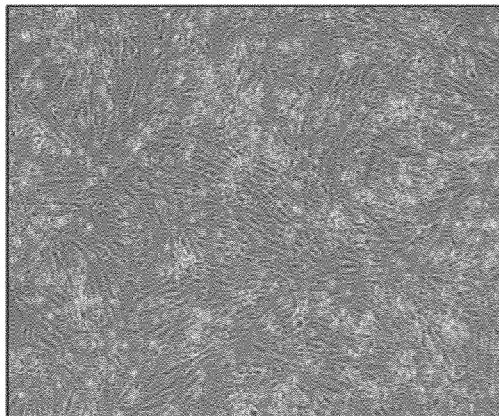
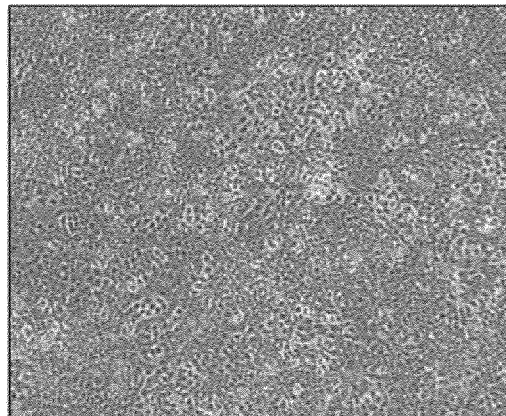
Сутки 6

Кольцевая РНК

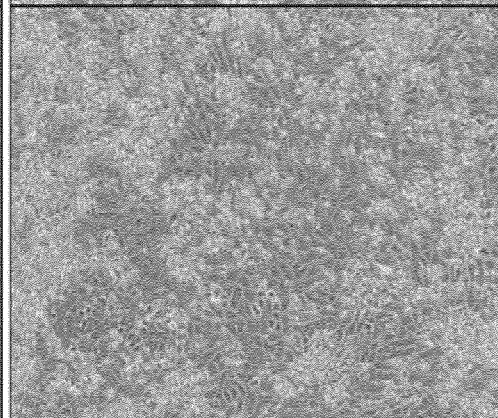
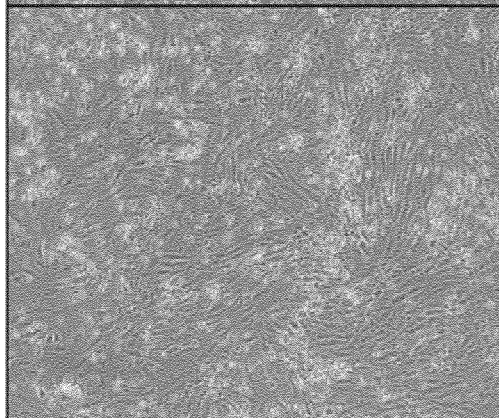
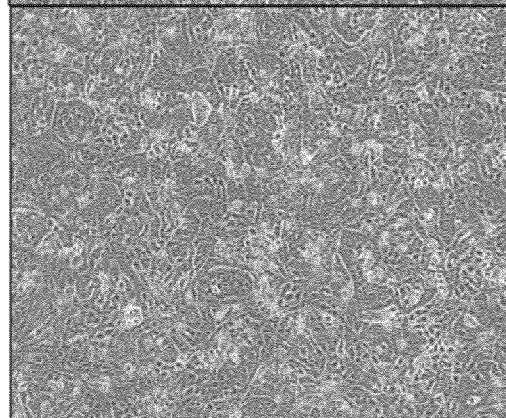
мРНК Trilink

Stemgent

4Tx + ЕКВ

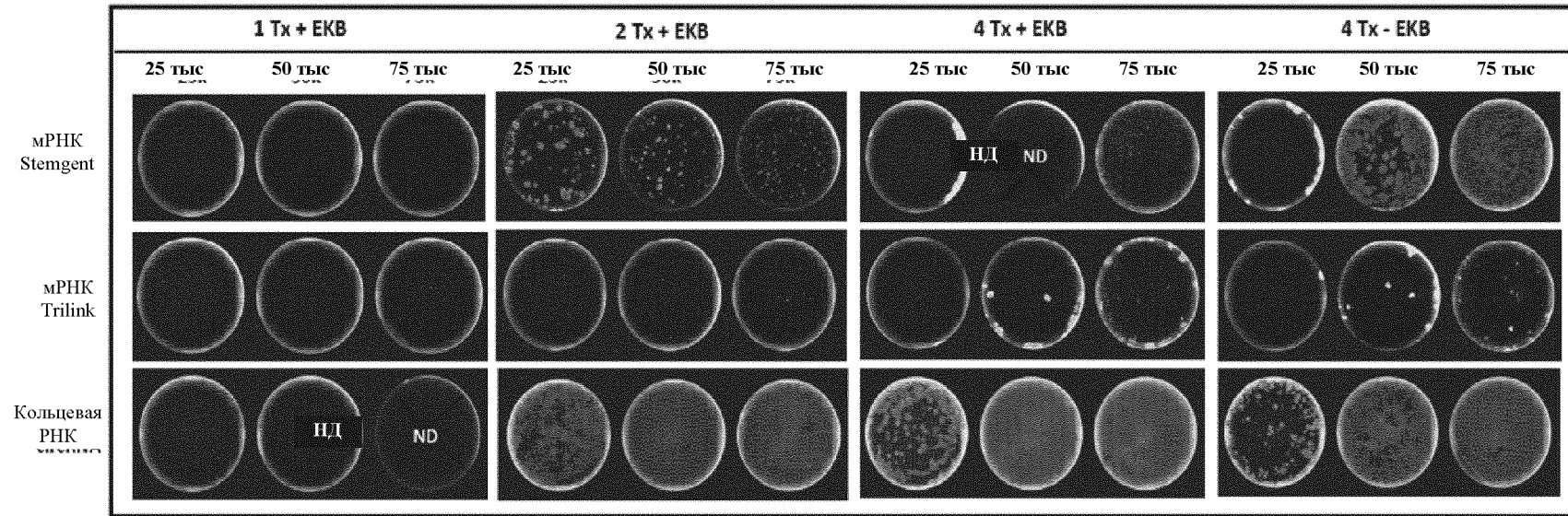


4Tx - ЕКВ

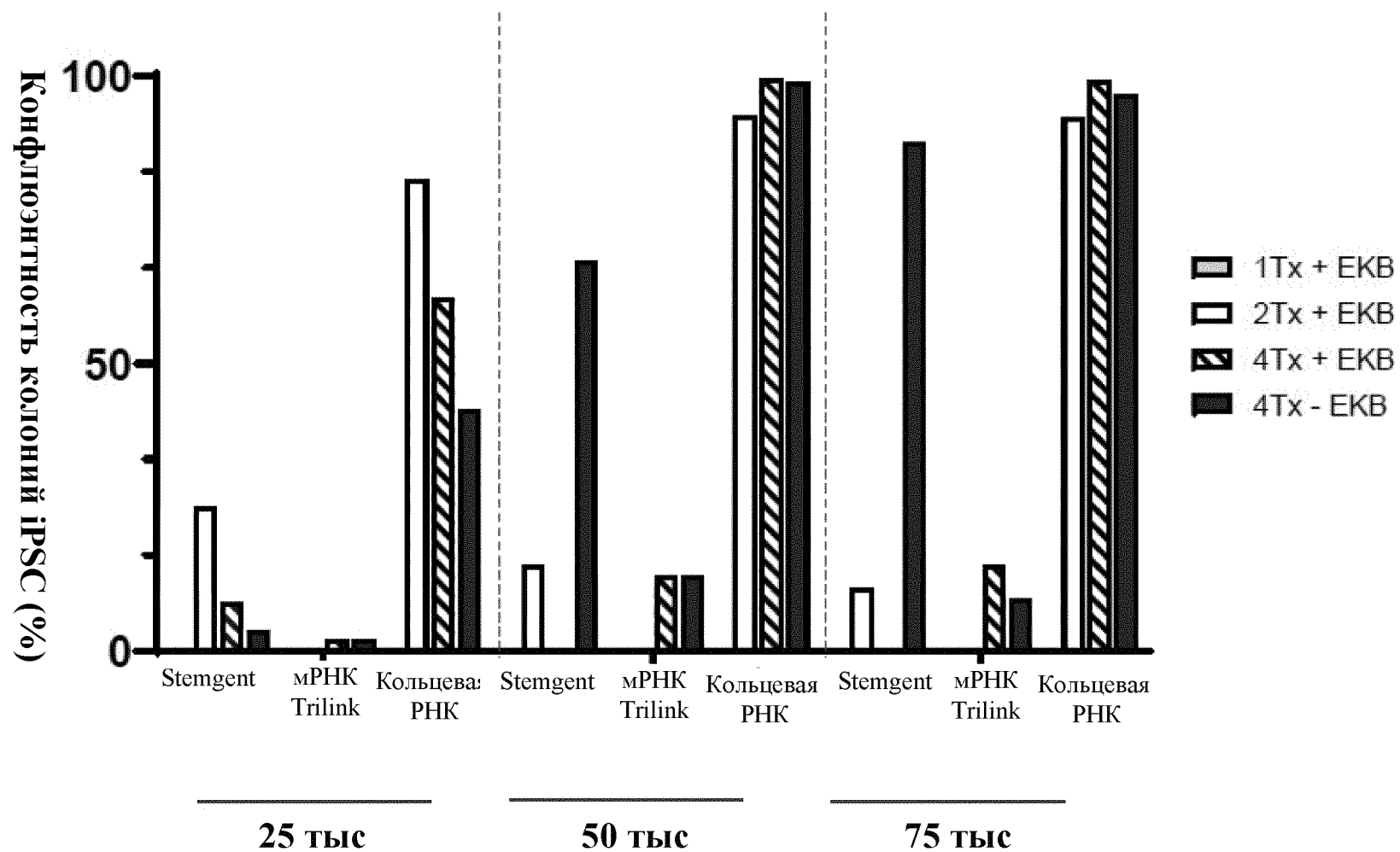


Фиг. 13

TRA-1-81 OCT4 (Сутки 16)

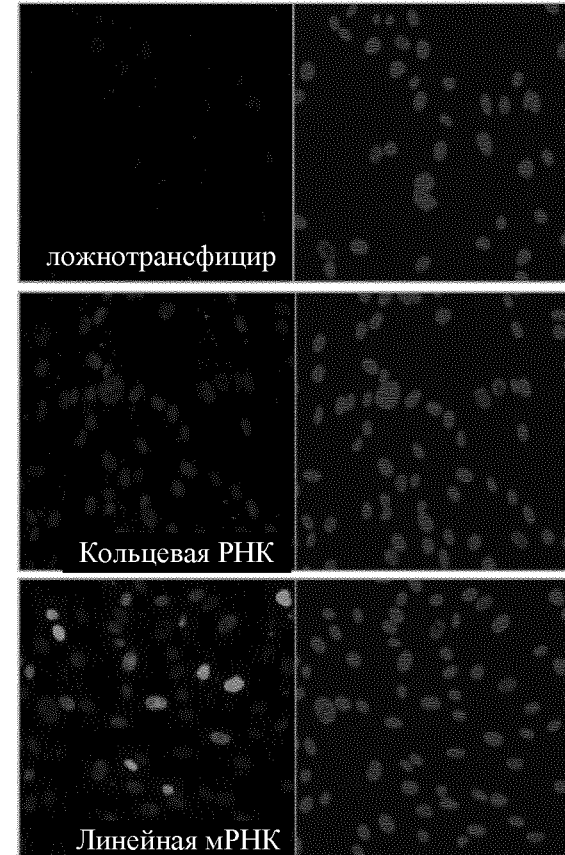


Фиг. 14А



Фиг. 14В

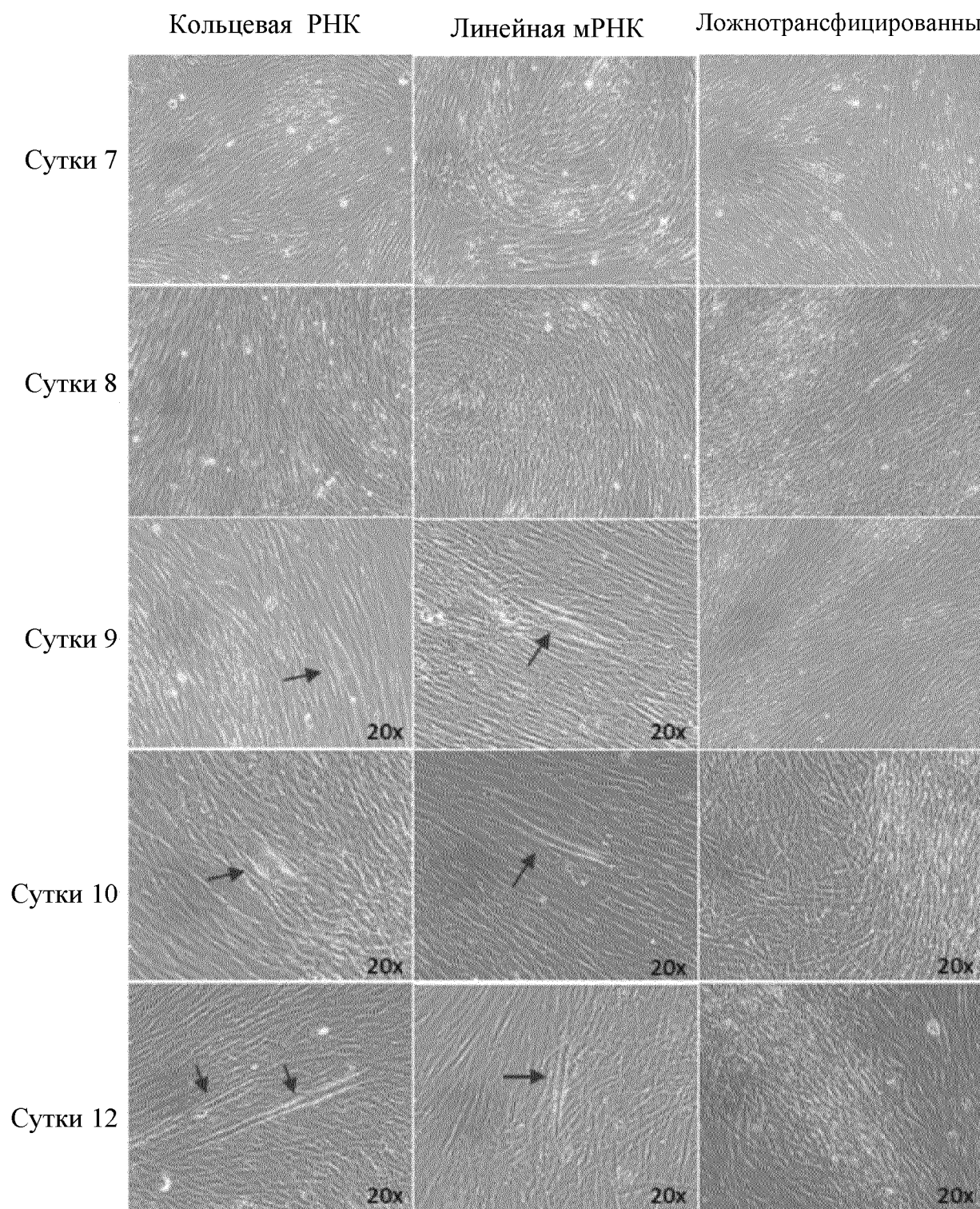
Экспрессия белка MyoD



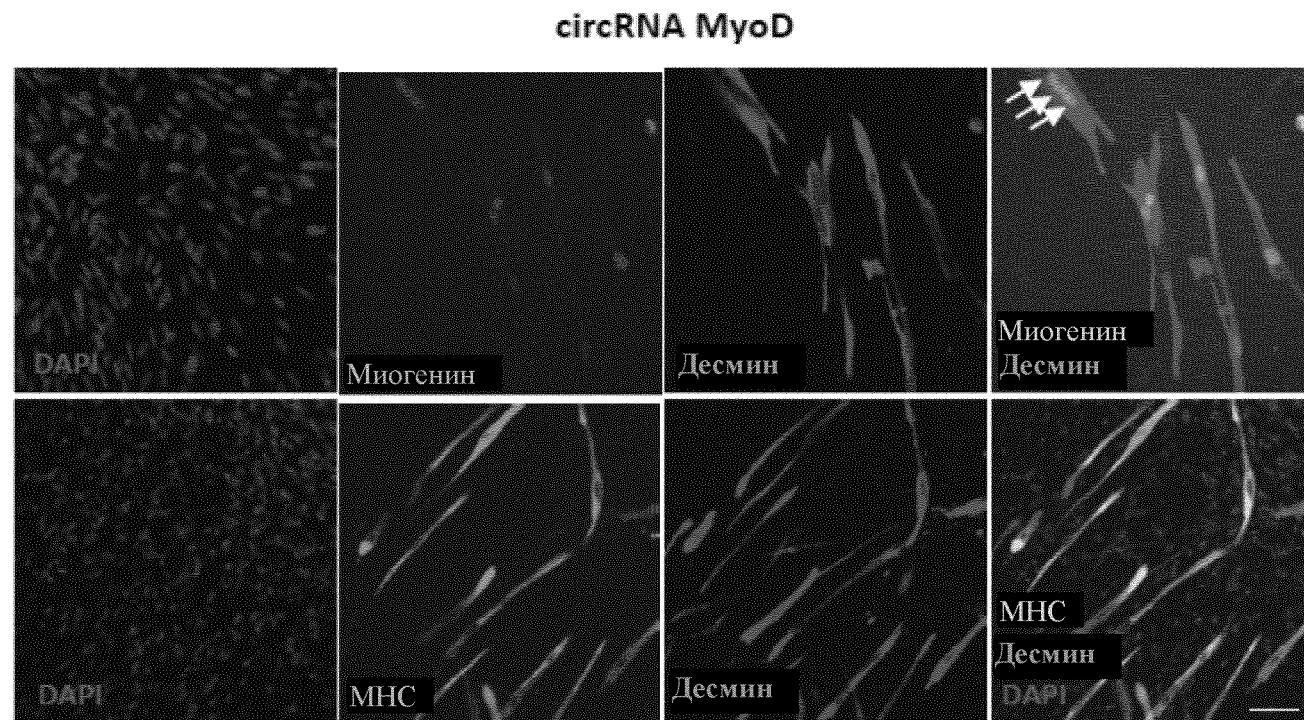
25

Композиции и способы для
перепрограммирования клеток
с применением кольцевой ДНК

Фиг. 15А

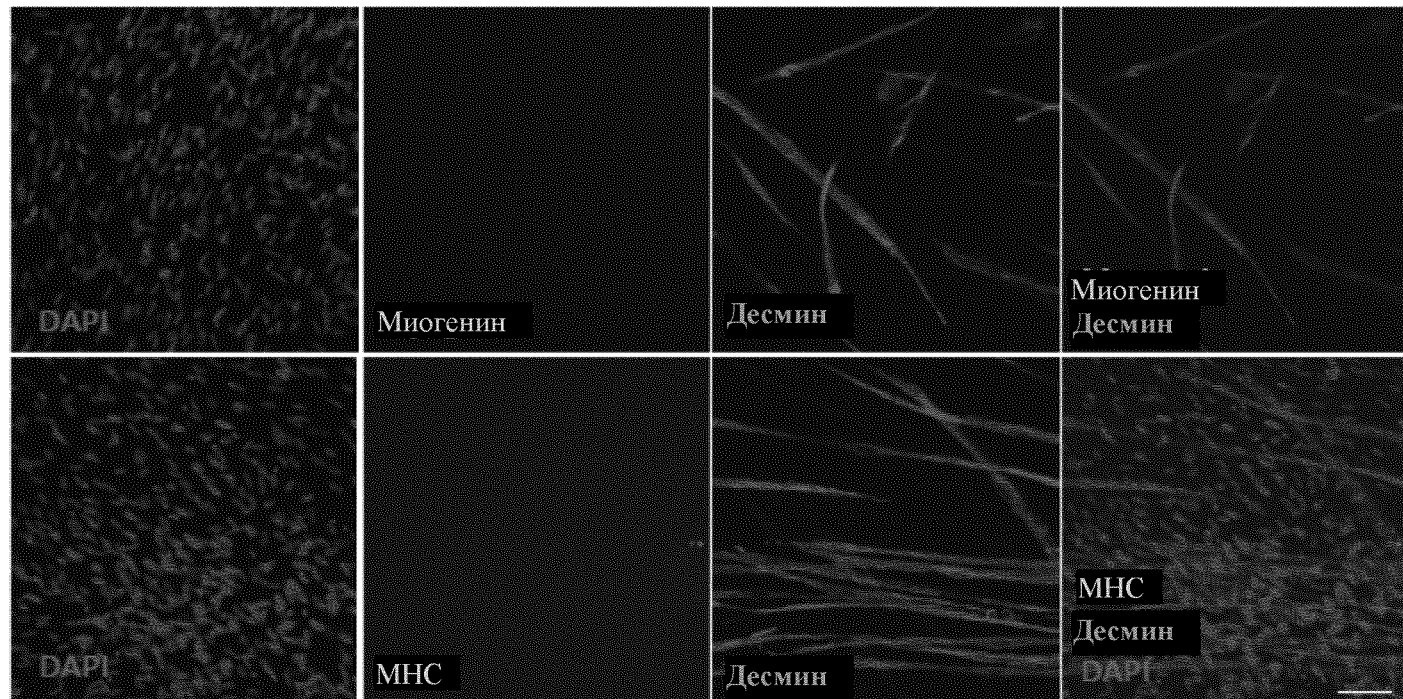


Фиг. 15В



Фиг. 15С

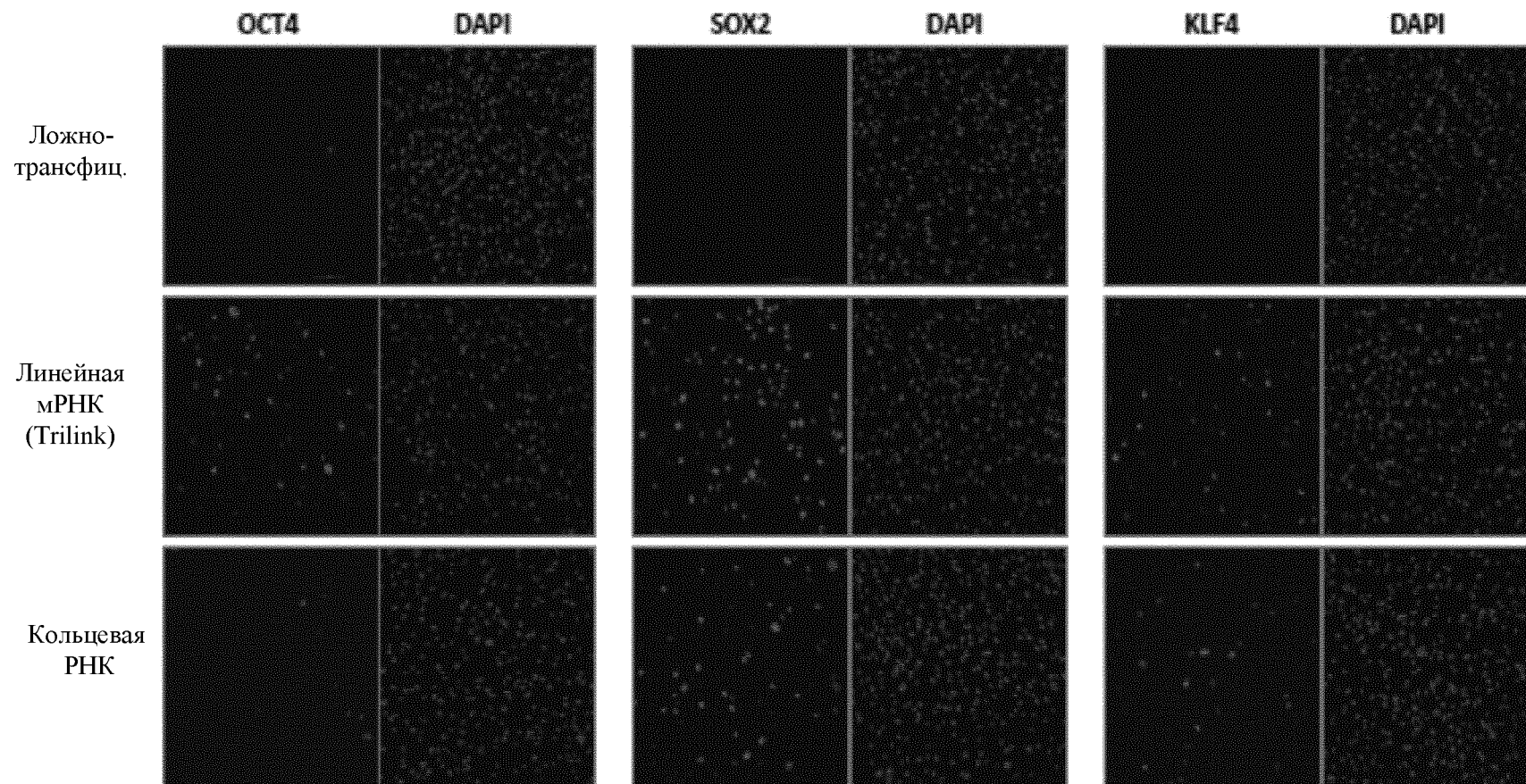
Линейная мРНК MyoD



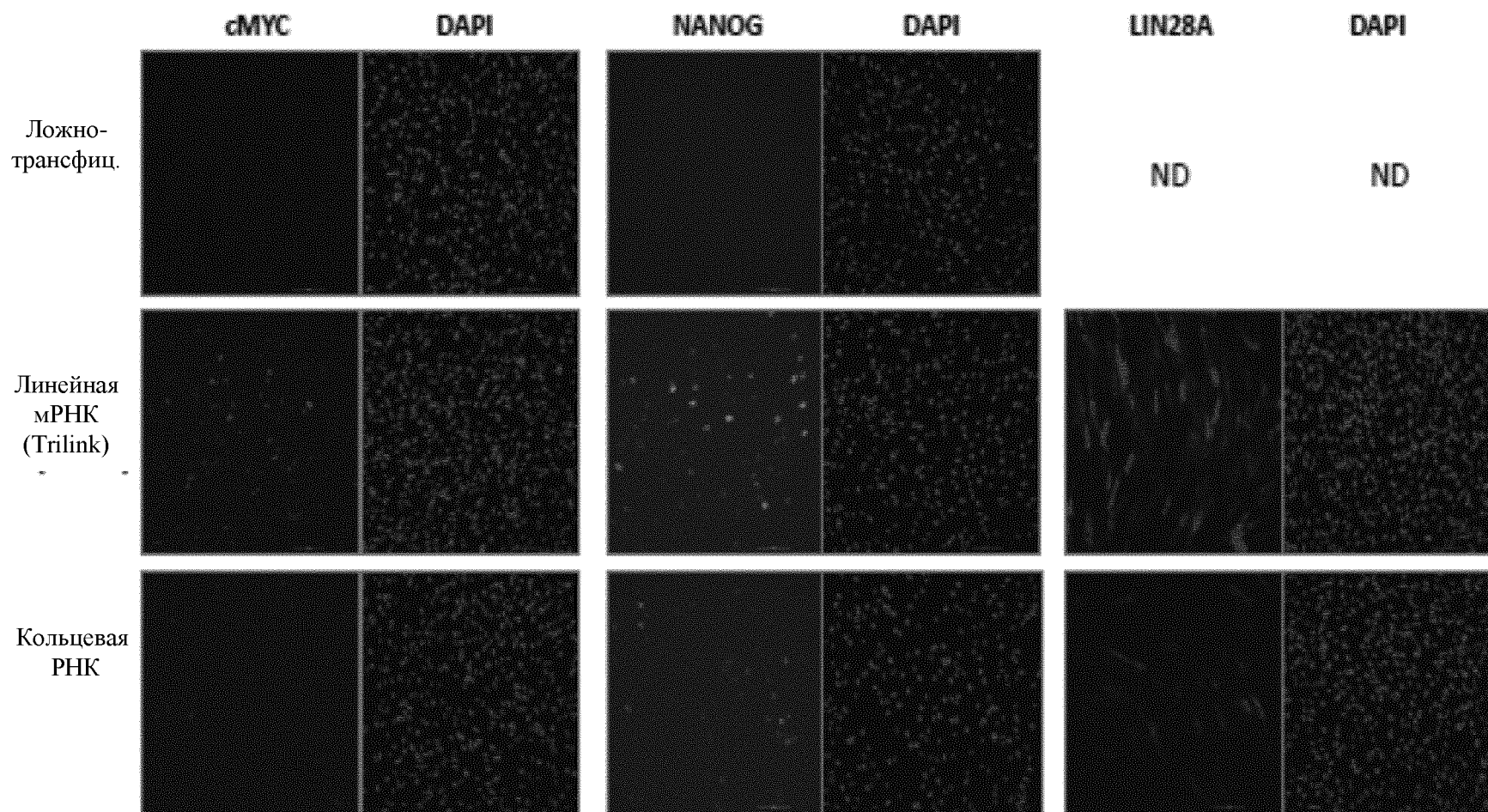
28

Композиции и способы для
перепрограммирования клеток
с применением кольцевой ДНК

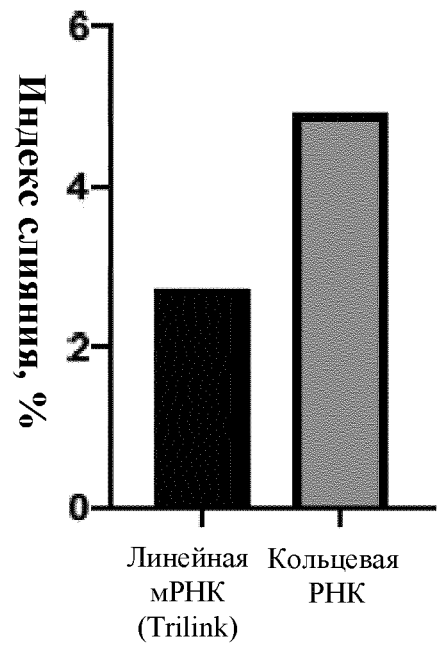
Фиг. 15D



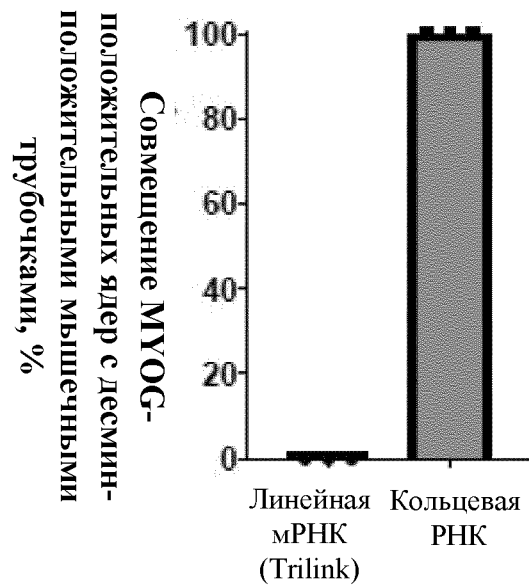
Фиг. 16А



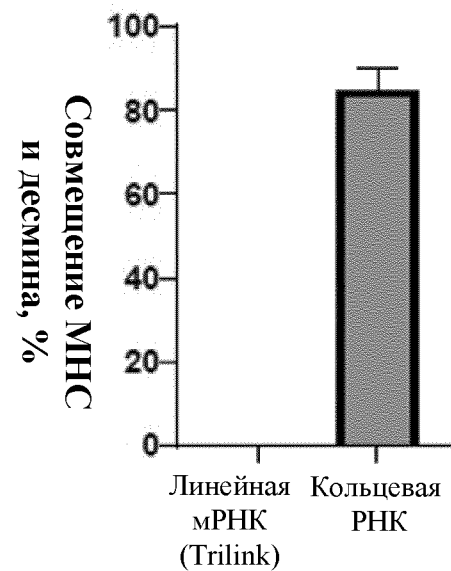
Фиг. 16В



Фиг. 17А



Фиг. 17В



Фиг. 17С