

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **046539**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.03.25

(21) Номер заявки
202090990

(22) Дата подачи заявки
2018.10.19

(51) Int. Cl. *C12N 5/078* (2010.01)
C12N 5/0781 (2010.01)
C12N 15/90 (2006.01)
C12N 15/90 (2006.01)

**(54) СИСТЕМЫ И СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ В-КЛЕТОК, ГЕНЕТИЧЕСКИ
МОДИФИЦИРОВАННЫХ, ДЛЯ ЭКСПРЕССИИ ВЫБРАННЫХ АНТИТЕЛ**

(31) 62/575,275; 62/580,303; 62/623,371

(32) 2017.10.20; 2017.11.01; 2018.01.29

(33) US

(43) 2020.10.06

(86) PCT/US2018/056789

(87) WO 2019/079772 2019.04.25

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ФРЕД ХАТЧИНСОН КЭНСЕР
СЕНТЕР (US)**

(72) Изобретатель:
**Тэйлор Джастин Дж., Моффетт
Хауэлл Ф. (US)**

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

(56) WO-A1-2017176806
US-A1-20020106729
WO-A2-2013148256
US-A1-20160159874
US-A1-20140356908
US-A1-20120102582
US-A1-20020146422
US-A1-20120167237
US-A1-20030083474
US-A1-20010034062
US-A1-20120207673
US-A1-20150056171
US-A1-20130078249
US-A1-20160159866
US-A1-20070020279

(57) Описаны системы и способы генетической модификации В-клеток для экспрессии выбранных антител. Системы и способы могут быть использованы для устранения необходимости классической вакцинации; обеспечения защиты от инфекционных агентов, для которых в настоящее время нет вакцин; обеспечения защиты от инфекционных агентов, в случае иммуносупрессированных пациентов; и/или обеспечения пользы, обеспечиваемой терапевтическими антителами, например, при лечении аутоиммунных расстройств.

B1

046539

046539 B1

Перекрестные ссылки на родственные заявки

Заявка на данный патент испрашивает приоритет по предварительной заявке на патент США № 62/575275, поданной 20 октября 2017 г., по предварительной заявке на патент США № 62/580303, поданной 1 ноября 2017 г., и предварительной заявке на патент США № 62/623371, поданной 29 января 2018 г., каждая из которых включена в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме, как если бы она была полностью изложена в данном документе.

Заявление относительно списка последовательности

Перечень последовательностей, связанный с данной заявкой, предоставляется в текстовом формате вместо бумажной копии и тем самым включается посредством ссылки в данное описание. Имя текстового файла, содержащего список последовательностей, 18-024-WO-PCT_ST25.txt. Текстовый файл размером 184 КБ был создан 19 октября 2018 года и был подан в электронном виде через EFS-Web.

Область техники

В настоящем раскрытии предложены системы и способы генетической модификации В-клеток для экспрессии выбранных антител. Системы и способы могут быть использованы для: устранения необходимости классической вакцинации; обеспечения защиты от инфекционных агентов, для которых в настоящее время нет вакцин; обеспечения защиты от инфекционных агентов, в случае иммуносупрессированных пациентов; и/или обеспечения пользы, обеспечиваемой терапевтическими антителами, например, при лечении аутоиммунных расстройств.

Уровень техники

Вакцины предназначены для повышения иммунитета субъекта против конкретной инфекции путем стимулирования В-клеток для выработки антител против целевого инфекционного агента. Рутинная детская вакцинация представляет собой давно установленное клиническое вмешательство со сравнительно низким риском и высокой эффективностью. К сожалению, однако, вакцины доступны не для всех инфекционных агентов. Например, каждый год в Соединенных Штатах миллионы детей посещают врача или отделение неотложной помощи из-за инфекций респираторно-синцитиальным вирусом (РСВ).

В течение десятилетий исследователи пытались разработать вакцину, способную побудить В-клетки вырабатывать антитела, эффективные для защиты от вирусов, таких как РСВ, вирус иммунодефицита человека (ВИЧ) и вирус Зика. Но все попытки стимулировать выработку защитных антител провалились. Единственная широко протестированная вакцина против РСВ фактически усугубила инфекцию: антитела, выработанные после вакцинации, не обезвредили вирус, а повысили его способность заражать клетки. Помимо вируса РСВ, ВИЧ и вируса Зика, существует ряд других инфекционных агентов, для которых не существует эффективных вакцин.

В дополнение к борьбе с инфекциями антитела также могут быть полезны в качестве лечения других состояний, таких как аутоиммунные заболевания. Однако эти терапии на основе антител обычно требуют повторных инъекций антител для поддержания защиты.

Также следует отметить, что многочисленные пациенты подвергаются пересадке костного мозга или гематопозитических стволовых клеток в качестве лечения гематологических злокачественных новообразований (например, лейкоза, лимфомы, миеломы). Другие пациенты получают инфузии генетически модифицированных гематопозитических стволовых клеток, которые обеспечивают наличие терапевтического гена, которого нет у пациента. Все эти способы лечения требуют, чтобы существующая иммунная система пациента была удалена до введения трансплантата или генетически модифицированных гематопозитических стволовых клеток, оставляя опасное окно подавленного иммунитета до того, как иммунная система пациента вновь заработает после лечения. В этот момент времени, пациенты с подавленным иммунитетом невероятно восприимчивы к инфекциям, таким как РСВ, грипп, парагрипп и метапневмовирус (МППВ). Эти инфекции являются фактором высокого риска и связаны с многочисленными летальными исходами после указанного лечения.

Сущность изобретения

В настоящем раскрытии предложены системы и способы генетической модификации В-клеток для экспрессии выбранных антител. В конкретных вариантах осуществления выбранные антитела уменьшают или устраняют необходимость в существующих вакцинах. В конкретных вариантах осуществления выбранные антитела защищают от инфекции от вирусов, для которых в настоящее время отсутствуют эффективные стратегии вакцинации (например, РСВ, ВИЧ, вирус Зика). В конкретных вариантах осуществления выбранные антитела уменьшают или устраняют необходимость в терапевтических инъекциях антител, таких как вводимые для лечения различных аутоиммунных расстройств. В конкретных вариантах осуществления выбранные антитела защищают иммуносупрессированных пациентов от инфекций. В конкретных вариантах осуществления способы раскрытия могут быть использованы для перепрограммирования В-клеток для защиты от сотен различных инфекционных агентов или патогенов, все посредством одной лабораторной манипуляции, занимающей несколько суток.

В конкретных вариантах осуществления настоящее раскрытие обеспечивает эти преимущества посредством целенаправленной вставки генетической конструкции в конкретную область эндогенного генома В-клетки. Важно отметить, что генетическая модификация В-клеток затруднена из-за высокой вариабельности генетических последовательностей в этих клетках, которая необходима для разнообразия

антител. Эта высокая степень генетической вариабельности делает нецелесообразным непосредственное нацеливание на участки, кодирующие антитела, для генетической манипуляции. Более того, удаление и замена кодирующих частей генома В-клетки также неэффективны, поскольку такой подход отрицательно влияет на функцию В-клеток.

Дополнительные проблемы, касающиеся генетически модифицированных В-клеток для экспрессии выбранных антител, возникают из-за того, что антитела образуются из отдельных белковых единиц, называемых тяжелыми цепями и легкими цепями. Разные цепи кодируются различными частями генома В-клеток, но должны объединяться для образования функционирующего антитела.

Настоящее раскрытие преодолевает отмеченные проблемы, среди прочего, путем идентификации константной области генома В-клетки, которая может быть надежно нацелена для генетической вставки, и которая, будучи модифицированной, приводит к преимущественной экспрессии вставленной генетической конструкции по сравнению с соответствующими областями естественного генома В-клетки. Эта стратегия преодолевает вариабельность последовательности, связанную с геномом В-клеток, а также устраняет необходимость удалять и заменять части эндогенного генома В-клеток для достижения функциональной экспрессии выбранного антитела. Преодоление необходимости удалять и заменять части эндогенного генома В-клетки сохраняет функцию В-клеток после генетических манипуляций.

В конкретных вариантах осуществления отмеченная область, нацеленная для генетической вставки, представляет собой интронную область выше или ниже от элемента энхансера E μ SEQ ID NO: 85 (человека) или SEQ ID NO: 86 (мышь). В конкретных вариантах осуществления область, нацеленная для генетической вставки, представляет собой константную интронную область, выбранную из SEQ ID NO: 1 или 2 (человека) или SEQ ID NO: 3 или 4 (мышь). В конкретных вариантах осуществления последовательности ДНК человека в SEQ ID NO: 1 нацеленные для генетической вставки включают SEQ ID NO: 5-24. В конкретных вариантах осуществления последовательности ДНК человека в SEQ ID NO: 2 нацеленные для генетической вставки включают SEQ ID NO: 25-44. В конкретных вариантах осуществления последовательности ДНК мыши в SEQ ID NO: 3 нацеленные для генетической вставки включают SEQ ID NO: 45-64. В конкретных вариантах осуществления последовательности ДНК мыши в SEQ ID NO: 4 нацеленные для генетической вставки включают SEQ ID NO: 65-84. Генетические последовательности, особенно таковые, которые способны нацеливаться на эти сайты для генетической модификации, описаны в настоящем описании в виде направляющей РНК (нРНК) SEQ ID NO: 87-89 и 290-366.

В конкретных вариантах осуществления размещение и компоненты вставленной генетической конструкции приводят к преимущественной экспрессии вставленной генетической конструкции по сравнению с соответствующими частями эндогенного генома В-клетки. Эти варианты осуществления также включают элементы, которые преодолевают проблемы, связанные с областями антител, кодируемыми различными участками эндогенного генома В-клеток.

В конкретных вариантах осуществления генетические конструкции вставлены в одну из SEQ ID NO: 1, 2, 3 и 4 и включают (i) промотор; (ii) сигнальный пептид; (iii) трансген, кодирующий всю легкую цепь выбранного антитела; (iv) гибкий линкер или пропускающий элемент; (v) вариабельную область тяжелой цепи выбранного антитела; и (vi) границу сплайсинга, которая приводит к экспрессии эндогенной константной области тяжелой цепи В-клетки. В этих вариантах осуществления экспрессия выбранного антитела в виде единой конструкции преодолевает проблемы, связанные с областями антител, кодируемыми различными участками эндогенного генома В-клеток. Включение гибкого линкера физически связывает область легкой цепи и область тяжелой цепи экспрессируемого выбранного антитела таким образом, что это позволяет им образовывать функциональную единицу и в то же время снижает риск связывания частей антитела с другими потенциально экспрессируемыми цепями антитела из эндогенного генома В-клетки. Использование пропускающего элемента физически не связывает область легкой цепи и область тяжелой цепи, но его экспрессия в непосредственной близости также приводит к ассоциации с образованием функциональной единицы, в то же время снижая риск связывания областей антитела с другими потенциально экспрессируемыми цепями антитела из эндогенного генома В-клетки. Включение границы сплайсинга приводит к выбранному антителу, включающему константную область тяжелой цепи, соответствующую текущему состоянию активации и/или созревания В-клетки. Другими словами, выбранные экспрессированные антитела могут быть экспрессированы с использованием любой из эндогенных константных областей тяжелой цепи В-клетки, и константная область тяжелой цепи, экспрессируемая с выбранным антителом, может естественным образом изменяться со временем.

В настоящем раскрытии также предложены способы, гарантирующие, что только В-клетки, которые были эффективно генетически модифицированы для экспрессии выбранного антитела, собираются для составления и введения пациентам. Например, перед генетической модификацией В-клетка будет естественно экспрессировать антитела, которые включают либо легкую цепь каппа, либо легкую цепь лямбда. В-клетка может быть модифицирована для экспрессии легкой цепи, которая отличается от цепи каппа или лямбда, которую она естественным образом экспрессирует, и только те В-клетки, которые экспрессируют замещающую цепь, отбираются для составления и введения.

В настоящем раскрытии также предложены многочисленные дополнительные стратегии для эффективной модификации В-клеток для обеспечения преимуществ, описанных в данном документе. Эти и

другие стратегии описаны более подробно в подробном описании ниже.

Краткое описание графических материалов

Фиг. 1. Схема ответа В-клеток на классические стратегии вакцинации.

Фиг. 2А-2С. Схемы известных стратегий вакцинации против респираторно-синциального вируса (РСВ): (фиг. 2А) инактивированная формалином вакцина против РСВ; (фиг. 2В) "улучшенные" вакцины против РСВ; и (фиг. 2С) эпитопная каркасная вакцина против РСВ.

Фиг. 3А-3С. Резюме предыдущих усилий по обходу вакцинации и непосредственному введению защитных антител против РСВ: (фиг. 3А) инъекция паливизумаба; (фиг. 3В) аденовирус-опосредованная экспрессия паливизумаба; и (фиг. 3С) генетическая модификация и дифференцирование стволовых клеток.

Фиг. 4А, 4В. Схемы для конкретных вариантов осуществления стратегий защиты, раскрытых в настоящем документе: (фиг. 4А) модификация В-клетки для защиты от РСВ; и (фиг. 4В) стратегия одновременной защиты.

Фиг. 5. Предполагаемая секреция паливизумаба подтипами В-клеток при наличии и отсутствии инфекции.

Фиг. 6А, 6В. Структура (фиг. 6А) генов антител и (фиг. 6В) белков антител, что подчеркивает техническую проблему описания: антитела представляют собой белки, полученные из двух отдельных генных продуктов. В конкретных вариантах осуществления синтетические генетические конструкции, кодирующие выбранные антитела, раскрытые в настоящем документе, используют пропускающие элементы (например, саморасщепляющиеся пептиды) для решения этой проблемы.

Фиг. 7. Схема, изображающая эндогенный локус гена тяжелой цепи, включая сегменты V, D и J, которые рекомбинируют, энхансерные элементы, показанные в виде круга и овала, и 6 потенциальных константных областей, которые могут быть экспрессированы. В-клетки начинают с экспрессии константных областей μ/δ , но могут переключаться на использование константных областей γ , α или ϵ путем удаления промежуточной ДНК. Также обратите внимание, что каждый V-сегмент связан с промотором тяжелой цепи, обозначенным стрелкой, которая управляет экспрессией тяжелой цепи после рекомбинации.

Фиг. 8А, 8В. Поскольку два белка объединяются для образования антитела, может быть желательно нацеливать на или инактивировать тяжелую цепь эндогенного антитела В-клетки (IgH) и/или легкую цепь эндогенного антитела В-клетки (IgL). При отсутствии такого нацеливания или инактивации могут образовываться нежелательные гибридные антитела (т.е. спаривание эндогенной легкой цепи с тяжелой цепью выбранного антитела или наоборот). (Фиг. 8А) Подход для нацеливания эндогенного IgH и получающаяся в результате химера, включающая области выбранного антитела (например, паливизумаб). (Фиг. 8В) Подход для инактивации IgL. В описанных подходах стоп-кодон может быть расположен выше (или как часть) встроенной генетической конструкции.

Фиг. 9. Схематическое изображение взаимодействий энхансеров тяжелых цепей с (вверху) эндогенной VDJ или (внизу) синтетической VDJ, кодируемой вставленной генетической конструкцией. Промоторы изображены в виде стрелок. Нуклеиновая кислота изображена в виде квадрата. В-клетки естественным образом экспрессируют нуклеиновую кислоту, которая находится ниже промотора, который ближе всего к энхансеру E_{μ} . В эндогенном геноме В-клетки, изображенном на фиг. 9, первый восходящий промотор, ближайший к энхансеру E_{μ} , затем управляет экспрессией эндогенных сегментов VDJ тяжелой цепи. Вставка генетической конструкции, которая включает промотор между энхансером E_{μ} и первым эндогенным промотором, приводит к тому, что В-клетка экспрессирует вставленную генетическую конструкцию, а не эндогенные сегменты VDJ тяжелой цепи. Этот встроенный ген может представлять собой вариабельную область VDJ тяжелой цепи, спаренную легкую цепь полного антитела вместе с вариабельной областью VDJ тяжелой цепи или другой синтетической ген, способный экспрессироваться в виде слияния с константной областью тяжелой цепи В-клетки. На фиг. 9 константные области индивидуально обозначены, чтобы подчеркнуть, что встроенная генетическая конструкция может экспрессироваться с любой из потенциальных константных областей тяжелой цепи.

Фиг. 10. Области нацеливания для вставки (человек). Области для вставки генетической конструкции в геном: #1: от концевой области J (IGHJ6 у человека, IGHJ4 у мыши) до энхансера E_{μ} или #2: от энхансера E_{μ} до повторяющихся последовательностей области переключения константного домена.

Фиг. 11А, 11В. (Фиг. 11А) Интронный энхансер E_{μ} человека (SEQ ID NO: 85) и последовательность ДНК человека предназначенные для генетической вставки, в том числе от IGHJ6 до интронного энхансера E_{μ} (SEQ ID NO: 1); (фиг. 11В) типичные ассоциированные сайты-мишени для нРНК (например, онРНК) (SEQ ID NO. 5-24) и последовательности нРНК (SEQ ID NO: 88, 89 и 290-307).

Фиг. 12А, 12В. (Фиг. 12А) Последовательность ДНК человека, предназначенная для генетической вставки, в том числе от интронного энхансера E_{μ} до области переключения (SEQ ID NO: 2); (фиг. 12В) типичные ассоциированные сайты-мишени для нРНК (например, онРНК) (SEQ ID NO. 25-44) и последовательности нРНК (SEQ ID NO: 308-327).

Фиг. 13А, 13В. (Фиг. 13А) Интронный энхансер E_{μ} мыши (SEQ ID NO: 86) и последовательность ДНК мыши предназначенные для генетической вставки, в том числе от IGHJ4 до интронного энхансера

Еμ (SEQ ID NO: 3); (фиг. 13B) типичные ассоциированные сайты-мишени для нРНК (например, онРНК) (SEQ ID NO. 45-64) и последовательности нРНК (SEQ ID NO: (87 и 328-346).

Фиг. 14А, 14В. (Фиг. 14А) Последовательность ДНК мыши, предназначенная для генетической вставки, в том числе от интронного энхансера Еμ до области переключения (SEQ ID NO: 4); (фиг. 14В) типичные ассоциированные сайты-мишени для нРНК (например, онРНК) (SEQ ID NO. 65-84) и последовательности нРНК (SEQ ID NO: 347-366).

Фиг. 15А, 15В. Фиг. 15А представляет собой схему, изображающую вставку генетической конструкции, кодирующей антитело к РСВ, в эндогенный локус тяжелой цепи с использованием системы редактирования генов CRISPR/Cas9. Генетическая конструкция может включать гомологичные плечи или гомологичные швы, которые представляют собой нуклеотидные выступы, которые гомологичны геномной ДНК в месте вставки. Фиг. 15В описывает дополнительные примеры шаблонов репарирования ДНК, включая последовательности, фланкированные сайтами-мишенями онРНК, для генерации двухцепочечных разрывов ДНК, фланкирующих вставленную последовательность, вместе с разрезанием генома Cas9/онРНК (вверху), одноцепочечную ДНК, содержащую длинные гомологичные плечи, фланкирующие вставленную последовательность (посредине) и короткие гомологичные плечи, фланкирующие вставленную последовательность, полученную отжигом олигоДНК (внизу).

Фиг. 16. Схематическое описание: (вверху) модифицированный локус тяжелой цепи, модифицированный генетической конструкцией, кодирующей вариабельную область тяжелой цепи антитела к РСВ; (посредине) модифицированный локус легкой цепи, модифицированный генетической конструкцией, кодирующей вариабельную область легкой цепи антитела к РСВ; и (внизу) модифицированный локус тяжелой цепи, модифицированный генетической конструкцией, кодирующей легкую цепь (т.е. IgL) антитела к РСВ, и вариабельную область тяжелой цепи антитела к РСВ с линкером (включая Strep-Tag) между вариабельной областью легкой цепи и тяжелой цепи.

Фиг. 17. Схема одновременной защиты от множества патогенных микроорганизмов модифицированными В-клетками памяти и модифицированными В-клетками, секретирующими антитела, как описано в настоящем документе.

Фиг. 18А-18С. Эффективное разрезание Cas9 целевой интронной области в В-клетках мыши и человека. Электропорирование с рибонуклеарными белковыми комплексами Cas9/онРНК опосредовало эффективный разрез в В-клетках мыши и человека. Клетки подвергали электропорированию с помощью комплексов Cas9/онРНК. Эффективность редактирования оценивали через 3 суток после электропорирования с помощью отслеживания вставок/делеций с помощью разложения (TIDE) в: (фиг. 18А) линии В-клеток мыши (A20); (фиг. 18В) первичных В-клетках; и (фиг. 18С) линии В-клеток человека (Ramos).

Фиг. 19. Вставка генетической конструкции, кодирующей РСВ-специфическое антитело, в В-клетки мыши.

Фиг. 20. Обогащение и анализ генетически модифицированных В-клеток.

Фиг. 21. Генетически модифицированные В-клетки секретируют связывающее РСВ антитело.

Фиг. 22А, 22В. Подходы нехомологичного соединения концов (NHEJ) и микрогомологичного опосредованного соединения концов (MMEJ) предлагают альтернативы длинно-гомологичному репарированию (HDR) для геномной инженерии первичных В-клеток мыши. (Фиг. 22А) Первичные В-клетки праймировали в течение 24 ч, совместно инкубировали с аденоассоциированным вирусом (AAB) в течение 12 ч, промывали и либо электропорировали, либо переносили непосредственно во вторичную культуру в течение 3 суток перед анализом экспрессии mCherry. (Фиг. 22В) Первичные В-клетки праймировали в течение 24 ч, подвергали имитации электропорирования или электропорировали с шаблоном+Cas9/онРНК и переносили во вторичную культуру в течение 5 суток перед анализом экспрессии mCherry.

Фиг. 23А-23Е. Вставка новой генетической конструкции, кодирующей функциональное антитело, в линии В-клеток мыши и человека позволяет экспрессировать связанное с поверхностью и секретируемое антитело. (Фиг. 23А) Схема локуса IgH, показывающая сайт для вставки частичной конструкции антитела, а также изображения поверхностно-связанного и секретируемого антитела. emAb - синтетическое антитело, используемое в настоящем документе взаимозаменяемо с synAb. (Фиг. 23В) Окрашивание немодифицированных или модифицированных синтетических антител к РСВ(αRSV synAb) линий В-клеток мыши A20 тетрамером белка РСВ-предслияние-F (РСВ-тетрамер) и тетрамером анти-Streptag II (αTagAb тетрамер). (Фиг. 23С) Окрашивание немодифицированных или анти-РСВ synAb-модифицированных линий В-клеток человека RAMOS тетрамером РСВ-предслияние и тетрамером анти-Streptag II. (Фиг. 23D) ИФА на связывания антитела с F-белком предслияния РСВ из культуральной среды немодифицированных или модифицированных анти-РСВ synAb клеточных культур A20. Паливизумаб использовали в качестве положительного контроля. (Фиг. 23Е) ИФА на связывания антитела с F-белком предслияния РСВ из культуральной среды немодифицированных или модифицированных анти-РСВ synAb клеточных культур RAMOS. Паливизумаб использовали в качестве положительного контроля.

Фиг. 24А-24С. Получение первичных В-клеток мыши с новой специфичностью. (Фиг. 24А) Поверхностное окрашивание имитированно обработанных (вверху) или модифицированных анти-РСВ sy-

nAb В-клеток мыши (внизу) тетрамером анти- Streptag II до обогащения (левая панель) и после обогащения и расширения тетрамером анти- Streptag II (средняя панель) и тетрамерами РСВ-предслияние вирусного белка (правая панель). (Фиг. 24В) ИФА на связывания антитела с F-белком предслияния РСВ из культуральной среды немодифицированных или модифицированных анти-РСВ supAb клеточных культур В-клеток мыши. Паливизумаб использовали в качестве положительного контроля. Связывание антител обнаружено с помощью смеси 1:1 поликлонального антитела к Ig человека и антитела к Ig мыши, связанного с HRP. (24С) Быстрый рост обогащенных В-клеток supAb в культуре с помощью питающих клеток 3Т3-CD40L и IL-21.

Фиг. 25А-25I. Примерные последовательности. (Фиг. 25А) Примерные последовательности онРНК (SEQ ID NO: 87, 88, 89), гомологичные области генома (SEQ ID NO: 90-95) и сплайсинг-олигонуклеотиды (SEQ ID NO: 96-101); (фиг. 25В) анти-РСВ-emAb ААВ человека (2531 п.о. (SEQ ID NO: 102) и ассоциированные нуклеотидные и протеиновые последовательности (SEQ ID NO: 110-126, 280, 285)); (фиг. 25С) анти-РСВ-emAb ААВ человека (3134 п.о. (SEQ ID NO: 103) и ассоциированные нуклеотидные и протеиновые последовательности (SEQ ID NO: 127-141, 281, 286)); (фиг. 25D) анти-РСВ-emAb ААВ человека (1736 п.о. (SEQ ID NO: 104) и ассоциированные нуклеотидные и протеиновые последовательности (SEQ ID NO: 142 -144)); (фиг. 25Е) emAb-VRC01-ААВ человека (2551 п.о. (SEQ ID NO: 105) и ассоциированные нуклеотидные и протеиновые последовательности (SEQ ID NO: 145-152, 282, 287)); (фиг. 25F) emAb-Medi8852-ААВ человека (2544 и.о. (SEQ ID NO: 106) и ассоциированные нуклеотидные и протеиновые последовательности (SEQ ID NO: 153-160, 283, 288)); (фиг. 25G) emAb-АММ01-ААВ человека (2555 п.о. (SEQ ID NO: 107) и ассоциированные нуклеотидные и протеиновые последовательности (SEQ ID NO: 161-169, 284, 289)); (фиг. 25H) последовательность интегрирования сплайсинга mPCV Balb/C (2261 п.о. (SEQ ID NO: 108) и ассоциированные нуклеотидные и протеиновые последовательности (SEQ ID NO: 170-172)); (фиг. 25I) ТТ-чРСВ-Т7-интегрированная последовательность (1707 п.о. (SEQ ID NO: 109) и ассоциированные нуклеотидные и протеиновые последовательности (SEQ ID NO: 173-175)).

Фиг. 26А-26D. (Фиг. 26А) Целевая область выше энхансера E μ для введения новой кассеты антител; посредством нацеливания на эту область встроенные гены emAb могут управляться нативным (но вставленным) промотором IgH, максимизируя нативный контроль экспрессии иммуноглобина. Чтобы включить вставку за раз и свести к минимуму нецелевые взаимодействия, конструкции emAb были экспрессированы как слияние одной цепи. Это слияние состоит из полной последовательности легкой цепи, связанной с варибельной областью тяжелой цепи глицин-сериновым линкером из 57 аминокислот. Физическое связывание легкой и тяжелой цепей сводит к минимуму возможность несовпадения между вставленным emAb и эндогенной легкой цепью. Оптимизированная граница сплайсинга позволяет emAb сплайсироваться к нижестоящим константным областям IgH. Это позволяет экспрессировать emAb как любой из классов изотипа тяжелой цепи. (Фиг. 26В) Линия В-клеток, происходящая от лимфомы Беркитта, нативно экспрессирует поверхностные и секретлируемые формы IgM в паре с легкой цепью лямбда. Экспрессию сконструированного α РСВ-emAb, полученного из паливизумаба, детектировали с использованием мономерного белка РСВ-F и стрептактина, модифицированного стрептавидина с высоким сродством к мотивам Streptag II в линкере. Клетки RAMOS, модифицированные α РСВ-emAb, экспрессировали сконструированное РСВ-специфическое антитело, которое можно было обнаружить на поверхности клеток. (Фиг. 26С) Сконструированное РСВ-специфическое антитело также было обнаружено в секретированной форме в супернатанте. (Фиг. 26D) клетки, модифицированные α РСВ-emAb, но не контрольные клетки, демонстрировали быструю и устойчивую передачу сигналов кальция в ответ на белковый антиген.

Фиг. 27А-27G. В-клетки человека эффективно генетически модифицированы для экспрессии одноцепочечного emAb путем парной доставки cas9-онРНК и ААВ-шаблона. (Фиг. 27А) Схематическое изображение способа инженерии клетки человека. Сутки 0: В-клетки выделяют из МКПК и праймируют олигонуклеотидами CD40L, IL2, IL10, IL15 и CpG. Сутки 2: клетки электропорированы с помощью cas9/онРНК RNP и обрабатывают ААВ, кодирующим шаблон emAb HR, через 1 ч после электропорирования с последующим культивированием, как описано для суток 0. Сутки 4: клетки отбирают на связывание антигена или экспрессию тэга. Сутки 4-15L: отобранные клетки размножают на облученных питающих клетках, экспрессирующих CD40L, IL2 и IL21, дополненных IL15. Сутки 15-18: Клетки переносят в культуру для дифференцирования без питающих клеток с IL6, IL15 и IFN γ . (Фиг. 27В) Независимая частота в В-клетках от 6 независимых доноров МКПК, обработанных нацеленными на emAb RNP Cas9/онРНК. (Фиг. 27С) Все SNP человека с зарегистрированной частотой в целевом сайте онРНК. (Фиг. 27D) Типичный FACS для связывания перфузионного мономера РСВ-F с контрольными культивируемыми или РСВ-emAb генетически модифицированными В-клетками человека на 4-е сутки культивирования. (Фиг. 27Е) Частота РСВ-emAb В-клеток после конструирования В-клеток от 6 независимых доноров. (Фиг. 27F) FACS для маркеров плазматических клеток (CD19, CD27, CD38 и CD138) в примированных клетках (день 2) и клетках, дифференцированных in vitro (день 18). (Фиг. 27G) ИФА для секретлируемого антитела к HA-стволу в культуральной среде контрольных В-клеток или В-клеток MEDI8852-

emAb, нацеленных на грипп, на 18-е сутки культивирования.

Фиг. 28. Одноцепочечное emAb представляет собой гибкую платформу для экспрессии антивирусных антител. В-клетки человека подвергали фиктивному электропорированию (контроль В, верхний ряд) или генетически модифицировали конструкциями emAb (нижний ряд), полученными из переменных областей указанных широко нейтрализующих конструкций антител и легких цепей человека каппа (паливизумаб, VRC01 и MEDI8852) или лямбда (AMM01). Контрольные и сконструированные клетки emAb окрашивали подходящим антигеном, полученным из указанного патогена: Мономер РСВ-F или тетрамеры ВИЧ-ENV, ВЭБ GH/GL или HA-ствол.

Фиг. 29A-29D. Вставка emAb в продуктивный аллель IgH может блокировать выработку эндогенного IgH. (Фиг. 29A) Диаграмма аллелей RAMOS IgH: один продуктивный аллель, содержащий сайт-мишень emAb, и один аллель с транслокацией с-трус, исключающей сайт-мишень emAb. (Фиг. 29B) Проточная цитометрия, показывающая поверхностную экспрессию легкой цепи лямбда и связывание антигена РСВ-F во входных клетках RAMOS (гейтирование на CD79b+) и в клетках RAMOS, сконструированных α PCB-emAb (гейтирование на CD79b+/PCB-F+). (Фиг. 29C) Диаграмма первичных аллелей IgH: один продуктивный аллель и один непродуктивный аллель без функционально рекомбинированного VDJ, оба из которых содержат сайт-мишень emAb. (Фиг. 29D) Проточная цитометрия, показывающая поверхностную экспрессию легкой цепи и связывание антигена РСВ-F на входных отсортированных с легкой цепью+В-клетках (гейтирование на CD79b+) и В-клетках, сконструированных α PCB-emAb (гейтирование на CD79b+/PCB-F+).

Фиг. 30A-30E. Инженерия первичных В-клеток мыши с помощью кассеты α PCB-emAb (фиг. 30A) Схематическое представление способа инженерии В-клеток мыши. Сутки 0: В-клетки выделяют из селезенки и периферических лимфатических узлов (ПЛУ) посредством отрицательного отбора и праймируют CD40L-HA, анти-HA mAb и IL4. Сутки 1: клетки подвергают электропорированию с помощью cas9/онРНК RNP вместе с дцДНК (состояние дцДНК) или одним cas9/онРНК RNP с последующей обработкой ААВ, содержащей шаблон emAb HR, через 1 ч после электропорирования (состояние ААВ). Затем клетки поддерживали в культуре, как описано для суток 0. Сутки 3: клетки отбирают на связывание антигена или экспрессию тэга. Сутки 4-8L: отобранные клетки размножали на облученных питающих клетках, экспрессирующих CD40L, с добавлением IL-21. (Фиг. 30B) Независимый процент в В-клетках, обработанных IgH, нацеливающимся на cas9/онРНК RNP. (Фиг. 30C) Типичный FACS для связывания с мономерным белком преслияние-PCB-F в контрольных В-клетках или emAb В-клетках, сконструированных с использованием шаблонов дцДНК или ААВ. (Фиг. 30D) Частота клеток emAb в В-клетках, сконструированных с использованием шаблонов дцДНК или ААВ. (Фиг. 30E) Анти-PCB специфическое секретируемое антитело в супернатанте контрольных В-клеток или В-клеток, сконструированных с использованием шаблонов дцДНК или ААВ.

Фиг. 31A-31D. Защита от вирусной инфекции с помощью сконструированных α PCB-emAb В-клеток. (Фиг. 31A) Схематическое представление противовирусной защиты переносимыми клетками emAb. Сутки 0: $1,5 \times 10^7$ обогащенные PCB-emAb В-клетки переносятся путем в/б инъекции. Сутки 5: Паливизумаб путем в/б инъекции в дозе 15 мг/кг. Сутки 6: Взятие крови для измерения противовирусных титров Аб. Сутки 7: интраназальное заражение вирусом РСВ 10^6 БОЕ. Сутки 12: измерение вирусного титра в легких. (Фиг. 31B) Поверхностная экспрессия рецептора PCB-emAb до или через 24 ч после переноса клеток PCB-emAb, измеренная с помощью связывания мономера РСВ-F и тэга стрептактина. (Фиг. 31C) Плазменный титр антител к α PCB-F у мышей на 6-е сутки. (Фиг. 31D) Вирусные титры РСВ в легких мышей без перенесенных клеток, с α PCB-emAb В-клетками, с контрольными В-клетками или с 15 мг/кг паливизумаба, доставленного путем в/б инъекции за 48 ч до заражения.

Фиг. 32A, 32B. Мультиплексный перенос клеток, секретирующих антитело человека, мышам NSG (фиг. 32A) Схема переноса emAb В-клеток человека мышам NSG. Сутки 0: 5×10^6 анти-Flu emAb В-клеток и 5×10^6 анти-PCB emAb В, полученных, как описано на фиг. 27 были перенесены путем в/б инъекции. Сутки 7: Взятие крови для производства антител в сыворотке. (Фиг. 32B) ИФА для сывороточных титров антител к РСВ-F и антител к HA-стволу у мышей, которые получали клетки emAb (двойной перенос) по сравнению с контрольной сывороткой (без переноса).

Фиг. 33A, 33B. Шаблоны для длинной вставки кассет emAb в мышь (фиг. 33A) и человека (фиг. 33B) локус IgH. В верхнем ряду для каждого генома указаны положение элементов в локусах зародышевой линии IgH, включая конечные J-области, элемент интронного энхансера E μ и начало константного домена μ . Положение сайта-мишени cas9/онРНК указано (сайт Cut). Ниже показаны положения нацеливающих плеч, нацеливающих гомологичные плечи, включенные в конструкцию ААВ мыши и дцДНК (фиг. 33A), а также конструкция ААВ человека (фиг. 33B). Также показана кассета emAb, вставленная в геном.

Подробное описание сущности изобретения

Вакцины предназначены для повышения иммунитета субъекта против конкретной инфекции путем стимулирования В-клеток для выработки антител против целевого инфекционного агента. Антитела представляют собой белки, которые могут обеспечить защиту от патогенов. Антитела могут связываться с патогеном и являются защитными, когда это связывание нарушает нормальную функцию патогена. Например, многие защитные антитела связываются с частью патогена, которая блокирует проникновение патогена в клетки. Антитела могут быть прикреплены к поверхности В-клеток (известных как В-клеточные рецепторы), но при секреции в кровь выполняют большинство своих защитных функций.

Патоген может относиться к любому веществу, которое может вызывать заболевание, а патогенный может относиться к способности вещества вызывать заболевание. Примеры патогенных микроорганизмов включают вирусы, бактерии и грибки, которые могут заразить хозяина и вызвать заболевание. Другие примеры патогенов включают белки хозяина или другие вещества хозяина, вызывающие заболевание, такие как фактор некроза опухоли альфа (ФНО α), воспалительная молекула, связанная с многочисленными аутоиммунными состояниями (например, артрит), и бета-амилоидные бляшки, которые являются волокнистыми белками, которые накапливаются в мозге во время болезни Альцгеймера. В конкретных вариантах осуществления раковые клетки и/или опухоли могут также называться патогенами или патогенными веществами в зависимости от их способности вызывать заболевание.

При воздействии вакцины или природного патогена эпитоп, содержащийся в вакцине и/или присутствующий в патогене, может связываться с рецептором В-клетки, присутствующим на наивной В-клетке. Это связывание может привести к активации В-клетки и выработке защитных антител.

Наивная В-клетка относится к В-клетке до того, как она вступит в контакт со своим эпитопом. Каждая наивная В-клетка экспрессирует уникальное антитело с уникальной эпитопной специфичностью. Уникальное антитело, экспрессируемое каждой наивной В-клеткой, генерируется случайным образом посредством генетической рекомбинации. Наивные В-клетки экспрессируют мембраносвязанные антитела (то есть В-клеточные рецепторы) и после связывания с эпитопом могут быстро пролиферировать. Во время пролиферации и созревания гены антител подвергаются соматической мутации, которая служит для увеличения аффинности связывания эпитопа. Увеличение сродства связывания эпитопа, которое происходит во время созревания В-клеток, необходимо для эффективной защиты от патогена. Одна наивная В-клетка способна подвергаться десяткам клеточных делений для создания тысяч секретирующих антитела В-клеток и В-клеток памяти (фиг. 1) экспрессирующих то же антитело или родственное антитело, которое мутировало для улучшения связывания с патогеном.

Помимо активных В-клеток, секретирующих антитела, В-клетки памяти важны для защиты от патогенов. В-клетки памяти обычно не секретируют антитела активно, но могут быстро дифференцироваться в клетки, секретирующие антитела. Быстрая дифференцировка В-клеток памяти в клетки, секретирующие антитела, может помочь иммунной системе быстро реагировать на вторичную инфекцию или патоген, который ранее встречался при вакцинации (McHeyzer-Williams et al., *Nat Rev Immunol.* 2011; 12(1):24-34; Taylor et al., *Trends Immunol.* 2012;33(12):590-7). Например, В-клетки памяти поддерживают защиту от вируса гепатита В, когда уровень антител, секретируемых В-клетками, секретируемыми антитела, уменьшился (Williams et al., *Vaccine.* 2001; 19(28-29):4081-5; Bauer et al., *Vaccine.* 2006; 24(5):572-7). Таким образом, успешные вакцины стимулируют генерацию секретирующих антитела В-клеток и долгоживущих В-клеток памяти, которые способны экспрессировать антитела, которые связываются с эпитопом на патогене с высокой аффинностью.

К сожалению, существует много инфекционных агентов, для которых нет вакцин. Примеры инфекционных агентов без доступной эффективной стратегии вакцинации включают РСВ, ВИЧ и вирус Зика.

Что касается РСВ, то катастрофический отказ от инактивированной формалином вакцины против РСВ в 1960-х годах, вероятно, не был вызван неспособностью индуцировать секретирующие антитела В-клетки и В-клетки памяти, нацеленные на РСВ. Вполне вероятно, что вакцина индуцировала выработку антител, которые не нейтрализовали РСВ, но вместо этого усиливали инфекцию РСВ (фиг. 2А) (Blanco et al., *Hum Vaccin.* 2010;6(6):482-92; Broadbent et al., *Influenza Other Respir Viruses.* 2015; 9(4):169-78). Это подчеркивает тонкий баланс, который должен быть достигнут с помощью вакцин: индукция выработки "защитных" антител, нацеленных на определенные эпитопы, при этом избегая стимуляции выработки "патогенных" антител, нацеленных на неправильные эпитопы (фиг. 2А).

Анализ, проведенный в 2015 году в рамках Международной платформы регистрации клинических исследований Всемирной организации здравоохранения, выявил девять вакцин-кандидатов против РСВ, которые клинически оценивались с 2008 года, и ни одна из них не вышла за пределы фазы 2 тестирования (Broadbent et al., *Influenza Other Respir Viruses.* 2015; 9(4):169-78). Из них только три исследования были завершены, и только одно сообщило о результатах. Эта вакцина, названная MEDI-559, по видимому, уменьшает РСВ-инфекцию, но респираторные симптомы были слишком сильны для дальнейшего тестирования (Malkin et al., *PLoS One.* 2013;8(10):e77104). Эти данные свидетельствуют о том, что, хотя MEDI-559 индуцировала выработку защитных антител, она, вероятно, также индуцировала выработку патогенных антител (фиг. 2В).

Другие "улучшенные" стратегии вакцинации включают изменение состава, который вводят пациен-

там. Они включают альтернативные способы инактивации/ослабления вируса и изменения в адьюванте, направленные на усиление воспалительного ответа (Broadbent et al., *Influenza Other Respir Viruses*. 2015; 9(4):169-78; Garg et al., *The Journal of general virology*. 2014; 95(Pt 5):1043-54; Swanson et al., *J Virol*. 2014;88(20):11802-10; Widjaja et al., *PLoS One*. 2015; 10(6):e0130829; Stewart-Jones et al., *PLoS One*. 2015; 10(6):e0128779). Некоторые из этих подходов привели к увеличению количества защитных антител в моделях животных, но возможность индукции патогенных антител делает вероятным, что эти "улучшенные" вакцины против РСВ постигнет та же участь, что и MEDI-559.

В попытке сфокусировать иммунный ответ на эпитопы, на которые нацелены защитные антитела, недавний подход состоял в том, чтобы привить один эпитоп РСВ на каркас, не содержащий РСВ (фиг. 2С). Этот подход исключает возможность появления патогенных антител, специфичных для других эпитопов РСВ, поскольку они отсутствуют в каркасе. Введение эпитопной каркасной вакцины против РСВ макаки-резуса привела к выработке нейтрализующих антител некоторыми животными, но только после 3-5 инъекций (Corgeia et al., *Nature*. 2014;507(7491):201-6).

Были также разработаны подходы для обхода вакцинации и непосредственного введения защитных антител. Единственным клинически одобренным профилактическим лечением РСВ является инъекция высокоаффинного РСВ-специфического защитного антитела паливизумаба (фиг. 3А) (The PREVENT Study Group. *Pediatrics*. 1997; 99(1):93-9; The IMPact-PCB Study Group. *Pediatrics*. 1998; 102 (3 Pt 1): 531-7). К сожалению, стоимость 5-месячной серии Паливизумаба составляющей 10 000 долларов ограничила его использование детьми с высоким риском тяжелой инфекции РСВ (Meissner & Kimberlin, *Pediatrics*. 2013; 132(5):915-8). Другие РСВ-специфические антитела, рассчитанные на срок до года, в настоящее время проходят клиническую оценку (*Influenza Other Respir Viruses*. 2015; 9(4):169-78). Однако ежегодная повторная инъекция антител невозможна для защиты в течение всей жизни.

Чтобы исключить необходимость инъекций в течение всей жизни, были разработаны способы, в которых аденовирусный вектор используется для переноса гена, кодирующего защитное антитело, в мышечные клетки (фиг. 3В) (Schnepp & Johnson, *Curr Opin HIV AIDS*. 2014; 9(3):250-6). Многообещающим является то, что аденовирус-опосредованная экспрессия паливизумаба частично защищает мышечные клетки от инфекции РСВ (Skaricic et al., *Virology*. 2008;378(1):79-85). Однако ограничением этого подхода являются высокие затраты на производство высоких доз вируса, необходимых для достижения защитных уровней антител (24). Высокие дозы необходимы, потому что экспрессия антител мышечной клеткой является низкой по сравнению с предполагаемыми 10000 антител, выделяемыми в секунду одной В-клеткой (Helmreich et al., *J Biol Chem*. 1961; 236:464-73; Hibi & Dosch, *Eur J Immunol*. 1986; 16(2):139-45). В-клетки достигают такой высокой скорости секреции, полностью перепрограммируя свои механизмы производства белка, чтобы сосредоточиться на секреции антител. Без революции в производственных возможностях перенос генов антител, опосредованных аденовирусом, в мышечные клетки не является реалистичным вариантом профилактики РСВ.

В другом подходе используется лентивирусный вектор для включения генов, кодирующих защитные антитела, в геном гематопозитических стволовых клеток, которые впоследствии должны были бы дифференцироваться в В-клетки, секретирующие антитела (фиг. 3С). Одним из ограничений этого подхода является то, что вставка гена антитела является случайной, что создает риск возникновения нецелевых генетических эффектов, приводящих к заболеванию. Вторым ограничением этого подхода являются длительные двухмесячные условия культивирования *in vitro*, необходимые для индукции дифференцирования секретирующих антитела клеток из гематопозитических стволовых клеток (Luo et al., *Blood*. 2009; 113(7):1422-31). Последнее ограничение заключается в том, что эта стратегия не будет генерировать источник антител, который может быть увеличен при заражении. Следовательно, если секретирующие антитела клетки отсутствуют в большом количестве или не являются долгоживущими, защита от инфекции будет недостаточной.

В конкретных вариантах осуществления в настоящем раскрытии предложен обход вакцинации и/или устранение необходимости повторных инъекций терапевтических антител путем получения методом генетической инженерии В-клеток для экспрессии выбранного антитела (например, антитела против инфекционного агента (например, паливизумаба; фиг. 4А)). Типы В-клеток, которые особенно полезны для генной инженерии, включают существующие В-клетки, секретирующие антитела, В-клетки памяти, наивные В-клетки, В1 В-клетки и В-клетки маргинальной зоны. Наивные В-клетки обладают наибольшим пролиферативным и функциональным потенциалом и могут вступать в реакцию терминального центра и улучшать их способность к связыванию. В1 В-клетки экспрессируют BCR и мигрируют в разные места, такие как брюшная полость. В1 В-клетки быстро дифференцируются в секретирующие антитела клетки после стимуляции через BCR, и им не требуются сигналы для Т-клеток для оптимальной функции. В-клетки маргинальной зоны в основном расположены в краевой зоне селезенки и быстро дифференцируются в секретирующие антитела клетки при стимуляции через BCR. Клетки В маргинальной зоны также не требуют сигналов от Т-клеток для оптимальной функции. Получение методом генетической инженерии одного или более из этих подмножеств В-клеток может создать базовый уровень антител для лечения текущей или немедленной инфекции и долгоживущий источник индуцибельного антитела в случае будущей повторной инфекции. Фиг. 4В демонстрирует связанную стратегию одновре-

менной защиты от многочисленных патогенных микроорганизмов с использованием принципов настоящего изобретения, тогда как фиг. 5 изображает предполагаемую секрецию паливизумаба типичными подтипами В-клеток в присутствии и в отсутствие инфекции.

В настоящем раскрытии предложено получение методом генной инженерии В-клеток путем вставки генетической конструкции, включающей трансген, в локус гена эндогенного антитела, специально выбранный для использования из-за структуры и функции эндогенного генома В-клетки. Например, вставка трансгена, кодирующего, по меньшей мере, часть выбранного антитела, в локус гена эндогенного антитела может обеспечить надежную выработку выбранного антитела, используя преимущества механизма регуляции экспрессии эндогенного антитела. Трансген может относиться к фрагменту ДНК, который кодирует чужеродный (то есть экзогенный) белок. Генетическая конструкция может относиться к искусственно сконструированному сегменту нуклеиновой кислоты, который предназначен для введения в клетку для обеспечения возможности экспрессии чужеродного белка.

В конкретных вариантах осуществления в настоящем раскрытии предложены В-клетки, которые модифицированы для экспрессии выбранного антитела. Антитела вырабатываются из двух генов, гена тяжелой цепи и гена легкой цепи. Обычно антитело включает в себя две идентичные копии тяжелой цепи и две идентичные копии легкой цепи (см., например, фиг. 6В). Тяжелые цепи представляют собой более крупные субъединицы из двух, и каждая тяжелая цепь включает в себя сегмент VDJ и константную область (показана как "С" на фиг. 6В). Сегмент VDJ (или VDJ) относится к уникальному спариванию сегментов гена V, D и J, которые кодируют уникальную область тяжелых цепей антитела, которые связываются с эпитопом на патогене. Таким образом, V относится к одному из сегментов гена, который случайным образом соединяется с сегментом D и J для кодирования уникальной области тяжелой цепи антитела, которая связывается с эпитопом на патогене. Аналогично, D относится к одному из сегментов гена, который случайным образом соединяется с сегментом V и J для кодирования уникальной области тяжелой цепи антитела, которая связывается с эпитопом на патогене. Наконец, J относится к одному из сегментов гена, который случайно соединяется с сегментом V и D для кодирования уникальной области тяжелой цепи антитела, которая связывается с эпитопом на патогене. Существует несколько V-сегментов, D-сегментов и J-сегментов, которые могут объединяться во множество различных комбинаций для формирования конкретного VDJ-сегмента конкретной тяжелой цепи (см., например, фиг. 7).

Каждая В-клетка объединяет только одну комбинацию VDJ с консервативной константной областью С, образуя тяжелую цепь полной длины. С-область тяжелой цепи может взаимодействовать с другими иммунными белками, такими как Fc-рецепторы, чтобы активировать другие иммунные клетки. Все naive В-клетки экспрессируют одни и те же сегменты С-области, но они могут изменяться для экспрессии разных сегментов С-областей после активации, а разные С-области дают антителам разные функции. Например, один сегмент С-гена кодирует ϵ , а антитела, экспрессирующие ϵ , представляют собой "IgE". Антитела IgE-типа связываются с клетками организма и часто опосредуют аллергические реакции. Антитела, экспрессирующие область α С, представляют собой антитела IgA; антитела, экспрессирующие область γ С, представляют собой антитела IgG, а антитела, экспрессирующие область μ С, представляют собой антитела IgM. Геном человека включает один локус тяжелой цепи, который присутствует в хромосоме 14.

Снова ссылаясь на фиг. 6В, легкая цепь антитела (IgL) включает переменную область и константную область. Переменная область легкой цепи включает сегменты гена V и J, а константная область легкой цепи может включать единственный константный домен иммуноглобулина. Человек экспрессирует две разные легкие цепи: Igk, которая кодируется локусом иммуноглобулина каппа на хромосоме 2; и Igl, которая кодируется локусом иммуноглобулина лямбда на хромосоме 22.

Фиг. 6А изображает схему эндогенного генома В-клетки, который кодирует цепь IgH и цепь IgL. Фиг. 8А и 8В изображает исходные схемы, где экзогенные генетические конструкции согласно настоящему раскрытию могут быть вставлены для достижения экспрессии выбранного антитела. Фиг. 8А изображает встраивание генетической конструкции, включающей [сигнал остановки, цепь IgL выбранного антитела (здесь PV), пропускающий элемент (здесь 2A) и сегмент VDJ тяжелой цепи] в эндогенный геном IgH между эндогенным сегментом VDJ и кодирующими сегментами эндогенной С-области. Этот подход приводит к экспрессии всей экзогенной цепи IgL, экзогенного сегмента VDJ тяжелой цепи и эндогенной С-области тяжелой цепи. Экспрессия антитела, которое включает эндогенную С-область, может быть полезной, например, потому что она может позволить модифицированной В-клетке модулировать экспрессию С-области на основе естественной активации и созревания В-клеток. Например, альтернативный сплайсинг в константной области локуса гена тяжелой цепи может позволить модифицированной В-клетке переключаться между экспрессией мембраносвязанного антитела и экспрессией секретруемого антитела. Этот подход также позволяет экспрессию экзогенного VDJ без необходимости удаления эндогенного VDJ. Эта особенность полезна, потому что VDJ является относительно большим сегментом ДНК, и его удаление может отрицательно влиять на клеточные функции.

Фиг. 9 изображает аналогичную схему с более подробным описанием структуры и функции эндогенного генома В-клетки и того, как в настоящем описании используются эта структура и функция для

достижения экспрессии выбранных антител. Промоторные регионы необходимы для достижения транскрипции генного сегмента. Промоторы варибельной области тяжелой цепи (V_H) избирательно активны в линии В-клеток и включают ТАТА-бокс, элемент Inr и элемент октамера в пределах 100 пар оснований (п.о.) сайта инициации транскрипции. Активность промотора V_H находится под зависимостью-от-близости с помощью элемента энхансера E_μ эндогенного генома В-клетки (серый овал) и элемента энхансера, расположенного на 3'-конце локуса гена тяжелой цепи, проксимально к константному гену а тяжелой цепи (серый круг). Элемент энхансера E_μ представляет собой интронную область ДНК (длиной от 40 до 1500 п.о.) в интроне 700 п.о. между сегментом тяжелой цепи J и сегментом C μ (μ) локуса гена тяжелой цепи иммуноглобулина. Он может связывать белок-активатор для увеличения или активации транскрипции гена тяжелой цепи. Последовательность энхансерного элемента человека E_μ представлена на фиг. 11A как SEQ ID NO: 85. Последовательность энхансерного элемента мыши E_μ представлена на фиг. 13A как SEQ ID NO: 86.

Вставка генетической конструкции, которая включает V_H -промотор между эндогенной варибельной областью тяжелой цепи и эндогенным энхансером E_μ , может снижать или блокировать активацию транскрипции с эндогенного V_H -промотора, потому что энхансер E_μ будет иницировать транскрипцию на самом проксимальном восходящем промоторе. Таким образом, экспрессия эндогенного VDJ может блокироваться, не требуя удаления такого большого сегмента ДНК (что, как указано, является проблематичным для клеточной функции и выживания). В конкретных вариантах осуществления рекомбинация VDJ удаляет генетический материал между промоутером V_H и энхансером E_μ , который позиционирует энхансер на соответствующем расстоянии от экзогенного промотора генетической конструкции, раскрытой в настоящем документе, чтобы активировать транскрипцию, начиная с промотора во вставленной генетической конструкции. В конкретных вариантах осуществления эндогенный генетический материал не удаляется. В конкретных вариантах осуществления удаляется менее чем 50 пар оснований. В конкретных вариантах осуществления промоторы V_H в экзогенных генетических конструкциях включают нативный промотор легкой цепи для IgK или IgL, нативный промотор IgH человека, формирующий фокус селезенки вирусный промотор SFFV, промотор J558 h10 или промотор IgVH1-69.

Фиг. 10 изображает дополнительную схему для целевых областей для вставки генетической конструкции. Эти области-мишени охватывают две консервативные области, присутствующие во всех В-клетках: от концевого сегмента гена J (IGHJ6 у человека, IGHJ4 у мышей) до интронного энхансера тяжелой цепи (E_μ) и от E_μ до повторяющихся последовательностей, связанных с рекомбинацией ДНК-переключения.

В конкретных вариантах осуществления область эндогенного генома В-клетки, которая нацелена на вставку генетической конструкции, находится выше E_μ -энхансера SEQ ID NO: 85 или 86. На фиг. 11A-14B представлены конкретные последовательности, которые могут быть предназначены для вставки генетической конструкции для достижения экспрессии выбранного антитела, как описано в настоящем документе.

На фиг. 11A представлена последовательность ДНК человека IGHJ6 интронного энхансера E_μ (SEQ ID NO: 1; >hg38_dna range=chr14:105862523-105863244 5'pad=0 3'pad=0 strand=- repeatMasking=none). На фиг. 11B представлены примерные диапазоны для нацеливания (например, сайты нРНК) в этой последовательности, включая SEQ ID NO: 5-24 и последовательности нРНК (SEQ ID NO: 88, 89 и 290-307). В качестве примеров, в конкретных вариантах, онРНК SEQ ID NO: 88 (см. также фиг. 25A), может быть использована для нацеливания сайта нРНК SEQ ID NO: 7. В конкретных вариантах осуществления онРНК SEQ ID NO: 89 (см. также фиг. 25A), может быть использована для нацеливания сайта нРНК SEQ ID NO: 10.

На фиг. 12A представлена последовательность ДНК человека для области 2: От интронного энхансера E_μ до области переключения (SEQ ID NO: 2; >hg38_dna range=chr14:105860383-105861690 5'pad=0 3'pad=0 strand=-). На фиг. 12B представлены примерные диапазоны для нацеливания (например, сайты нРНК) в этой последовательности, включая SEQ ID NO: 25-44 и ассоциированные последовательности нРНК (SEQ ID NO: 308-327).

На фиг. 13A представлена последовательность ДНК мыши для области 1: от IGHJ4 до интронного энхансера E_μ (SEQ ID NO: 3; >mm10_dna range=chr12:113427973-113428554 5'pad=0 3'pad=0 strand=- repeatMasking=none). На фиг. 13B представлены примерные диапазоны для нацеливания (например, сайты нРНК) в этой последовательности, включая SEQ ID NO: 45-64 и ассоциированные последовательности нРНК (SEQ ID NO: (87 и 328-346). В качестве примера, в конкретных вариантах, онРНК SEQ ID NO: 87 (см. также фиг. 25A), может быть использована для нацеливания сайта нРНК SEQ ID NO: 46.

На фиг. 14A представлена последовательность ДНК мыши для области 2: от интронного энхансера E_μ до области переключения (SEQ ID NO: 4; >mm10_dna range=chr12:113425446-113426973 5'pad=0 3'pad=0 strand=- repeatMasking=none). На фиг. 14B представлены типичные диапазоны для нацеливания (например, сайтов нРНК) в этой последовательности, включая SEQ ID NO: 65-84 и ассоциированные последовательности нРНК (SEQ ID NO: 347-366).

Таким образом, в конкретных вариантах осуществления в настоящем раскрытии предложена целе-

вая вставка генетической конструкции, включающая (i) промотор и (ii) трансген, кодирующий часть выбранного антитела в интронной области, которая является постоянной во всех В-клетках (до и после рекомбинации) и (i) расположены относительно энхансерного элемента, который взаимодействует с промотором; и (ii) в такой конфигурации, что эндогенная последовательность VDJ тяжелой цепи В-клеток не экспрессируется. В конкретных вариантах осуществления кодированная часть выделенного антитела включает всю легкую цепь антитела и сегмент VDJ тяжелой цепи. Эти части выбранного антитела могут быть экспрессированы с константной областью тяжелой цепи, экспрессируемой модифицированной В-клеткой в любой момент времени. Конкретные варианты осуществления генетической конструкции также могут включать или кодировать сигнальный пептид, гибкий линкер, пропускающий элемент и/или граница сплайсинга.

Одна техническая проблема настоящего раскрытия состоит в том, что антитело представляет собой белок, полученный из двух отдельных генных продуктов: тяжелой цепи (IgH) и легкой цепи (IgL) (фиг. 6A, 6B). Это означает, что в конкретных вариантах осуществления оба генетических местоположения должны быть одновременно изменены, чтобы правильно экспрессировать выбранное антитело. Однако в настоящем раскрытии также предложены стратегии для получения функционально выбранных антител без необходимости модификации обоих генетических местоположений. Один подход, который позволяет это, заключается в использовании последовательностей, которые позволяют экспрессию антител через одну конструкцию. В конкретных вариантах осуществления это достигается путем включения пропускающего элемента в генетическую конструкцию. Одним примером пропускающего элемента является саморасщепляющийся пептид, такой как саморасщепляющийся пептид "2A". 2A пептиды функционируют, заставляя рибосому пропускать синтез пептидной связи в определенном месте, что приводит к образованию двух белков из одной мРНК. Последовательности 2A являются короткими (например, 20 аминокислот), что облегчает использование в конструкциях с ограниченным размером, и белки получают в соотношении 1: 1. Конкретные примеры включают T2A (GSG)EGRGSLTTCGDVEENPGP (SEQ ID NO: 176); P2A (GSG)ATNFSLLKQAGDVEENPGP (SEQ ID NO: 177); E2A (GSG)QCTNYALLKLAGDVESNPGPP (SEQ ID NO: 178); и F2A (GSG)VKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP (SEQ ID NO: 179).

В конкретных вариантах осуществления генетические конструкции включают последовательность внутреннего участка посадки рибосомы (IRES). IRES могут быть расположены выше VDJ тяжелой цепи генетической конструкции. IRES представляют собой некодирующие структурированные последовательности РНК, которые позволяют рибосомам инициировать трансляцию во втором внутреннем сайте молекулы мРНК, что приводит к образованию двух белков из одной мРНК. Однако трансляция, управляемая IRES, менее эффективна, чем трансляция, управляемая 2A, что приводит к снижению экспрессии второго белка в транскрипте.

В конкретных вариантах осуществления генетические конструкции кодируют гибкий линкер между частью легкой цепи выбранного антитела и частью тяжелой цепи выбранного антитела. Линкер может представлять собой серию аминокислот, которые гибко связывают один белковый домен с другим белковым доменом таким образом, который позволяет связанным последовательностям взаимодействовать, образуя функциональную единицу.

В конкретных последовательностях гибкие линкеры могут включать одну или более серий комбинаций глицина и серина, которые обеспечивают гибкость линкерной последовательности. Примерные Gly-Ser линкеры включают (GGS)*n* (SEQ ID NO: 180), (GGGS)*n* (SEQ ID NO: 181), и (GGGGS)*n* (SEQ ID NO: 182), в которых *n*=1-100 и каждому целому числу между 1 и 100. В конкретных вариантах осуществления *n*=10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30. В конкретных вариантах осуществления линкер Gly-Ser включает 50-80 аминокислот. В конкретных вариантах осуществления линкер Gly-Ser включает 54, 57 или 60 аминокислот. В конкретных вариантах осуществления линкер Gly-Ser кодируется SEQ ID NO: 116. В конкретных вариантах осуществления линкер Gly-Ser включает SEQ ID NO: 122.

Дополнительные примеры гибких линкеров включают (KESGSVSSEQLAQFRSLD)*n* (SEQ ID NO: 183) и (EGKSSGSGSESKST)*n* (SEQ ID NO: 184). В этих линкерах остатки Gly и Ser в линкере были включены для обеспечения гибкости, тогда как Glu и Lys были добавлены для улучшения растворимости. Bird, RE et al. Science, 1988; 242:423-426. В конкретных вариантах осуществления *n*=1-100 и каждому целому числу между 1 и 100. В конкретных вариантах осуществления *n*=10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30. В конкретных вариантах осуществления эти линкеры содержат 50-80 аминокислот.

Конкретные варианты осуществления включают границу сплайсинга, которая позволяет осуществлять сплайсинг между РНК, кодируемой генетической конструкцией, и РНК, кодируемой эндогенной константной областью тяжелой цепи. В конкретных вариантах осуществления генетические конструкции включают последовательность соединения сплайсинга на 3'-конце. Сплайсинг может относиться к удалению интронов и объединению экзонов с помощью комплекса РНК/белок, известного как сплайсосома. Граница сплайсинга относится к интронной последовательности, непосредственно фланкирующей экзон. Граница сплайсинга на 3'-конце экзона может включать донорный сайт сплайсинга. Последовательности донорного сайта сплайсинга обычно начинаются с "GU". В конкретных вариантах осуществления грани-

ца сплайсинга может включать в себя 40-80 п.о. интрона, следующего за последним экзоном VDJ. В конкретных вариантах осуществления граница сплайсинга включает 40-80 п.о. интрона, фланкирующего 3'-конец сегмента гена IGHI1 человека или гена IGHI3 мыши. В конкретных вариантах осуществления граница сплайсинга включает CAG/gtaagt, причем вырезание и сплайсинг происходят после заглавной буквы G (обозначено аннотацией "сплайсинг"). В конкретных вариантах осуществления граница сплайсинга включает CAG/gtgagt. CA образуют конец серинового кодона, а G начинает первый кодон из константной области. В конкретных вариантах осуществления граница сплайсинга с фланкирующей последовательностью включает в себя SEQ ID NO: 124 или 151 в генетических конструкциях для введения в локус человека. В конкретных вариантах осуществления граница сплайсинга с фланкирующей последовательностью включает SEQ ID NO: 139 в генетических конструкциях для введения в локус мыши.

Описанные в настоящем документе генетические конструкции также могут кодировать сигнальные пептиды. Примерные сигнальные пептиды включают сигнальные пептиды полученные из тяжелых цепей IgH человека, такие как MELGLSWIFLLAILKGVQC (SEQ ID NO: 185); MELGLRWVFLVAILEGVQC (SEQ ID NO: 186); MKHLWFFLLVAAAPRWVLS (SEQ ID NO: 187); MDWTWRILFLVAAATGAHS (SEQ ID NO: 188); MDWTWRFLFVAAATGVQS (SEQ ID NO: 189); MEFGLSWLFLVAILKGVQC (SEQ ID NO: 190); MEFGLSWVFLVALFRGVQC (SEQ ID NO: 191); и MDLLHKNMKHLWFFLLVAAAPRWVLS (SEQ ID NO: 192); и сигнальные пептиды полученные из легких цепей IgL человека, такие как MDMRVPAQLLGLLLWLSGARC (SEQ ID NO: 193); и MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMA (SEQ ID NO: 194). В конкретных вариантах осуществления сигнальный пептид кодируется SEQ ID NO: 112 и включает в себя SEQ ID NO: 118 в генетических конструкциях для введения в локус человека. В конкретных вариантах осуществления сигнальный пептид кодируется SEQ ID NO: 129 и включает в себя SEQ ID NO: 134 в генетических конструкциях для введения в локус мыши. Смотрите также фиг. 25B-25I и Haryadi R et al., *tPLoS One* v.10(2); 2015 PMC4338144.

Как указано, в конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения используется вставка экзогенных генетических конструкций в целевое местоположение в эндогенном геноме В-клетки. В конкретных вариантах осуществления такая целевая вставка может быть облегчена путем включения гомологичных областей на одном или обоих концах генетической конструкции. Гомологичные области (то есть гомологичные швы или гомологичные плечи) гомологичны последовательностям в желаемом сайте вставки. В конкретных вариантах осуществления термин "гомологичные плечи" относится к сегментам ДНК, включенным в генетическую конструкцию, которые на 100% идентичны области ДНК, которая подвергается модификации. В конкретных вариантах осуществления 100%-ная идентичность может не требоваться для достижения целевой вставки (например, по меньшей мере, 90%-ная идентичность может быть достаточной).

Гомологичные области заставляют генетическую конструкцию выравниваться рядом с целевой генетической областью, и части ДНК из генетической конструкции обмениваются в область, вырезанную способами редактирования генов. В конкретных вариантах осуществления генетическая конструкция может включать в себя верхний гомологичный конец генома с от 20 до 1500 п.о. гомологии генома и нижний гомологичный конец генома с от 20 до 1500 п.о. гомологии генома, гомологичные области могут, например, обеспечивать "гомологичные швы", как показано на фиг. 15A, которые могут опосредовать вставку генетической конструкции в целевой сайт вставки. В конкретных вариантах осуществления верхний гомологичный конец генома и нижний гомологичный конец генома могут включать последовательности, гомологичные последовательностям генома между областью VDJ тяжелой цепи и элементом энхансера E μ тяжелой цепи. В конкретных вариантах осуществления гомологичные области могут, в частности, включать 20-50 пар оснований; 300-500 пар оснований; 350-550 пар оснований; 900-1000 пар оснований или 400-600 пар оснований. В конкретных вариантах осуществления гомологичные области могут, в частности, включать 30-40 пар оснований (например, 36 пар оснований); 445-455 пар оснований (например, 450 пар оснований); 495-510 пар оснований (например, 503 пар оснований); и/или 960-980 пар оснований (например, 968 пар оснований). В конкретных вариантах осуществления гомологичные области для использования в генетических конструкциях мыши включают SEQ ID NO: 90, 91, 96, 97, 127, 140, 142, 143, 170 и 171. В конкретных вариантах осуществления гомологичные области для использования в генетических конструкциях человека включают SEQ ID NO: 92-95, 98-101, 110, 125, 153, 173 и 174.

В конкретных вариантах осуществления генетические конструкции также кодируют последовательность тэга. Последовательности тэга могут быть полезны, например, для того, чтобы клетки, экспрессирующие генетическую конструкцию, могли быть идентифицированы и/или отсортированы во время процессов генетической модификации и/или чтобы их можно было контролировать после введения субъекту. Например, в конкретных вариантах осуществления может быть полезно отслеживать и/или уничтожать генетически модифицированные клетки после введения субъекту. Примерные тэги включают STREPTAG® (GmbH, LLC, Гетинген, Германия), STREP® tag II (WSHPQFEK (SEQ ID NO: 195)), или любой их вариант; см., например, патент США № 7981632), His тэг, Flag тэг (DYKDDDDK (SEQ ID NO: 196)), Xpress тэг (DLYDDDDK (SEQ ID NO: 197)), Avi тэг (GLNDIFEAQKIEWHE (SEQ ID NO: 198)),

кальмодулин тэг (KRRWKKNFIAVSAANRFKISSSGAL (SEQ ID NO: 199)), полиглутаматный тэг, НА тэг (YPYDVDPDYA (SEQ ID NO: 200)), Мус тэг (EQKLISEEDL (SEQ ID NO: 201)), Nus тэг, S тэг, SBP тэг, Softag 1 (SLAELLNAGLGGG (SEQ ID NO: 202)), Softag 3 (TQDPSRVG (SEQ ID NO: 203)) и V5 тэг (GKPIPNLLGLDST (SEQ ID NO: 204)).

В конкретных вариантах осуществления в настоящем раскрытии предложена генетическая конструкция для экспрессии выбранного антитела, включающая или кодирующая (i) промотор тяжелой цепи и/или (ii) легкую цепь иммуноглобулина и/или (iii) варибельную область тяжелой цепи, и/или (iv) стоп-кодон; и/или (v) пропускающий элемент и/или (vi) границу сплайсинга и/или (vii) гомологичные плечи и/или (viii) линкер и/или (ix) тэг.

Конкретные варианты осуществления включают или кодируют: (i) промотор тяжелой цепи; (ii) сигнальный пептид; (iii) всю легкую цепь выбранного антитела; (iv) гибкий линкер или пропускающий элемент; (v) варибельную область тяжелой цепи выбранного антитела; и (vi) соединение сплайсинга.

Конкретные варианты осуществления включают или кодируют: (i) промотор тяжелой цепи; (ii) сигнальный пептид; (iii) всю легкую цепь выбранного антитела; (iv) гибкий линкер или пропускающий элемент; (v) варибельную область тяжелой цепи выбранного антитела; (vi) границу сплайсинга и (vii) гомологичные плечи.

Конкретные варианты осуществления включают или кодируют: (i) промотор тяжелой цепи; (ii) сигнальный пептид; (iii) всю легкую цепь выбранного антитела; (iv) гибкий линкер или пропускающий элемент; (v) варибельную область тяжелой цепи выбранного антитела; (vi) границу сплайсинга, (vii) гомологичные плечи; и (viii) тэг.

На фиг. 15В изображены дополнительные примеры шаблонов репарирования ДНК. Примеры шаблонов репарирования ДНК, которые также могут быть использованы, включают синтетические шаблоны ДНК и аденоассоциированные вирусы. В конкретных вариантах осуществления синтетические шаблоны ДНК могут включать двухцепочечную ДНК (дцДНК), включающую или кодирующую промотор и выбранную часть антитела, фланкированную 20-1500 парами оснований гомологичными сайту-мишени в геноме. В конкретных вариантах осуществления синтетические шаблоны ДНК могут включать одноцепочечную ДНК (оцДНК), включающую или кодирующую промотор и выбранную часть антитела, фланкированную 10-80 парами оснований или 400-1000 парами оснований гомологичными сайту-мишени в геноме. В конкретных вариантах осуществления синтетические шаблоны ДНК могут включать как дцДНК, так и оцДНК, модифицированные путем фосфорилирования на концах для повышения эффективности лигирования ДНК. В конкретных вариантах осуществления и дцДНК, и оцДНК могут быть модифицированы на концах фосфоротиоатными связями для повышения стабильности и предотвращения расщепления эндонуклеазой.

В конкретных вариантах осуществления аденоассоциированный вирус может включать сегмент, кодирующий часть синтетического антитела, фланкированную 20-1500 парами оснований гомологичных сайту-мишени в геноме. В конкретных вариантах осуществления последовательность, кодирующая участок промотора и синтетического антитела, может быть фланкирована путем сопоставления гомологичных последовательностей с сайтом-мишенью в геноме.

В конкретных вариантах осуществления генетическая конструкция, включающая механизм репарирования ДНК (например, гомологичные швы, шаблон синтетической ДНК), может доставляться с использованием системы редактирования генов, такой как CRISPR, TALEN, megaTAL, нуклеазы цинкового пальца и/или аденоассоциированный вирус как описано более подробно ниже. Например, элемент, нацеливающийся на геном, режущий элемент генома и описанная в настоящем изобретении генетическая конструкция могут быть введены в В-клетку.

В качестве конкретного примера применения настоящего раскрытия В-клетки могут быть модифицированы для экспрессии антитела к паливизумабу. В-клетки могут быть модифицированы генетической конструкцией, которая включает в себя гомологичные плечи длиной 80 п.о., фланкирующие промотор тяжелой цепи выше от полной легкой цепи (IgLPV) и генные сегменты тяжелой цепи VDJ (VDJPV) из паливизумаба, отделенные пептидом 2А. В настоящем изобретении, пептид 2А включен для того, чтобы вызвать рибосомальный пропуск (Donnelly et al., *The Journal of General Virology*. 2001; 82 (Pt 5): 1013-25), что позволяет получить тяжелую цепь и легкую цепь в виде отдельных субъединиц, которые будут нормально связываться с образованием выбранного антитела. В конкретных вариантах осуществления, стоп-кодон может быть включен выше встроенного промотора тяжелой цепи, чтобы остановить любую потенциальную транскрипцию эндогенной варибельной области тяжелой цепи.

На фиг. 16 представлен пример "модифицированного" генома В-клетки, тогда как на фиг. 17 изображены результирующие популяции В-клеток, экспрессирующих выбранные антитела.

В следующих параграфах приведено более подробное описание, касающееся (i) типичных выбранных антител и последовательностей; (ii) способов редактирования генов и сортировки клеток; (iii) сопоставления модифицированных В-клеток; и (iv) способов использования.

(i) Типичные выбранные антитела и последовательности. В конкретных вариантах осуществления выбранное антитело представляет собой антитело, которое может обеспечивать защитный эффект против патогена или состояния (например, аутоиммунного заболевания). В конкретных вариантах осуществле-

ния выбранное антитело представляет собой антитело к РСВ, антитело к ВИЧ, антитело к вирусу Денге, антитело к Bordatella pertussis, антитело к гепатиту С, антитело к вирусу гриппа, антитело к вирусу парагриппа, антитело к метапневмовирусу (МПВ), антитело к цитомегаловирусу, антитело к вирусу Эпштейна-Барра; антитело к вирусу простого герпеса, антитело к бактериальному токсину Clostridium difficile или антитело к фактору некроза опухоли (ФНО).

В конкретных вариантах осуществления выбранные антитела представляют собой химерные антитела. В конкретных вариантах осуществления химерные антитела относятся к синтетическому антителу, которое включает: (i) по меньшей мере одну часть, которая кодируется эндогенным геномом В-клетки, и (ii) по меньшей мере одну часть, которая кодируется встроенной генетической конструкцией. В конкретных вариантах осуществления химерное антитело включает константный домен эндогенной тяжелой цепи, экзогенную переменную и константную область легкую цепи иммуноглобулина и экзогенную переменную область тяжелой цепи.

Следующие антитела и последовательности полезны для предоставления выбранным антителам целевого связывания с интересующими патогенами или антигенами (если не указано иное, предназначена нумерация по Кабату).

Типичным антителом к РСВ является паливизумаб, который нацелен на слитый белок РСВ и используется для предотвращения или уменьшения РСВ-инфекций.

В конкретных вариантах осуществления антитело к РСВ представляет собой паливизумаб мыши, который включает переменную последовательность тяжелой цепи, включающую:

QVELQESGPGILQPSQTLTLTCSFSGFSLSTSGMSVGVWIRQPSGEGLEWLADIWW
DDKKDYNPSLKSRLTISKDTSSNQVFLKITGVDTADTATYYCARSMITNWWYFDVWVWAG
TTVTVSS (SEQ ID NO: 138);

и переменную последовательность легкой цепи, включающую:

DIQLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSVGYMHWYQQKLTSPKLIYDTSKLAS
GVPRGFSGSGNSYSLTISSIAEDVATYYCFRGSYPPFTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO:
205).

Дополнительным типичным антителом к РСВ является паливизумаб человека, и он включает переменную последовательность легкой цепи, включая:

DIQMTQSPSTLSASVGDRTITCKCQLSVGYMHWYQQKPKGKAPKLLIYDTSKLA
SGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDFATYYCFQGSYPPFTFGGGTKLEIKR (SEQ ID NO:
206);

и переменную последовательность тяжелой цепи, включающую:

QVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGMSVGVWIRQPPGKALEWLADIW
WDDKKDYNPSLKSRLTISKDTSKNQVVLKVTNMDPADTATYYCARSMITNWWYFDVWVW
AGTT (SEQ ID NO: 123).

Внутри переменной области тяжелой цепи и переменной области легкой цепи сегменты, называемые комплементарными определяющими областями (CDR), диктуют связывание с эпитопом. Каждая тяжелая цепь имеет три CDR (т.е. CDRH1, CDRH2 и CDRH3), и каждая легкая цепь имеет три CDR (то есть CDRL1, CDRL2 и CDRL3).

Дополнительное примерное антитело к РСВ описано в патенте США № 9403900. Это антитело к РСВ включает переменную область тяжелой цепи, включающую последовательность CDRH1, включающую GASINSDNYWT (SEQ ID NO: 207), последовательность CDRH2, включающую HSYTGNTYYTPSLKS (SEQ ID NO: 208) и последовательность CDRH3, включающую CGAYVLISNCGWFDS (SEQ ID NO: 209); и переменную область легкой цепи, включающую последовательность CDRL1, включающую QASQDISTYLN (SEQ ID NO: 210), последовательность CDRL2, включающую GASNLET (SEQ ID NO: 211) и последовательность CDRL3, включающую QQYQYLPYT (SEQ ID NO: 212).

Типичные антитела к РСВ также включают AB1128 (доступный от MILLIPORE) и ab20745 (доступный от ABCAM).

Примером антитела к ВИЧ является 10E8, которое является широко нейтрализующим антителом, которое связывается с gp41. Антитело к ВИЧ 10E8 включает переменную область тяжелой цепи, включающую последовательность CDRH1, включающую GDFDFAW (SEQ ID NO: 213), последовательность CDRH2, включающую ITGPGEGWSV (SEQ ID NO: 214) и последовательность CDRH3, включающую TGKYYDFWSGYPPGEEYFQD (SEQ ID NO: 215); и переменную область легкой цепи, включающую последовательность CDRL1, включающую TGDSLRSYAS (SEQ ID NO: 216), последовательность CDRL2, включающую GKNNRPS (SEQ ID NO: 217) и последовательность CDRL3, включающую SSRD-KSGSRLSV (SEQ ID NO: 218).

Дополнительным примером антитела к ВИЧ является VRC01, которое является широко нейтрализующим антителом, которое связывается с сайтом связывания CD4 gp120. Антитело VRC01 включает переменную область тяжелой цепи, включающую последовательность CDRH1, включающую GYE-FIDCT (SEQ ID NO: 219), последовательность CDRH2, включающую KPRGGAVN (SEQ ID NO: 220), и

последовательность CDRH3, включающую RGKNC DYNWDFEHW (SEQ ID NO: 221); и варибельную область легкой цепи, включающую последовательность CDRL1, включающую QYGS, последовательность CDRL2, включающую SGS, и последовательность CDRL3, включающую QQYEF (SEQ ID NO: 222).

Типичные антитела к ВИЧ также включают ab18633 и 39/5.4A (доступны от ABCAM); и H81E (доступно от THERMOFISHER).

Примером антитела к вирусу Денге является антитело 55, описанное в патенте США №20170233460, и оно включает варибельную область тяжелой цепи, включающую последовательность CDRH1, включающую EVQLHQSGAELVKPGASVKLSCTVSGFNIK (SEQ ID NO: 223), последовательность CDRH2, включающую WVKQRPEQGLEWI (SEQ ID NO: 224), и последовательность CDRH3, включающую АТІКADТSSNTAYLQLISLTSEDTAVYYCAF (SEQ ID NO: 225); и варибельную область легкой цепи, включающую последовательность CDRL1, включающую DIQMTQSPASLSVSVGETVTITC (SEQ ID NO: 226), последовательность CDRL2, включающую WYQQKQKSPQLLVY (SEQ ID NO: 227), и последовательность CDRL3, включающую GVPSPRFSGSGSGTQYSLKINSLSQSEDFGTYYC (SEQ ID NO: 228).

Дополнительным примером антитела к вирусу Денге является DB2-3, описанное в патенте США № 8637035, и включает варибельную область тяжелой цепи, включающую последовательность CDRH1, включающую YTFDYAIT (SEQ ID NO: 229), последовательность CDRH2, включающую GLISTY-YGDSFYNQKFKG (SEQ ID NO: 230) и последовательность CDRH3, включающую TIRDGKAMDY (SEQ ID NO: 231); и варибельную область легкой цепи, включающую последовательность CDRL1, включающую RSSQSLVHSNGNTYLH (SEQ ID NO: 232), последовательность CDRL2, включающую KVSNRFS (SEQ ID NO: 233), и последовательность CDRL3, включающую SQSTHVPYT (SEQ ID NO: 234). Примеры антител к вирусу Денге также включают ab155042 и ab80914 (оба доступны от ABCAM).

Пример антител к коклюшу, описан в патенте США №9512204 и включает в себя варибельную область тяжелой цепи, включающую QVQLQQPGSELVVRPGASVKLSCKASGYKFTSYWMHWVKQRP-GQGLEWIGNIFPGSGST NYDEKFNSKATLTVDTSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYYCTRWLSGAYFDYW-GQGTTVT VSS (SEQ ID NO: 235) и варибельную область легкой цепи, включающую QIVLTQSPALM-SASPGEKVTMTCSASSVSFMYWYQQKPRSSPKWIYLTSLNPSGVPA RFSGSGSGTSYSLTISSMEAE-DAATYYCQQWSSHPPTFGSGTKLEIK (SEQ ID NO: 236).

Пример антитела к гепатиту С включает варибельную область тяжелой цепи, включающую последовательность CDRH1, включающую SYGMHW (SEQ ID NO: 237), последовательность CDRH2, включающую VIWLDGSNTYYADSVKGR (SEQ ID NO: 238) и последовательность CDRH3, включающую ARDIFTVARGVIIFYDY (SEQ ID NO: 239); и включающую варибельную область легкой цепи, включающую последовательность CDRL1, включающую RASQSVSSYLA (SEQ ID NO: 240), последовательность CDRL2, включающую DASNRAT (SEQ ID NO: 241) и последовательность CDRL3, включающую QQRSNWVT (SEQ ID NO: 242). Примеры антител к гепатиту С также включают MAB8694 (доступно от MILLIPORE) и C7-50 (доступно от ABCAM).

Пример антитела к вирусу гриппа описан в патенте США № 9469685 и включает варибельную область тяжелой цепи, включающую последовательность CDRH1, включающую GMTSNSLA (SEQ ID NO: 243), последовательность CDRH2, включающую IIPVFETP (SEQ ID NO: 244), и последовательность CDRH3, включающую ATSAGGIVNYYLSFNI (SEQ ID NO: 245); и варибельную область легкой цепи, включающую последовательность CDRL1, включающую QTITTW (SEQ ID NO: 246), последовательность CDRL2, включающую KTS, и последовательность CDRL3, включающую QQYSTYSGT (SEQ ID NO: 247). Пример антитела к вирусу гриппа также включает C102 (доступно от THERMOFISHER).

Типичное антитело к МПВ включает MPE8.

Типичные антитела к ЦМВ включают MCMV5322A, MCMV3068A, LJP538 и LJP539. RG7667 включает смесь MCMV5322A и MCMV3068A, тогда как CSJ148 включает смесь LJP538 и LJP539. См. также, например, Deng et al., *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 62(2) e01108-17 (Feb. 2018); и Dole et al., *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 60(5) 2881-2887 (May 2016).

Пример антитела к ВЭБ включает варибельную область тяжелой цепи, включающую последовательность CDRH1 AMM01, включающую YTFIHFGISW (SEQ ID NO: 248), последовательность CDRH2 AMM01, включающую IDTNNGNTNYAQS LQG (SEQ ID NO: 249) и последовательность CDRH3 AMM01, включающую RALEMGHRSGFPFDY (SEQ ID NO: 250); и варибельную область легкой цепи, включающую последовательность CDRL1 AMM01, включающую GGHNIGAKNVH (SEQ ID NO: 251), последовательность CDRL2 AMM01, включающую YSDRPS (SEQ ID NO: 252) и последовательность CDRL3 AMM01, включающую CQVWDSGRGHPLYV (SEQ ID NO: 253).

Пример антитела к ВПГ включает HSV8-N и MB66.

Типичные антитела к *Clostridium difficile* включают актоксумаб и безлотоксумаб. См., также, например, Wilcox et al., *N Engl J Med* 376(4) 305-317 (2017).

Коммерчески доступные антитела к ФНО включают инфликсимаб (Remicade® Centocor, Inc., Малверн, Пенсильвания с биоаналогами Inflectra® Pfizer, Кент, Великобритания и Ixifi® Pfizer, Нью-Йорк,

Нью-Йорк), адалимумаб (Humira® Abbott Laboratories, Эббот Парк, Иллинойс с биоаналогами Amjevita® Amgen, Саузен Оакс, Калифорния и Syltzeo® Boehringer Ingelheim Int'l, Ингельхайм, Германия), голиму-маб (Simponi® Johnson & Johnson Corp., Нью-Брансуик, Нью-Джерси), этанерцепт (Enbrel® Immunex Corp, Саузерн Оакс, Калифорния с биоподобным Egelzi® Novartis AG, Базель, Швейцария) и цертолизумаб-пеголом (Cimzia® UCB Pharma, Брюссель, Бельгия).

В конкретных вариантах осуществления CDR инфликсимаба включают: остатки тяжелой цепи 26-37, 52-70 и 103-116 и остатки легкой цепи 24-39, 55-61 и 94-102. В конкретных вариантах осуществления тяжелая цепь инфликсимаба начинается с EVKLEESGGGLVQPGGSMK (SEQ ID NO: 254), а легкая цепь начинается с DILLTQSPAILSVPGER (SEQ ID NO: 255).

В конкретных вариантах осуществления инфликсимаб включает переменную область тяжелой цепи, включающую последовательность CDRH1, включающую IFSNHW (SEQ ID NO: 256), последовательность CDRH2, включающую RSKSINSATH (SEQ ID NO: 257), и последовательность CDRH3, включающую NYYGSTY (SEQ ID NO: 258); и переменную область легкой цепи, включающую последовательность CDRL1, включающую FVGSSIH (SEQ ID NO: 259), последовательность CDRL2, включающую KYASESM (SEQ ID NO: 260) и последовательность CDRL3, включающую QSHSW (SEQ ID NO: 261).

В конкретных вариантах осуществления адалимумаб включает переменную область тяжелой цепи, включающую последовательность CDRH1, включающую TFDDYA (SEQ ID NO: 262), последовательность CDRH2, включающую TWNSGHID (SEQ ID NO: 263), и последовательность CDRH3, включающую VSYLSTASSL (SEQ ID NO: 264); и переменную область легкой цепи, включающую последовательность CDRL1, включающую GIRNYLA (SEQ ID NO: 265), последовательность CDRL2, включающую YAAATLQ (SEQ ID NO: 266) и последовательность CDRL3, включающую RYNRA (SEQ ID NO: 267).

В конкретных вариантах осуществления цертолизумаб включает переменную область тяжелой цепи, включающую последовательность CDRH1, включающую VFTDYG (SEQ ID NO: 268), последовательность CDRH2, включающую NTYIGEPI (SEQ ID NO: 269) и последовательность CDRH3, включающую GYRSYAM (SEQ ID NO: 270); и переменную область легкой цепи, включающую последовательность CDRL1, включающую NVGTNVA (SEQ ID NO: 271), последовательность CDRL2, включающую YSASFLY (SEQ ID NO: 272) и последовательность CDRL3, включающую QYNIY (SEQ ID NO: 273).

Многочисленные дополнительные последовательности антител, которые могут быть использованы в рамках настоящего описания, доступны и известны специалистам в данной области техники. Информация о последовательности для коммерчески доступных антител может быть найдена в базе данных Drug Bank, CAS Registry и/или RSCB Protein Data Bank. Кроме того, последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие части выбранных антител, описанных в настоящем документе, могут быть легко получены специалистом в данной области техники.

(ii) Способы редактирования генов и сортировка клеток. Системы редактирования генов позволяют контролировать целевые сайты генетической терапии. В рамках настоящего описания может быть использована любая система редактирования генов, способная к точному нацеливанию и модификации последовательности. Эти системы обычно включают целевой элемент для точного нацеливания и режущий элемент для вырезания целевого генетического сайта. Направляющая РНК является одним из примеров нацеливающего элемента, в то время как различные нуклеазы являются примерами режущих элементов. Нацеливающие элементы и режущие элементы могут быть отдельными молекулами или связанными, например, наночастицей. Альтернативно, нацеливающий элемент и режущий элемент могут быть связаны вместе в одну молекулу двойного назначения. Когда предполагается введение терапевтической последовательности нуклеиновой кислоты, системы также могут включать шаблоны репарирования, направленные на гомологию (т.е. гомологичные группы, как описано выше), связанную с генетической конструкцией. Однако, как подробно описано ниже, разные системы редактирования генов могут принимать разные компоненты и конфигурации, сохраняя при этом способность точно нацеливать, вырезать и модифицировать выбранные сайты генома.

В конкретных вариантах осуществления используют цинк-пальцевые нуклеазы (ZFN) в качестве агентов для редактирования генов. ZFN представляют собой класс сайт-специфических нуклеаз, сконструированных для связывания и расщепления ДНК в определенных положениях. ZFN используются для введения двухцепочечных разрывов (DSB) в конкретном сайте в последовательности ДНК, что позволяет ZFN нацеливаться на уникальные последовательности в геноме в различных клетках. Более того, после двухцепочечного разрыва происходит восстановление с направленной гомологией (HDR) или негомологическое соединение концов (NHEJ) для восстановления DSB, что позволяет редактировать геном.

ZFN синтезируются путем слияния ДНК-связывающего цинк-пальцевого домена с доменом расщепления ДНК. ДНК-связывающий домен включает от трех до шести цинк-пальцевых белков, которые являются факторами транскрипции. Домен расщепления ДНК включает каталитический домен, например, домен FokI эндонуклеазы. Домен FokI функционирует как димер, требующий двух конструкций с уникальными ДНК-связывающими доменами для сайтов последовательности-мишени. Домен расщепления FokI расщепляет в спейсерной последовательности из пяти или шести пар оснований, разделяющей два

инвертированных полусайта.

Для получения дополнительной информации о ZFN см. Kim, et al. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 1156-1160 (1996); Wolfe, et al. *Annual review of biophysics and biomolecular structure* 29, 183-212 (2000); Bibikova, et al. *Science* 300, 764 (2003); Bibikova, et al. *Genetics* 161, 1169-1175 (2002); Miller, et al. *The EMBO journal* 4, 1609-1614 (1985); и Miller, et al. *Nature biotechnology* 25, 778-785 (2007).

В конкретных вариантах осуществления может использоваться активатор транскрипции, такой как эффекторные нуклеазы (TALEN), в качестве агентов для редактирования генов. TALEN относятся к слитым белкам, включающим ДНК-связывающий белок, подобный активатору транскрипции (TALE), и домен расщепления ДНК. TALEN используются для редактирования генов и геномов путем индукции DSB в ДНК, которые индуцируют механизмы репарирования в клетках. Как правило, два TALEN должны связывать и фланкировать каждую сторону сайта-мишени ДНК, чтобы домен расщепления ДНК димеризовался и индуцировал DSB. DSB восстанавливается в клетке с помощью NHEJ или HDR, если присутствует экзогенный двухцепочечный донорский фрагмент ДНК.

Как указано, TALEN были разработаны для связывания последовательности-мишени, например, эндогенного генома, и разрезания ДНК в месте расположения последовательности-мишени. TALE в TALEN представляют собой ДНК-связывающие белки, секретируемые бактериями *Xanthomonas*. ДНК-связывающий домен TALE включает высококонсервативный 33- или 34-аминокислотный повтор с расходящимися остатками в 12-м и 13-м положениях каждого повтора. Эти две позиции, называемые повторяющиеся вариабельные двойные остатки (RVD), показывают сильную корреляцию с распознаванием специфических нуклеотидов. Соответственно, специфичность нацеливания может быть улучшена путем замены аминокислот в RVD и включения нетрадиционных аминокислот RVD.

Примерами доменов расщепления ДНК, которые можно использовать в слияниях TALEN, являются дикого типа и варианты домены FokI эндонуклеаз. Для получения дополнительной информации о TALEN см. Boch, et al. *Science* 326, 1509-1512 (2009); Moscou, & Bogdanove, *Science* 326, 1501 (2009); Christian, et al. *Genetics* 186, 757-761 (2010); and Miller, et al. *Nature biotechnology* 29, 143-148 (2011).

Конкретные варианты осуществления используют MegaTAL в качестве агентов редактирования генов. MegaTAL имеют одноцепочечную структуру нуклеазы с редким расщеплением, в которой TALE слит с доменом расщепления ДНК мегануклеазы. Мегануклеазы, также известные как самонаводящиеся эндонуклеазы, представляют собой одиночные пептидные цепи, которые имеют как функцию распознавания ДНК, так и функцию нуклеазы в одном и том же домене. В отличие от TALEN, megaTAL требует доставки только одной пептидной цепи для функциональной активности.

В конкретных вариантах осуществления эндогенный геном В-клетки может быть нацелен с использованием систем редактирования генов CRISPR. Нуклеазная система CRISPR представляет собой прокариотическую иммунную систему, которая придает устойчивость к чужеродным генетическим элементам, таким как плазмиды и фаги, и обеспечивает форму приобретенного иммунитета. CRISPR представляют собой локусы ДНК, содержащие короткие повторения последовательностей оснований. В контексте прокариотической иммунной системы за каждым повторением следуют короткие сегменты спейсерной ДНК, принадлежащие чужеродным генетическим элементам, с которыми взаимодействовал прокариот. Этот набор повторов CRISPR с включениями спейсеров может быть транскрибирован в РНК. РНК может быть обработана до зрелой формы и ассоциирована с нуклеазой, такой как Cas (CRISPR-ассоциированная) нуклеаза. Система CRISPR-Cas, включающая РНК, имеющую последовательность, которая может гибридизоваться с чужеродными генетическими элементами, и нуклеазу Cas, может затем распознавать и вырезать эти экзогенные генетические элементы в геноме.

Система CRISPR-Cas не требует генерации индивидуальных белков для нацеливания на специфические последовательности, но вместо этого короткая направляющая молекула РНК (кРНК) может запрограммировать один фермент Cas для распознавания конкретной ДНК-мишени. Системы бактериального и археального адаптивного иммунитета CRISPR-Cas демонстрируют чрезвычайное разнообразие белкового состава и архитектуры геномных локусов. Системные локусы CRISPR-Cas имеют более 50 семейств генов, и нет строго универсальных генов, что указывает на быструю эволюцию и чрезвычайное разнообразие архитектуры локусов. До настоящего времени, принимая многосторонний подход, существует комплексная идентификация гена cas из 395 профилей для 93 белков Cas. Классификация включает сигнатурные генные профили плюс сигнатуры локусной архитектуры. Предложена новая классификация систем CRISPR-Cas, в которой эти системы широко разделены на два класса: класс 1 с эффекторными комплексами с несколькими субъединицами и класс 2 с эффекторными модулями с одной субъединицей, примером которого является белок Cas9.

Для редактирования генома было разработано как минимум три разных типа нуклеазы Cas9. Первым типом является Cas9 дикого типа, которая вводит двухцепочечные разрывы (DSB) в определенном сайте ДНК, что приводит к активации механизма восстановления DSB. DSB могут быть восстановлены путем негомологичного присоединения конца (NHEJ), гомологичного репарирования (HDR) или микромогологичного репарирования (MMEJ). NHEJ может включать репарирование DSB без гомологии (<5 п.о.) между двумя концами, соединенными во время репарирования; HDR может включать репарирова-

ние DSB с большой областью гомологии между концами, соединенными во время репарирования (100 или более нуклеотидов); и MMEJ может включать репарирование DSB с небольшой (от 5 до 50 п.о.) гомологичной областью между концами, соединенными во время репарирования. Другой тип Cas9 включает в себя мутант Cas9, известный как Cas9D10A, с только никазой активностью, что означает, что он расщепляет только одну цепь ДНК и не активирует NHEJ. Таким образом, репарирование ДНК происходит только по пути HDR. Третьим типом является нуклеазо-дефицитный Cas9 (dCas9), который не обладает активностью расщепления, но способен связываться с ДНК. Следовательно, dCas9 способен нацеливаться на специфические последовательности генома без расщепления. Путем слияния dCas9 с различными эффекторными доменами, dCas9 можно использовать либо как инструмент глушения генов, либо как активатор.

В дополнение к системам CRISPR-Cas класса 1 и класса 2, недавно был идентифицирован предполагаемый класс 2, тип v CRISPR-Cas, примером которого является Cpf1, см. Zetsche et al. (2015) Cell 163(3): 759-771. Нуклеаза Cpf1, в частности, может обеспечить дополнительную гибкость при выборе целевого сайта с помощью короткой последовательности распознавания из трех пар оснований (TTN), известной как мотив, замыкающий к протоспейсеру, или PAM. Сайт разреза Cpf1 находится на расстоянии по меньшей мере в 18 п.о. от последовательности PAM, таким образом, фермент может многократно разрезать указанный локус после образования инсерционно-делеционной мутации (вставки и делеции), увеличивая эффективность HDR. Кроме того, ступенчатые DSB с липкими концами позволяют вставлять донорские шаблоны для конкретной ориентации.

Дополнительная информация, касающаяся систем CRISPR-Cas и их компонентов, описана в, US8697359, US8771945, US8795965, US8865406, US8871445, US8889356, US8889418, US8895308, US8906616, US8932814, US8945839, US8993233 и US8999641 и связанными с ними заявками; и WO2014/018423, WO2014/093595, WO2014/093622, WO2014/093635, WO2014/093655, WO2014/093661, WO2014/093694, WO2014/093701, WO2014/093709, WO2014/093712, WO2014/093718, WO2014/145599, WO2014/204723, WO2014/204724, WO2014/204725, WO2014/204726, WO2014/204727, WO2014/204728, WO2014/204729, WO2015/065964, WO2015/089351, WO2015/089354, WO2015/089364, WO2015/089419, WO2015/089427, WO2015/089462, WO2015/089465, WO2015/089473 и WO2015/089486, WO2016205711, WO2017/106657, WO2017/127807 и связанными с ними заявками.

Конкретные варианты осуществления объединяют тракрПНК и крПНК в одну синтетическую одностороннюю направляющую ПНК (онПНК, используя, например, SEQ ID NO: 87-89 или 290-366). В конкретных вариантах осуществления онПНК может включать двадцати нуклеотидную последовательность, которая аналогична крПНК, и последовательность тракрПНК. Для некоторых систем редактирования генов целевая последовательность может быть смежной с PAM (например, 5'-20 нуклеотидов целевая -NGG-3'). В конкретных вариантах осуществления целевая последовательность может включать в себя PAM (SEQ ID NO: 5-84). В конкретных вариантах осуществления направляющая ПНК (нПНК) включает сайт-мишень, смежный с PAM, на который нацелен комплекс редактирования генома. нПНК может включать по меньшей мере 16, 17, 18, 19, 20, 21 или 22 нуклеотида, смежных с PAM.

В конкретных вариантах осуществления режущий элемент направляется в целевое местоположение ДНК с помощью сконструированных нПНК (фиг. 25A (Steinberg et al., Mol Cell. 2015;58(4):568-74)). Генетические конструкции с гомологическими плечами, фланкирующими вырезанную геномную область, эффективно вставляются в это место с помощью механизма направленного гомологического репарирования ДНК (см., например, фиг. 15B (Elliott et al., Mol Cell Biol. 1998; 18(1):93-101). При таком подходе экспрессия эндогенного антитела будет устранена, и гены, кодирующие выбранное антитело, будут вставлены в целевое генетическое местоположение. Эта целевая вставка устраняет или значительно уменьшает вероятность нецелевых эффектов, возникающих в результате случайной генетической вставки.

В конкретных вариантах осуществления онПНК, нацеленная на IgH мыши или человека каждого эндогенного антитела, нацелена на область 100 п.о. ниже J-области (фиг. 9). В экспериментальных примерах эта область была нацелена на экспрессию версии выбранного антитела паливизумаба, содержащего область C из эндогенного генома (фиг. 7 и 9). Алгоритм crispr.mit.edu (Hsu et al., Nat Biotechnol. 2013; 31 (9): 827-32) идентифицировал 22 последовательности нацеливания для этой области, которые, как прогнозируют, имеют небольшое, если таковое имеется, связывание вне цели. Индивидуальные нацеливающие последовательности могут быть вставлены в полноразмерную онПНК и смешаны с нуклеазой, такой как Cas9, непосредственно перед инкубацией, как описано (Schumann et al., Proc Natl Acad Sci USA. 2015; 112 (33): 10437-42) и электропорированы в В-клетки (Kim et al., J. Immunol. 1979; 122(2):549-54). Поскольку клеточное репарирование ДНК, разрезанной Cas9, часто приводит к потере функции гена (Symington & Gautier, Annu Rev Genet. 2011; 45: 247-71), ожидается, что эффективные онПНК, нацеленные на области, кодирующие антитела, приведут к появлению некоторых В-клеток, в которых отсутствует антитело, что можно легко оценить с помощью проточной цитометрии. Активность онПНК, нацеленных на интронные последовательности, можно оценить путем секвенирования или с помощью ферментативных анализов, таких как анализ эндонуклеазы T7.

В конкретных вариантах осуществления направляющие и режущие элементы генома можно вво-

дуть посредством электропорирования, доставки, опосредованной наночастицами, и/или доставки вирусным вектором. Электропорирование может быть полезно, например, для доставки нацеливающих элементов и/или режущих элементов, поскольку мембрана клетки обычно не пропускает такие чужеродные молекулы в клетку. Электропорирование посылает электрический ток в клетки, что временно позволяет таким инородным молекулам проходить через клеточную мембрану.

В конкретных вариантах осуществления генетические конструкции для введения можно вводить посредством электропорирования, доставки, опосредованной наночастицами, и/или доставки вирусным вектором. Аденоассоциированные вирусные векторы включают в себя векторы, происходящие, например, от аденовируса 5 (Ad5), аденовируса 35 (Ad35), аденовируса 11 (Ad11), аденовируса 26 (Ad26), аденовируса 48 (Ad48) или аденовируса 50 (Ad50) и аденоассоциированного вируса (ААВ; см., например, пат. США № 5,604,090; Kay et al., *Nat. Genet.* 24:257 (2000); Nakai et al., *Blood* 91:4600(1998)).

В конкретных вариантах осуществления направляющие и режущие элементы генома можно вводить посредством электропорирования, а генетические конструкции для введения можно вводить посредством ААВ-опосредованной доставки. В конкретных вариантах осуществления направляющие и режущие элементы генома можно вводить посредством доставки, опосредованной наночастицами, а генетические конструкции для введения можно вводить посредством доставки, опосредованной ААВ.

В конкретных вариантах осуществления генетическая конструкция, включающая трансген, может быть смешана с нацеливающим элементом (например, онРНК) и режущим элементом (например, Cas9 или *crf1*) непосредственно или незадолго до электропорирования. Экспрессия выбранного антитела может быть подтверждена позже (например, через 3 суток) путем измерения связывания клеток с флуоресцентно мечеными белками-мишенями с помощью проточной цитометрии. Могут быть использованы методики обогащения и анализа для выявления и анализа эпитоп-специфичных В-клеток. Pape et al., *Science*. 2011;331(6021):1203-7; Taylor et al., *J Exp Med.* 2012; 209(3):597-606; Taylor et al., *J Exp Med.* 2012; 209(11):2065-77; Haasken et al., *J Immunol.* 2013; 191(3):1055-62; Taylor et al., *J Immunol Methods.* 2014;405:74-86; Nanton et al., *Eur J Immunol.* 2015;45(2):428-41; Hamilton et al., *J Immunol.* 2015; 194(10):5022-34; Taylor et al., *Science.* 2015;347(6223):784-7). Эти методологии позволяют обнаруживать выбранные экспрессирующие антитела В-клетки на частотах, столь необычно низких, как 0,00002% от общей популяции В-клеток (Taylor et al., *Science.* 2015;347(6223):784-7).

В конкретных вариантах осуществления клетки могут быть идентифицированы и/или отсортированы на основе маркера экспрессии до или после доставки генетической конструкции. Например, может быть полезно выделить конкретный тип В-клеток (например, В-клетки памяти, В-клетки, секретирующие антитела, наивные В-клетки, В1 В-клетки, В-клетки маргинальной зоны) из образца перед доставкой генетической конструкции. В качестве другого примера, может быть полезно отделить В-клетки от других клеток, присутствующих в образце крови. CD19 является примером белка, экспрессируемого В-клетками, но немногими другими клетками организма. Путем маркировки CD19 флуоресцентной молекулой В-клетки могут быть специфически идентифицированы. B220 является полезным маркером для идентификации В-клеток мыши.

CD27 является примером белка, экспрессируемого В-клетками памяти, но не наивными В-клетками человека. Путем маркировки CD27 флуоресцентной молекулой можно идентифицировать В-клетки памяти.

CD21 представляет собой пример белка, не экспрессируемого (или экспрессируемого в низкой степени) некоторыми В-клетками памяти человека, обладающими способностью быстро секретировать антитело после инфекции. Низкую экспрессию CD21 можно использовать для определения В-клеток, праймированных для дифференцирования плазматических клеток. Путем маркировки CD21 флуоресцентной молекулой эти В-клетки могут быть специфически идентифицированы, например, путем негативного отбора.

Наивные В-клетки человека можно идентифицировать по маркерному профилю IgM⁺ IgD⁺ CD27⁻. Наивные В-клетки мыши можно идентифицировать по маркерному профилю CD38⁺ GL7-IgM⁺ IgD⁺. В1 В-клетки человека можно идентифицировать по маркерному профилю CD5⁺ CD43⁺. В1 В-клетки мыши можно идентифицировать по маркерному профилю CD43⁺ B220^{LOW}. В-клетки маргинальной зоны человека можно идентифицировать по маркерному профилю CD21⁺⁺⁺ IgM⁺⁺ IgD-CD27⁺. В-клетки маргинальной зоны мыши можно идентифицировать по маркерному профилю CD21⁺⁺⁺ IgM⁺⁺ IgD⁻.

В конкретных вариантах осуществления может использоваться маркерный профиль CD19⁺CD27⁺CD21^{lo}.

CD45 представляет собой маркер, используемый для идентификации и/или выделения типов клеток, используемых в описанных в настоящем изобретении экспериментах. Разные линии мышей экспрессируют разные версии белка, называемого CD45, называемые CD45.1 и CD45.2. В экспериментах, раскрытых в данном документе, В-клетки мыши, которая экспрессирует CD45.2, будут взяты и перенесены в мышью, которая экспрессирует CD45.1. С помощью маркировки CD45.1 и CD45.2 различными флуоресцентными молекулами, можно идентифицировать клетки, полученные от животного-донора, потому что они экспрессируют CD45.2, но не CD45.1.

Конкретные варианты осуществления включают сортировку В-клеток после генетической модифи-

кации на основе экспрессии экзогенной легкой цепи. Например, В-клетки, которые естественным образом экспрессируют легкую цепь каппа, могут быть модифицированы для экспрессии выбранного антитела, которое включает легкую цепь. Например, В-клетки, которые естественным образом экспрессируют легкую цепь ламбда, могут быть модифицированы для экспрессии выбранного антитела, которое включает легкую цепь каппа. Сортировка, основанная на экспрессии экзогенной легкой цепи, позволит выделить только те В-клетки, которые экспрессируют выбранное антитело. В конкретных вариантах осуществления только те В-клетки, у которых полностью отсутствует поверхностная экспрессия их эндогенной легкой цепи, выделяют для составления и введения субъекту.

В конкретных вариантах осуществления клетки могут быть идентифицированы и/или выделены с использованием проточной цитометрии. Проточная цитометрия представляет собой чувствительный и мощный метод анализа, в котором используются лазеры для индивидуального анализа флуоресцентных молекул, маркирующих миллионы отдельных клеток. Анализируя комбинацию флуоресцентных молекул, отмеченных каждой клеткой, можно идентифицировать различные подтипы В-клеток. Проточную цитометрию можно использовать для идентификации подгрупп В-клеток и анализа экспрессии выбранных антител (например, паливизумаба) в этих клетках.

В конкретных вариантах осуществления способы модификации В-клеток могут включать получение гематопозитических стволовых клеток (HSC) и/или доставку генетических конструкций в HSC. HSC может относиться к типу стволовых клеток, которые естественным образом вырабатывают В-клетки, а также все другие клетки иммунной системы. HSC можно получить, например, из пуповинной крови.

Конкретные экспериментальные результаты, описанные в настоящем изобретении, использовали клетки A20 для разработки методологии генетической модификации перед переходом к свежеизолированным В-клеткам. A20 представляет собой иммортализованную клеточную линию, полученную из В-клеток мыши.

В конкретных вариантах осуществления В-клетки могут быть получены от человека, и полученные В-клетки или их подгруппа могут быть модифицированы *ex vivo*.

Составы модифицированных В-клеток. После модификации клетки могут быть собраны из культуральной среды, промыты и сконцентрированы в носителе в терапевтически эффективном количестве. Типичные носители включают солевой раствор, забуференный солевой раствор, физиологический солевой раствор, воду, раствор Хенкса, раствор Рингера, Nonnosol-R (Abbott Labs), PLASMA-LYTE A® (Baxter Laboratories, Inc., Мортон Гров, Иллинойс), глицерин, этанол, и их комбинации.

В конкретных вариантах осуществления носители могут быть дополнены сывороточным альбумином человека (HSA) или другими сывороточными компонентами человека или фетальной бычьей сывороткой. В конкретных вариантах осуществления носитель для инфузии включает забуференный физиологический раствор с 5% натриевой солью гиалуроновой кислоты (HAS) или декстрозой. Дополнительные изотонические агенты включают многоатомные сахарные спирты, включая трехатомные или высшие сахарные спирты, такие как глицерин, эритрит, арабит, ксилит, сорбит или маннит.

Носители могут включать буферные агенты, такие как цитратные буферы, сукцинатные буферы, тартратные буферы, фумаратные буферы, глюконатные буферы, оксалатные буферы, лактатные буферы, ацетатные буферы, фосфатные буферы, гистидиновые буферы и/или соли триметиламина.

Стабилизаторы относятся к широкой категории вспомогательных веществ, которые могут варьироваться от наполнителя до добавки, которая помогает предотвратить прилипание клеток к стенкам контейнера. Типичные стабилизаторы могут включать многоатомные сахарные спирты, аминокислоты, такие как аргинин, лизин, глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аланин, орнитин, L-лейцин, 2-фенилаланин, глутаминовая кислота и треонин; органические сахара или сахарные спирты, такие как лактоза, трегалоза, стахиоза, маннит, сорбит, ксилит, рибит, миоинизит, галактит, глицерин и циклитолы, такие как инозит; ПЭГ; аминокислотные полимеры; серосодержащие восстановители, такие как мочевины, глутатион, тиоктовая кислота, тиогликолат натрия, тиоглицерин, альфа-монотиоглицерин и тиосульфат натрия; низкомолекулярные полипептиды (то есть <10 остатков); белки, такие как HSA, бычий сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; моносахариды, такие как ксилоза, манноза, фруктоза и глюкоза; дисахариды, такие как лактоза, мальтоза и сахароза; трисахариды, такие как рафиноза, и полисахариды, такие как декстран.

Там, где это необходимо или полезно, составы могут включать местный анестетик, такой как лидокаин, для облегчения боли в месте инъекции.

Типичные консерванты включают фенол, бензиловый спирт, метакрезол, метилпарабен, пропилпарабен, октадецилдиметилбензиламмонийхлорид, бензалконийгалогениды, гексаметонийхлорид, алкилпарабены, такие как метил или пропилпарабен, катехол, резорцин, циклогексанол и 3-пентан.

Составы могут включать, например, более чем 10^2 модифицированных В-клеток, более чем 10^3 модифицированных В-клеток, более чем 10^4 модифицированных В-клеток, более чем 10^5 модифицированных В-клеток, более чем 10^6 модифицированных В-клеток, более чем 10^7 модифицированных В-клеток, более чем 10^8 модифицированных В-клеток, более чем 10^9 модифицированных В-клеток, более чем 10^{10} модифицированных В-клеток или более чем 10^{11} модифицированных В-клеток.

Способы использования. Способы, раскрытые в настоящем изобретении, включают лечение субъ-

ектов (например, людей, ветеринарных животных (собак, кошек, рептилий, птиц), домашнего скота (например, лошадей, крупного рогатого скота, коз, свиней, кур) и исследовательских животных (например, обезьян, крыс, мышей, рыб) составами, раскрытыми в настоящем изобретении. Лечение субъектов включает доставку терапевтически эффективных количеств. Терапевтически эффективные количества включают те, которые обеспечивают эффективные количества, профилактическое лечение и/или терапевтическое лечение.

"Эффективное количество" представляет собой количество композиции, необходимое для достижения желаемого физиологического изменения у субъекта. Эффективные количества часто вводятся в исследовательских целях. Раскрытые в настоящем изобретении эффективные количества могут вызывать статистически значимый эффект в модели на животных или в анализе *in vitro*, относящийся к оценке развития, прогрессирования и/или разрешения состояния.

"Профилактическое лечение" включает лечение, назначаемое субъекту, который не проявляет признаков или симптомов состояния или показывает только ранние признаки или симптомы состояния, так что лечение вводит с целью уменьшения риска развития состояния. Таким образом, профилактическое лечение функционирует как профилактическое лечение от состояния. В конкретных вариантах осуществления профилактическое лечение уменьшает, задерживает или предотвращает ухудшение состояния. Конкретные варианты осуществления включают введение композиции, описанной в настоящем изобретении, в качестве профилактической защиты в отсутствие эффективной в настоящее время вакцины. Конкретные варианты осуществления включают введение композиции, описанной в настоящем изобретении, в качестве профилактической защиты в качестве замены для традиционных стратегий вакцинации. Конкретные варианты осуществления включают введение композиции, описанной в настоящем изобретении, в качестве профилактической защиты в качестве дополнения к обычным стратегиям вакцинации.

"Терапевтическое лечение" включает лечение, назначаемое субъекту, который проявляет симптомы или признаки состояния, и вводится субъекту с целью уменьшения или устранения этих признаков или симптомов состояния. Терапевтическое лечение может уменьшать, контролировать или устранять наличие или активность состояния и/или уменьшать, контролировать или устранять побочные эффекты состояния.

В конкретных вариантах осуществления состояние представляет собой инфекцию.

В зависимости от функции эффективного количества, профилактическое лечение или терапевтическое лечение не являются взаимоисключающими, и в конкретных вариантах осуществления вводимые дозы могут выполнять более одного типа лечения.

В конкретных вариантах осуществления терапевтически эффективные количества обеспечивают антипатогенные эффекты. Антипатогенные эффекты могут включать противоифекционные эффекты. Противоифекционные эффекты могут включать уменьшение случаев возникновения инфекций, уменьшение тяжести инфекций, уменьшение продолжительности инфекций, уменьшение количества инфицированных клеток, уменьшение объема инфицированных тканей, увеличение ожидаемой продолжительности жизни, индуцирование чувствительности инфицированных клеток к иммунному клиренсу, уменьшение боли, связанной с инфекцией, и/или уменьшение или устранение симптома, связанного с инфекцией, поддающейся лечению.

В конкретных вариантах осуществления терапевтически эффективные количества обеспечивают противовоспалительные эффекты. Противовоспалительное действие может включать уменьшение боли, связанной с воспалением, жара, покраснения, отека и/или потери функции.

В конкретных вариантах осуществления терапевтически эффективные количества обеспечивают эффекты против болезни Крона или эффектов против язвенного колита. Воздействие против болезни Крона или против язвенного колита может включать уменьшение диареи, уменьшение ректального кровотечения, снижение необъяснимой потери веса, снижение температуры, уменьшение боли и спазмов в животе, уменьшение усталости и ощущения низкой энергии и/или восстановление аппетита.

В конкретных вариантах осуществления терапевтически эффективные количества обеспечивают противоартритные эффекты. Противоартритные эффекты могут включать уменьшение боли, ригидности, припухлости, покраснения в области суставов и/или восстановление диапазона движений. Типы артрита включают ревматоидный артрит (РА), анкилозирующий спондилоартрит и псориатический артрит.

В конкретных вариантах осуществления терапевтически эффективные количества обеспечивают противопсориазные эффекты (против бляшечного псориаза). Противопсориазные эффекты (против бляшечного псориаза) могут включать уменьшение красных пятен, шелушения, зуда, жжения, болезненности, аномалий ногтевого ложа и/или опухших или неподвижных суставов.

В конкретных вариантах осуществления В-клетки могут быть получены от субъекта, подмножество В-клеток может быть модифицировано *ex vivo*, а затем модифицированные В-клетки могут быть составлены и введены субъекту. В конкретных вариантах осуществления первое подмножество В-клеток субъекта может быть модифицировано первой генетической конструкцией для получения выбранного антитела к первому патогену, а второе подмножество В-клеток субъекта может быть модифицировано второй генетической конструкцией для получения выбранного антитела ко второму патогену, обеспечивая тем

самым защитные антитела к двум патогенам. Как указано, В-клетки против любого количества патогенов могут быть получены и введены субъекту. В конкретных вариантах осуществления выбранные антитела могут представлять собой антитело к РСВ, антитело к ВИЧ, антитело к вирусу Денге, антитело к Bordetella pertussis, антитело к гепатиту С, антитело к вирусу гриппа, антитело к вирусу парагриппа, антитело к МПВ, антитело к цитомегаловирусу, антитело к вирусу Эпштейна-Барра; антитело к вирусу простого герпеса, антитело к бактериальному токсину Clostridium difficile и/или антитело к ФНО. В конкретных вариантах осуществления выбранные антитела могут представлять собой одно или более антител против РСВ, антитело к вирусу гриппа, антитела к вирусу парагриппа и/или антитело к МПВ. В конкретных вариантах осуществления выбранные антитела могут представлять собой антитело к РСВ, антитело к вирусу гриппа, антитело к вирусу парагриппа и антитело к МПВ. В конкретных вариантах осуществления выбранное антитело представляет собой паливизумаб.

В конкретных вариантах осуществления В-клетки могут быть получены от донора костного мозга или донора гематопозитических стволовых клеток, который был иммунологически подобран реципиенту. В конкретных вариантах осуществления первое подмножество донорских В-клеток может быть модифицировано первой генетической конструкцией для получения выбранного антитела к первому патогену, а второе подмножество донорских В-клеток может быть модифицировано второй генетической конструкцией для получения выбранного антитела к второму патогену, обеспечивая тем самым защитные антитела к двум патогенам. Как указано, В-клетки против любого количества патогенов могут быть получены и введены субъекту. В конкретных вариантах осуществления выбранные антитела могут представлять собой антитело к РСВ, антитело к ВИЧ, антитело к вирусу Денге, антитело к Bordetella pertussis, антитело к гепатиту С, антитело к вирусу гриппа, антитело к вирусу парагриппа, антитело к МПВ, антитело к цитомегаловирусу, антитело к вирусу Эпштейна-Барра; антитело к вирусу простого герпеса, антитело к бактериальному токсину Clostridium difficile и/или антитело к ФНО. В конкретных вариантах осуществления выбранные антитела могут представлять собой одно или более антител против РСВ, антитело к вирусу гриппа, антитела к вирусу парагриппа и/или антитело к МПВ. В конкретных вариантах осуществления выбранные антитела могут представлять собой антитело к РСВ, антитело к вирусу гриппа, антитело к вирусу парагриппа и антитело к МПВ. В конкретных вариантах осуществления выбранное антитело представляет собой паливизумаб. Генетически модифицированные В-клетки могут вводиться реципиенту для обеспечения защиты от инфекции (например, противоинфекционного эффекта) до тех пор, пока трансплантированные клетки не заселят собственную иммунную систему реципиента.

В конкретных вариантах осуществления реципиент получает костный мозг от донора или трансплантацию гематопозитических стволовых клеток в качестве лечения гематологического злокачественного новообразования. Примеры гематологических злокачественных новообразований включают острый лимфоцитарный лейкоз, В-клеточный пролимфоцитарный лейкоз, лимфому/лейкоз Беркитта, хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ), диффузную В-крупноклеточную лимфому, фолликулярную лимфому (степень I, II, III или IV), лимфому Ходжкина, внутрисосудистую В-крупноклеточную лимфому, лимфому, лимфоплазмочитарную лимфому, мантийноклеточную лимфому, лимфому маргинальной зоны (экстранодальную и узловую), медиастинальную (тимусную) В-крупноклеточную лимфому, множественную миелому, неходжкинскую лимфому, РОEMS-синдром/остеосклеротическую миелому, первичную выпотную лимфому, лимфому маргинальной зоны селезенки, мелкоклеточную лимфоцитарную лимфому, вялотекущую множественную миелому (SMM) и макроглобулинемию Вальденстрема.

В конкретных вариантах осуществления реципиент получает генетически модифицированные гематопозитические стволовые клетки, которые обеспечивают ген, который отсутствует у реципиента. Данные реципиенты могут иметь первичный или вторичный иммунодефицит, который можно лечить с помощью предоставления терапевтического гена через гематопозитические стволовые клетки. Более чем 80 первичных иммунодефицитных заболеваний признаны Всемирной организацией здравоохранения. Эти заболевания характеризуются внутренним нарушением иммунной системы, при котором в некоторых случаях организм не может вырабатывать какое-либо или достаточное количество антитела против инфекции. В других случаях клеточная защита для борьбы с инфекцией не работает должным образом. Как правило, первичные иммунодефицитные состояния являются наследственными нарушениями. X-сцепленный тяжелый комбинированный иммунодефицит (SCID-X1) является еще одним примером первичного иммунодефицита. X-сцепленный SCID приводит как к клеточному, так и к гуморальному иммунному истощению, вызванному мутациями в гене общей гамма-цепи (γ C), которые приводят к отсутствию Т-лимфоцитов и лимфоцитов естественных киллеров (НК).

Вторичные или приобретенные иммунодефициты не являются результатом наследственных генетических аномалий, а скорее встречаются у индивидуумов, у которых иммунная система нарушена факторами вне иммунной системы. Примеры включают травму, вирусы, химиотерапию, токсины и загрязнение. Синдром приобретенного иммунодефицита (СПИД) является примером вторичного иммунодефицита, вызванного вирусом, вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ), при котором истощение Т-лимфоцитов делает организм неспособным бороться с инфекцией.

В конкретных вариантах осуществления В-клетки могут быть получены от субъекта, подмножество В-клеток может быть модифицировано *ex vivo*, а затем модифицированные В-клетки могут быть состав-

лены и введены субъекту. В конкретных вариантах осуществления первая подгруппа В-клеток субъекта может быть модифицирована первой генетической конструкцией, чтобы вырабатывать выбранное антитело к молекуле воспаления, такой как воспалительный цитокин, тем самым обеспечивая антитела, которые защищают от воспаления. В конкретных вариантах осуществления выбранные антитела могут быть антителами к ФНО и/или антителами к IL-1. В конкретных вариантах осуществления выбранное антитело представляет собой инфликсимаб, адалимумаб и/или голимумаб, и/или его утвержденный биоаналог.

Для введения терапевтически эффективные количества (также называемые в данном документе как дозы) могут быть первоначально оценены на основе результатов анализов *in vitro* и/или исследований на животных. Такая информация может использоваться для более точного определения полезных доз у субъектов, представляющих интерес. Фактическая доза, вводимая конкретному субъекту, может быть определена врачом, ветеринаром или исследователем с учетом таких параметров, как физические и физиологические факторы, включая возраст, предыдущие вакцины (если вводились), цель, массу тела, тяжесть состояния, тип состояния, стадию состояния, предыдущие или сопутствующие терапевтические вмешательства, индивидуальную особенность субъекта и путь введения.

Как указано, в конкретных вариантах осуществления модифицированные В-клетки экспрессируют тэг, которая позволяет, например, отслеживать и/или устранять их после введения субъекту.

Типовые дозы могут включать более чем 10^2 модифицированных В-клеток, более чем 10^3 модифицированных В-клеток, более чем 10^4 модифицированных В-клеток, более чем 10^5 модифицированных В-клеток, более чем 10^6 модифицированных В-клеток, более чем 10^7 модифицированных В-клеток, более чем 10^8 модифицированных В-клеток, более чем 10^9 модифицированных В-клеток, более чем 10^{10} модифицированных В-клеток или более чем 10^{11} модифицированных В-клеток.

В конкретных вариантах осуществления эффекты выбранных антител могут быть измерены с использованием титров вируса. Титр вируса относится к количеству вируса, которое может быть обнаружено. Высокие титры вируса означают высокий уровень инфекции. Оптимальный защитный ответ наблюдается с титрами, которые падают до нуля.

Как будет понятно специалисту в данной области техники, в то время как были описаны конкретные варианты осуществления, дополнительные варианты осуществления также могут быть использованы в пределах объема настоящего раскрытия. Следующее описание обеспечивает описание и включение типовых дополнительных вариантов осуществления.

Примерные варианты осуществления.

1. Способ получения методом геной инженерии В-клеток для экспрессии выбранного антитела, включающий целевую вставку генетической конструкции, включающую (i) промотор и (ii) транскрипционный элемент выбранного антитела в интронной области, которая является постоянной во всех В-клетках, и то есть (i) расположена относительно энхансерного элемента, который взаимодействует с промотором для управления экспрессией транскрипта; и (ii) в такой конфигурации, в которой часть генома В-клеток, кодирующего эндогенное антитело, не экспрессируется.

2. Способ получения методом геной инженерии В-клеток для экспрессии выбранного антитела, включающий вставку в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 4, генетической конструкции, включающей или кодирующей (i) промотор тяжелой цепи, (ii) сигнальный пептид, (iii) полноразмерную легкую цепь выбранного антитела; (iv) гибкий линкер или пропускающий элемент; (v) переменную область тяжелой цепи выбранного антитела; и (vi) границу сплайсинга, что позволяет генетически сконструировать В-клетки для экспрессии выбранного антитела.

3. Способ по варианту осуществления 1 или 2, в котором геном В-клеток, кодирующий эндогенную переменную область тяжелой цепи, не вырезается во время генетической модификации.

4. Способ по любому из вариантов осуществления 1-3, в котором выбранное антитело представляет собой антитело к респираторно-синцитиальному вирусу (РСВ), антитело к вирусу иммунодефицита человека (ВИЧ), антитело к вирусу Денге, антитело к Bordetella pertussis, антитело к вирусу гепатита С, антитело к вирусу гриппа, антитело к вирусу парагриппа, антитело к метапневмовирусу (МПВ), антитело к цитомегаловирусу, антитело к вирусу Эпштейна-Барра; антитело к вирусу простого герпеса, антитело к бактериальному токсину Clostridium difficile или антитело к фактору некроза опухоли (ФНО).

5. Способ по любому из вариантов осуществления 1-4, в котором генетическая конструкция включает SEQ ID NO: 102-175, 278, 279 или 280-289.

6. Способ по любому из вариантов осуществления 2-5, в котором гибкий линкер находится между полноразмерной легкой цепью выбранного антитела и переменной областью тяжелой цепи выбранного антитела.

7. Способ по любому из вариантов осуществления 2-6, в котором гибкий линкер выбран из SEQ ID NO: 180-184.

8. Способ по любому из вариантов осуществления 2-7, в котором гибкий линкер представляет собой линкер Gly-Ser, включающий 50-80 аминокислот.

9. Способ по любому из вариантов осуществления 2-8, в котором гибкий линкер представляет собой линкер Gly-Ser, включающий 57 аминокислот.

10. Способ по любому из вариантов осуществления 2-6, 8 или 9, в котором гибкий линкер представ-

ляет собой SEQ ID NO: 122.

11. Способ по любому из вариантов осуществления 2-10, в котором пропускающий элемент находится между полноразмерной легкой цепью выбранного антитела и вариательной областью тяжелой цепи выбранного антитела.

12. Способ по любому из вариантов осуществления 2-11, в котором пропускающий элемент представляет собой саморасщепляющийся пептид.

13. Способ по варианту осуществления 12, в котором саморасщепляющийся пептид выбран из SEQ ID NO: 176-179.

14. Способ по любому из вариантов осуществления 2-13, в котором пропускающий элемент представляет собой внутренний участок посадки рибосомы (IRES).

15. Способ по любому из вариантов осуществления 2-14, в котором промотор тяжелой цепи выбран из SEQ ID NO: 111 и 128.

16. Способ по любому из вариантов осуществления 2-15, в котором промотор тяжелой цепи представляет собой IgVH1-69 или J558H10.

17. Способ по любому из вариантов осуществления 2-16, в котором сигнальный пептид выбран из SEQ ID NO: 118, 134 и 185-194.

18. Способ по любому из вариантов осуществления 2-17, в котором сигнальный пептид происходит от тяжелой цепи IgH человека или легкой цепи IgL человека.

19. Способ по любому из вариантов осуществления 1-18, в котором генетическая конструкция включает гомологичные плечи.

20. Способ по варианту осуществления 19, в котором гомологичные плечи включают SEQ ID NO: 90-101, 110, 125, 127, 140, 142, 143, 153, 170, 171, 173, 174, 278 или 279.

21. Способ по любому из вариантов осуществления 1-20, в котором генетическая конструкция кодирует тэг.

22. Способ по варианту осуществления 21, в котором тэг включает STREPTAG®, STREP® тэг II, His-тэг, Flag-тэг, Xpress-тэг, Avi-тэг, кальмодулиновый тэг, полиглутаматный тэг, HA-тэг, Muc-тэг, Nus-тэг, S-тэг, SBP-тэг, Softag 1, Softag 3 или V5-тэг.

23. Способ по варианту осуществления 21 или 22, в котором тэг включает SEQ ID NO: 122 или 195-204.

24. Способ по любому из вариантов осуществления 1-23, дополнительно включающий доставку направляющей последовательности РНК (нРНК), выбранной из одной или более SEQ ID NO: 87-89 и 290-366, и нуклеазы для В-клеток.

25. Способ по варианту осуществления 24, в котором доставка осуществляется посредством электропорирования, наночастиц или вирус-опосредованной доставки.

26. Способ по любому из вариантов осуществления 1-25, в котором генетическая конструкция представляет собой часть вирусного вектора на основе аденоассоциированного вируса.

27. Способ по любому из вариантов осуществления 24-26, в котором нРНК и нуклеаза доставляются посредством электропорирования, а генетическая конструкция доставляется как часть вирусного вектора на основе аденоассоциированного вируса.

28. Способ по любому из вариантов осуществления 24-27, в котором нуклеаза представляет собой Cas9 или Cpf1.

29. Способ по любому из вариантов осуществления 24-28, в котором целевая последовательность, на которую нацелена одна или более последовательностей нРНК, выбрана из одной или более последовательностей SEQ ID NO: 5-84, и нРНК выбрана из одной или более SEQ ID NO: 87-89 и 290-366.

30. Способ по любому из вариантов осуществления 1-29, в котором выбранное антитело представляет собой антитело к PCB, включая паливизумаб, AB1128 или ab20745.

31. Способ по любому из вариантов осуществления 1-30, в котором выбранные антитела представляют собой: паливизумаб, включающий тяжелую цепь, включающую SEQ ID NO: 138 и легкую цепь, включающую SEQ ID NO: 136; паливизумаб, включающий тяжелую цепь, включающую SEQ ID NO: 138 и легкую цепь, включающую SEQ ID NO: 205; антитело к PCB, включающее тяжелую цепь, включающую SEQ ID NO: 123 и легкую цепь, включающую SEQ ID NO: 120; или антитело к PCB, включающее тяжелую цепь, включающую SEQ ID NO: 123 и легкую цепь, включающую SEQ ID NO: 206.

32. Способ по любому из вариантов осуществления 1-30, в котором выбранное антитело представляет собой антитело к PCB, включающее CDRH1, включающую SEQ ID NO: 207, CDRH2, включающую SEQ ID NO: 208, CDRH3, включающую SEQ ID NO: 209; CDRL1, включающую SEQ ID NO: 210, CDRL2, включающую SEQ ID NO: 211, и CDRL3, включающую SEQ ID NO: 212.

33. Способ по любому из вариантов осуществления 1-29, в котором выбранное антитело представляет собой антитело к ВИЧ, включая 10E8, VRC01, ab18633 или 39/5.4A.

34. Способ по любому из вариантов осуществления 1-29 или 33, в котором выбранное антитело представляет собой антитело к ВИЧ, включающее тяжелую цепь, включающую SEQ ID NO: 150 и легкую цепь, включающую SEQ ID NO: 149.

35. Способ по любому из вариантов осуществления 1-29 или 33, в котором выбранное антитело

представляет собой антитело к ВИЧ, включающее CDRH1, включающую SEQ ID NO: 213, CDRH2, включающую SEQ ID NO: 214, CDRH3, включающую SEQ ID NO: 215, CDRL1, включающую SEQ ID NO: 216, CDRL2, включающую SEQ ID NO: 217, и CDRL3, включающую SEQ ID NO: 218 или CDRH1, включающую SEQ ID NO: 219, CDRH2, включающую SEQ ID NO: 220, CDRH3, включающую SEQ ID NO: 221, CDRL1, включающую QYGS, CDRL2, включающую SGS, и CDRL3, включающую SEQ ID NO: 222.

36. Способ по любому из вариантов осуществления 1-29, в котором выбранное антитело представляет собой антитело к вирусу Денге, включая антитело 55, DB2-3, ab155042 или ab80914.

37. Способ по любому из вариантов осуществления 1-29 или 36, в котором выбранное антитело представляет собой антитело к вирусу Денге, включающее CDRH1, включающую SEQ ID NO: 223, CDRH2, включающую SEQ ID NO: 224, CDRH3, включающую SEQ ID NO: 225; CDRL1, включающую SEQ ID NO: 226, CDRL2, включающую SEQ ID NO: 227, и CDRKL3, включающую SEQ ID NO: 228 или CDRH1, включающую SEQ ID NO: 229, CDRH2, включающую SEQ ID NO: 230, CDRH3, включающую SEQ ID NO: 231, CDRL1, включающую SEQ ID NO: 232, CDRL2, включающую SEQ ID NO: 233, и CDRL3, включающую SEQ ID NO: 234.

38. Способ по любому из вариантов осуществления 1-29, в котором выбранное антитело представляет собой антитело к вирусу коклюша, включающее тяжелую цепь, включающую SEQ ID NO: 235 и легкую цепь, включающую SEQ ID NO: 236.

39. Способ по любому из вариантов осуществления 1-29, в котором выбранное антитело представляет собой антитело к вирусу гепатита С, включая MAB8694 или C7-50.

40. Способ по любому из вариантов осуществления 1-29 или 39, в котором выбранное антитело представляет собой антитело к вирусу гепатита С, включающее CDRH1, включающую SEQ ID NO: 237, CDRH2, включающую SEQ ID NO: 238, CDRH3, включающую SEQ ID NO: 239, CDRL1, включающую SEQ ID NO: 240, CDRL2, включающую SEQ ID NO: 241, и CDRL3, включающую SEQ ID NO: 242.

41. Способ по любому из вариантов осуществления 1-29, в котором выбранное антитело представляет собой антитело к вирусу гриппа, включая C102.

42. Способ по любому из вариантов осуществления 1-29 или 41, в котором выбранное антитело представляет собой антитело к вирусу гриппа, включающее тяжелую цепь, включающую SEQ ID NO: 159 и легкую цепь, включающую SEQ ID NO: 158.

43. Способ по любому из вариантов осуществления 1-29 или 41, в котором выбранное антитело представляет собой антитело к вирусу гриппа, включающее CDRH1, включающую SEQ ID NO: 243, CDRH2, включающую SEQ ID NO: 244, CDRH3, включающую SEQ ID NO: 245, CDRL1, включающую SEQ ID NO: 246, CDRL2, включающую KTS, и CDRL3, включающую SEQ ID NO: 247.

44. Способ по любому из вариантов осуществления 1-29, в котором выбранное антитело представляет собой антитело к МПВ, включая MPE8.

45. Способ по любому из вариантов осуществления 1-29, в котором выбранное антитело представляет собой антитело к ЦМВ, включая MCMV5322A, MCMV3068A, LJP538 или LJP539.

46. Способ по любому из вариантов осуществления 1-29, в котором выбранное антитело представляет собой антитело к ВЭБ, включающее тяжелую цепь, включающую SEQ ID NO: 168 и легкую цепь, включающую SEQ ID NO: 166.

47. Способ по любому из вариантов осуществления 1-29, в котором выбранное антитело представляет собой антитело к ВЭБ, включающее CDRH1, включающую SEQ ID NO: 248, CDRH2, включающую SEQ ID NO: 249, CDRH3, включающую SEQ ID NO: 250, CDRL1, включающую SEQ ID NO: 251, CDRL2, включающую SEQ ID NO: 252, и CDRL3, включающую SEQ ID NO: 253.

48. Способ по любому из вариантов осуществления 1-29, в котором выбранное антитело представляет собой антитело к ВПГ, включая HSV8-N и MB66.

49. Способ по любому из вариантов осуществления 1-29, в котором выбранное антитело представляет собой антитело к *Clostridium difficile*, включая актоксумаб или безлтоксумаб.

50. Способ по любому из вариантов осуществления 1-29, в котором выбранное антитело представляет собой антитело к ФНО, включая инфликсимаб, адалимумаб, этанерцепт, цертолизумаб или их эмлемые биоаналоги.

51. Способ по любому из вариантов осуществления 1-29 или 50, в котором выбранное антитело представляет собой антитело к ФНО, включающее тяжелую цепь, включающую SEQ ID NO: 254 и легкую цепь, включающую SEQ ID NO: 255; CDRH1, включающую SEQ ID NO: 256, CDRH2, включающую SEQ ID NO: 257, и CDRH3, включающую SEQ ID NO: 258; CDRL1, включающую SEQ ID NO: 259, CDRL2, включающую SEQ ID NO: 260, и CDRL3, включающую SEQ ID NO: 261; CDRH1, включающую SEQ ID NO: 262, CDRH2, включающую SEQ ID NO: 263, и CDRH3, включающую SEQ ID NO: 264; CDRL1, включающую SEQ ID NO: 265, CDRL2, включающую SEQ ID NO: 266, и CDRL3, включающую SEQ ID NO: 267; CDRH1, включающую SEQ ID NO: 268, CDRH2, включающую SEQ ID NO: 269, и CDRH3, включающую SEQ ID NO: 270; или включающее CDRL1, включающую SEQ ID NO: 271, CDRL2, включающую SEQ ID NO: 272, и CDRL3, включающую SEQ ID NO: 273.

52. Способ по любому из вариантов осуществления 1-51, в котором в генетической модификации

используется последовательность, включающая любую из SEQ ID NO: 87, 88, 89, 90-175, 278-366.

53. Способ по любому из вариантов осуществления 1-52, в котором В-клетка представляет собой В-клетку, вырабатывающую антитело, В-клетку памяти, наивную В-клетку, В1 В-клетку или В-клетку маргинальной зоны.

54. В-клетка, модифицированная по способу по любому из вариантов осуществления 1-53.

55. В-клетка по варианту осуществления 54, причем В-клетка представляет собой В-клетку, секретирующую антитело, В-клетку памяти, наивную В-клетку, В1 В-клетку или В-клетку маргинальной зоны.

56. Способ обеспечения противоинфекционного эффекта у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение терапевтически эффективного количества В-клетки по варианту осуществления 54 или 55 субъекту, таким образом, обеспечивая противоинфекционный эффект.

57. Способ по варианту осуществления 56, в котором предоставленная возможность устраняет необходимость в вакцинации.

58. Способ по варианту осуществления 56 или 57, в котором введение заменяет схему вакцинации.

59. Способ по любому из вариантов осуществления 56-58, в котором субъект представляет собой иммуносупрессированный субъект.

60. Способ по любому из вариантов осуществления 56-59, в котором иммуносупрессия у субъекта является частью схемы лечения, включающей трансплантацию костного мозга, трансплантацию гематопозитических стволовых клеток или введение генетически модифицированных гематопозитических стволовых клеток.

61. Способ обеспечения противовоспалительного эффекта у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение терапевтически эффективного количества В-клетки по варианту осуществления 54 или 55 субъекту, таким образом, обеспечивая противовоспалительный эффект.

62. Генетическая конструкция для модификации В-клетки для экспрессии выбранного антитела, причем генетическая конструкция включает или кодирует (i) промотор тяжелой цепи, (ii) сигнальный пептид, (iii) полноразмерную легкую цепь выбранного антитела; (iv) гибкий линкер или пропускающий элемент; (v) переменную область тяжелой цепи выбранного антитела; и (vi) границу сплайсинга.

63. Генетическая конструкция по варианту осуществления 62, включающая SEQ ID NO: 102-175 или 280-289.

64. Генетическая конструкция по варианту осуществления 62 или 63, в которой гибкий линкер находится между полноразмерной легкой цепью выбранного антитела и переменной областью тяжелой цепи выбранного антитела.

65. Генетическая конструкция по любому из вариантов осуществления 62-64, в которой гибкий линкер выбран из SEQ ID NO: 180-184.

66. Генетическая конструкция по любому из вариантов осуществления 62-65, в которой гибкий линкер представляет собой линкер Gly-Ser, включающий 50-80 аминокислот.

67. Генетическая конструкция по любому из вариантов осуществления 62-66, в которой гибкий линкер представляет собой линкер Gly-Ser, включающий 57 аминокислот.

68. Генетическая конструкция по любому из вариантов осуществления 62-64, 66 или 67, в которой гибкий линкер представляет собой SEQ ID NO: 122.

69. Генетическая конструкция по любому из вариантов осуществления 62-68, в которой пропускающий элемент находится между полноразмерной легкой цепью выбранного антитела и переменной областью тяжелой цепи выбранного антитела.

70. Генетическая конструкция по любому из вариантов осуществления 62-69, в котором пропускающий элемент представляет собой саморасщепляющийся пептид.

71. Генетическая конструкция по варианту осуществления 70, в которой саморасщепляющийся пептид выбран из SEQ ID NO: 176-179.

72. Генетическая конструкция по любому из вариантов осуществления 62-69, в которой пропускающий элемент представляет собой внутренний участок посадки рибосомы (IRES).

73. Генетическая конструкция по любому из вариантов осуществления 62-72, в которой промотор тяжелой цепи выбран из SEQ ID NO: 111 и 128.

74. Генетическая конструкция по любому из вариантов осуществления 62-73, в которой промотор тяжелой цепи представляет собой IgVH1-69 или J558H10.

75. Генетическая конструкция по любому из вариантов осуществления 62-74, в которой сигнальный пептид выбран из SEQ ID NO: 118, 134 и 185-194.

76. Генетическая конструкция по любому из вариантов осуществления 62-75, в которой сигнальный пептид получен из тяжелой цепи IgH человека или легкой цепи IgL человека.

77. Генетическая конструкция по любому из вариантов осуществления 62-76, в которой генетическая конструкция включает гомологичные плечи.

78. Генетическая конструкция по варианту осуществления 77, в которой гомологичные плечи включают SEQ ID NO: 90-101, 110, 125, 127, 140, 142, 143, 153, 170, 171, 173, 174, 278 или 279.

79. Генетическая конструкция по любому из вариантов осуществления 62-78, в которой генетиче-

ская конструкция кодирует тэг.

80. Генетическая конструкция по варианту осуществления 79, в которой тэг включает STREPTAG®, STREP® тэг II, His-тэг, Flag-тэг, Xpress-тэг, Avi-тэг, кальмодулиновый тэг, полиглутаматный тэг, HA-тэг, Muc-тэг, Nus-тэг, S-тэг, SBP-тэг, Softag 1, Softag 3 или V5-тэг.

81. Генетическая конструкция по варианту осуществления 79 или 80, в которой тэг включает SEQ ID NO: 122 или 195-204.

82. Генетическая конструкция по любому из вариантов осуществления 62-81, в которой выбранное антитело представляет собой антитело к PCB, включая паливизумаб, AB1128 или ab20745.

83. Генетическая конструкция по любому из вариантов осуществления 62-82, в которой выбранное антитело представляет собой паливизумаб, включающий тяжелую цепь, включающую SEQ ID NO: 138 и легкую цепь, включающую SEQ ID NO: 136; паливизумаб, включающий тяжелую цепь, включающую SEQ ID NO: 138 и легкую цепь, включающую SEQ ID NO: 205; антитело к PCB, включающее тяжелую цепь, включающую SEQ ID NO: 123 и легкую цепь, включающую SEQ ID NO: 120; или антитело к PCB, включающее тяжелую цепь, включающую SEQ ID NO: 123 и легкую цепь, включающую SEQ ID NO: 206.

84. Генетическая конструкция по любому из вариантов осуществления 62-82, в которой выбранное антитело представляет собой антитело к PCB, включающее CDRH1, включающую SEQ ID NO: 207, CDRH2, включающую SEQ ID NO: 208, CDRH3, включающую SEQ ID NO: 209; CDRL1, включающую SEQ ID NO: 210, CDRL2, включающую SEQ ID NO: 211, и CDRL3, включающую SEQ ID NO: 212.

85. Генетическая конструкция по любому из вариантов осуществления 62-81, в которой выбранное антитело представляет собой антитело к ВИЧ, включая 10E8, VRC01, ab18633 или 39/5.4A.

86. Генетическая конструкция по любому из вариантов осуществления 62-81 или 85, в которой выбранное антитело представляет собой антитело к ВИЧ, включающее тяжелую цепь, включающую SEQ ID NO: 150 и легкую цепь, включающую SEQ ID NO: 149.

87. Генетическая конструкция по любому из вариантов осуществления 62-81 или 85, в которой выбранное антитело представляет собой антитело к ВИЧ, включающее CDRH1, включающую SEQ ID NO: 213, CDRH2, включающую SEQ ID NO: 214, CDRH3, включающую SEQ ID NO: 215, CDRL1, включающую SEQ ID NO: 216, CDRL2, включающую SEQ ID NO: 217, и CDRL3, включающую SEQ ID NO: 218 или CDRH1, включающую SEQ ID NO: 219, CDRH2, включающую SEQ ID NO: 220, CDRH3, включающую SEQ ID NO: 221, CDRL1, включающую QYGS, CDRL2, включающую SGS, и CDRL3, включающую SEQ ID NO: 222.

88. Генетическая конструкция по любому из вариантов осуществления 62-81, в которой выбранное антитело представляет собой антитело к вирусу Денге, включая антитело 55, DB2-3, ab155042 или ab80914.

89. Генетическая конструкция по любому из вариантов осуществления 62-81 или 88, в которой выбранное антитело представляет собой антитело к вирусу Денге, включающее CDRH1, включающую SEQ ID NO: 223, CDRH2, включающую SEQ ID NO: 224, CDRH3, включающую SEQ ID NO: 225; CDRL1, включающую SEQ ID NO: 226, CDRL2, включающую SEQ ID NO: 227, и CDRL3, включающую SEQ ID NO: 228 или CDRH1, включающую SEQ ID NO: 229, CDRH2, включающую SEQ ID NO: 230, CDRH3, включающую SEQ ID NO: 231, CDRL1, включающую SEQ ID NO: 232, CDRL2, включающую SEQ ID NO: 233, и CDRL3, включающую SEQ ID NO: 234.

90. Генетическая конструкция по любому из вариантов осуществления 62-81, в которой выбранное антитело представляет собой антитело к вирусу коклюша, включающее тяжелую цепь, включающую SEQ ID NO: 235 и легкую цепь, включающую SEQ ID NO: 236.

91. Генетическая конструкция по любому из вариантов осуществления 62-81, в которой выбранное антитело представляет собой антитело к вирусу гепатита С, включая MAB8694 или C7-50.

92. Генетическая конструкция по любому из вариантов осуществления 62-81 или 91, в которой выбранное антитело представляет собой антитело к вирусу гепатита С, включающее CDRH1, включающую SEQ ID NO: 237, CDRH2, включающую SEQ ID NO: 238, CDRH3, включающую SEQ ID NO: 239, CDRL1, включающую SEQ ID NO: 240, CDRL2, включающую SEQ ID NO: 241, и CDRL3, включающую SEQ ID NO: 242.

93. Генетическая конструкция по любому из вариантов осуществления 62-81, в которой выбранное антитело представляет собой антитело к вирусу гриппа, включая C102.

94. Генетическая конструкция по любому из вариантов осуществления 62-81 или 93, в которой выбранное антитело представляет собой антитело к вирусу гриппа, включающее тяжелую цепь, включающую SEQ ID NO: 159 и легкую цепь, включающую SEQ ID NO: 158.

95. Генетическая конструкция по любому из вариантов осуществления 62-81 или 93, в которой выбранное антитело представляет собой антитело к вирусу гриппа, включающее CDRH1, включающую SEQ ID NO: 243, CDRH2, включающую SEQ ID NO: 244, CDRH3, включающую SEQ ID NO: 245, CDRL1, включающую SEQ ID NO: 246, CDRL2, включающую KTS, и CDRL3, включающую SEQ ID NO: 247.

96. Генетическая конструкция по любому из вариантов осуществления 62-81, в которой выбранное

антитело представляет собой антитело к МПВ, включая МРЕ8.

97. Генетическая конструкция по любому из вариантов осуществления 62-81, в которой выбранное антитело представляет собой антитело к ЦМВ, включая MCMV5322A, MCMV3068A, LJP538 или LJP539.

98. Генетическая конструкция по любому из вариантов осуществления 62-81, в которой выбранное антитело представляет собой антитело к ВЭБ, включающее тяжелую цепь, включающую SEQ ID NO: 168 и легкую цепь, включающую SEQ ID NO: 166.

99. Генетическая конструкция по любому из вариантов осуществления 62-81, в которой выбранное антитело представляет собой антитело к РСВ, включающее CDRH1, включающую SEQ ID NO: 248, CDRH2, включающую SEQ ID NO: 249, CDRH3, включающую SEQ ID NO: 250, CDRL1, включающую SEQ ID NO: 251, CDRL2, включающую SEQ ID NO: 252, и CDRL3, включающую SEQ ID NO: 253.

100. Генетическая конструкция по любому из вариантов осуществления 62-81, в которой выбранное антитело представляет собой антитело к ВПГ, включая HSV8-N и MB66.

101. Генетическая конструкция по любому из вариантов осуществления 62-81, в которой выбранное антитело представляет собой антитело к *Clostridium difficile*, включая актоксумаб или безлотоксумаб.

102. Генетическая конструкция по любому из вариантов осуществления 62-81, в которой выбранное антитело представляет собой антитело к ФНО, включая инфликсимаб, адалимумаб, этанерцепт, цертолизумаб или их приемлемые биоаналоги.

103. Генетическая конструкция по любому из вариантов осуществления 62-81 или 102, в которой выбранное антитело представляет собой антитело к ФНО, включающее тяжелую цепь, включающую SEQ ID NO: 254 и легкую цепь, включающую SEQ ID NO: 255; CDRH1, включающую SEQ ID NO: 256, CDRH2, включающую SEQ ID NO: 257, и CDRH3, включающую SEQ ID NO: 258; CDRL1, включающую SEQ ID NO: 259, CDRL2, включающую SEQ ID NO: 260, и CDRL3, включающую SEQ ID NO: 261; CDRH1, включающую SEQ ID NO: 262, CDRH2, включающую SEQ ID NO: 263, и CDRH3, включающую SEQ ID NO: 264; CDRL1, включающую SEQ ID NO: 265, CDRL2, включающую SEQ ID NO: 266, и CDRL3, включающую SEQ ID NO: 267; CDRH1, включающую SEQ ID NO: 268, CDRH2, включающую SEQ ID NO: 269, и CDRH3, включающую SEQ ID NO: 270; или включающее CDRL1, включающую SEQ ID NO: 271, CDRL2, включающую SEQ ID NO: 272, и CDRL3, включающую SEQ ID NO: 273.

104. Набор для генетической модификации В-клетки, включающий генетическую конструкцию по любому из вариантов осуществления 62-103 и нРНК нацеливающуюся на SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 4.

105. Набор по варианту осуществления 104, в котором нРНК выбрана из одной или более SEQ ID NO: 87, 88, 89 и 290-366.

106. Набор по варианту осуществления 104 или 105, дополнительно включающий нуклеазу.

107. Набор по варианту осуществления 106, в котором нуклеаза представляет собой Cas9 или Cpf1.

108. Набор по любому из вариантов осуществления 104-107, дополнительно включающий наночастицу или вирусный вектор на основе аденоассоциированного вируса.

109. Набор по любому из вариантов осуществления 104-108, в котором нРНК и нуклеаза связаны с наночастицей.

110. Набор по любому из вариантов осуществления 104-109, в котором генетическая конструкция является частью вирусного вектора на основе аденоассоциированного вируса.

Пример 1. Обеспечение иммунитета от респираторно-синцитиальной вирусной инфекции без вакцины.

Респираторно-синцитиальный вирус (РСВ) является основной причиной тяжелых респираторных заболеваний у детей младшего возраста, особенно у детей с хроническими заболеваниями легких, врожденными пороками сердца или преждевременно родившихся. Гуморальный иммунитет может обеспечивать эффективную защиту от РСВ, что подтверждается терапевтическими эффектами рекомбинантного антитела Synagis® (MedImmune, Inc.)/паливизумаб. Однако как естественная инфекция, так и предыдущие испытания вакцин не смогли вызвать полностью защитный иммунный ответ против РСВ.

Для РСВ и других, трудно поддающихся получению вакцины болезней, обход вакцинации через конструирование первичных В-клеток для выявления экспрессии желаемого терапевтического антитела является чрезвычайно привлекательным. Локусы иммуноглобина (Ig) чрезвычайно велики, разнообразны и подвержены обширной геномной рекомбинации и редактированию. Кроме того, транскрипция генов иммуноглобина для получения как мембранных, так и секретируемых форм зависит от регуляции сплайсинга и полиаденилирования мРНК с помощью регуляторных элементов ДНК. Эта сложность сделала вирусную трансдукцию, традиционный подход для клеточной инженерии лимфоцитов, технически непрактичной для производства терапевтических В-клеток.

Конкретные варианты осуществления включают платформу для быстрого и селективного перепрограммирования первичной антительной специфичности В-клетки с помощью однонаправленной иммунологической инженерии. Эта платформа использует преимущества высокой активности опосредованного микрогомологии соединения концов пути репарирования ДНК в первичных В-клетках для вставки полностью синтетического гибридного двухцепочечного/одноцепочечного ДНК-шаблона после создания

разрывов ДНК рибопротейнами Cas9/онРНК. Ключом к этому подходу является сохранение эндогенных регуляторных элементов, что позволяет осуществлять естественный контроль экспрессии поверхностно-связанных и секретлируемых антител. Более того, стратегия не ограничивается РСВ. Может быть возможным экспрессировать антитела, защищающие практически от любого патогена, всего одним взятием крови и последующей инфузией клеток через несколько суток.

Материалы и способы. Дизайн онРНК онРНК, нацеленные на интронные последовательности в локусе IgH мыши и человека, конструировали с использованием CrispRGold (crisprgold.mdc-berlin.de) и получали в синтетической форме, включающей 2'-О-метильные аналоги и 3' фосфоротиоатные межнуклеотидные связи в первых трех 5' и 3' концевых остатках РНК (Synthego). Последовательности, нацеленные на геном, являются следующими:

Мышь: UUAUACAGUAUCCGAUGCAU (SEQ ID NO: 87)

Человек: GUCUCAGGAGCGGUGUCUGU (SEQ ID NO: 89)

Разработка и сборка шаблонов последовательностей.

Человек: конструкция антитела включала промоторную область тяжелой цепи IgVH1-69 (SEQ ID NO: 111), полноразмерную кодон-оптимизированную легкую цепь паливизумаба (SEQ ID NO: 113 (нуклеотид) и SEQ ID NO: 120 (аминокислота)), 57-аминокислотный глицин-сериновый линкер, содержащий 3 tandemные копии мотива Streptag II (SEQ ID NO: 116 (нуклеотид) и SEQ ID NO: 122 (аминокислота)), кодон-оптимизированную переменную область тяжелой цепи паливизумаба (SEQ ID NO: 117 (нуклеотид) и SEQ ID NO: 123 (аминокислота) и границу сплайсинга с 60 п.о. фланкирующей последовательности, полученной из генного сегмента IGHJ1 человека (SEQ ID NO: 124).

Мышь: mCherry шаблон, включающий промотор тяжелой цепи J5558H10, полноразмерную кодон-оптимизированную mCherry открытую рамку считывания и sv40 сайт полиаденилирования. Конструкции антител включали промотор тяжелой цепи J5558H10 (SEQ ID NO: 128, V.A Love et. Al Molecular Immunology 2000), полноразмерную кодон-оптимизированную легкую цепь антитела (SEQ ID NO: 130 (нуклеотид) и SEQ ID NO: 135 (аминокислота)), 57-аминокислотный глицин-сериновый линкер, содержащий две tandemные копии последовательности Streptag II (SEQ ID NO: 116 (нуклеотид) и SEQ ID NO: 122 (аминокислота)), кодон-оптимизированную переменную область тяжелой цепи антитела (SEQ ID NO: 133 (нуклеотид) и SEQ ID NO: 138 (аминокислота) и границу сплайсинга с 60 п.о. фланкирующей последовательности, полученной из генного сегмента IGHJ3 мыши (SEQ ID NO: 139).

Отжиг сшиваемых олигонуклеотидов (т.е. сплайсинг-олигонуклеотидов). Сшиваемые олигонуклеотиды с 36 п.о. комплементарности к рам-дистальной и рам-проксимальной нецелевой цепи ДНК и 50-100 п.о. комплементарности к вставленному шаблону были получены синтетически и предварительно отождествлены на шаблон ДНК перед использованием (например, SEQ ID No: 96-101). Сплайсинг-олигонуклеотиды могут обеспечивать "гомологичные швы", как показано на фиг. 15.

Доставка шаблонов вирусных векторов на основе аденоассоциированных вирусов (ААВ). Вирусные векторы ААВ содержали промотор MND, полноразмерную кодон-оптимизированную mCherry открытую рамку считывания и сайт полиаденилирования sv40, фланкированный либо 2 сайтами распознавания онРНК мыши, либо 400 п.о. гомологии. Вирионы ААВ получали в клетках 293Т, псевдотипированных вирусным капсидом ААВ6, и очищали центрифугированием в градиенте сахарозы и хранили при -80°C. Для вирусной доставки шаблона ДНК концентрированный вирус ААВ добавляли до конечного объема 10% от общего объема культуры за 12 часов до электропорирования.

Культура В-клеток мыши и электропорирование. Основная В-клеточная среда включала среду RPMI с 10% фетальной телячьей сывороткой (Hyclone), 10 мМ HEPES (Gibco), 1 мМ пируват натрия (Gibco), 55 мкМ β-меркаптоэтанол (Sigma) и 100 ед./мл пенициллина плюс 100 мкг/мл стрептомицина (Gibco) за исключением стадий, свободных от антибиотиков, как отмечено.

В-клетки выделяли из селезенки и лимфатических узлов с помощью негативного отбора с помощью магнитных микронесителей (Miltenyi) и культивировали в течение 24 часов при 2×10^6 /мл в В-клеточной среде с добавлением 100 нг/мл рекомбинантного свободного от меченного НА носителя CD40L мыши (R&D systems), 100 нг/мл антитела к НА (клон 543851, R&D systems) и 4 нг/мл мышиного IL-4 (R&D systems). Затем В-клетки подвергали электропорированию с использованием системы трансфекции Neon и наконечника на 10 мкл следующим образом. Белок Cas9 (Invitrogen) и синтетическую онРНК (Synthego) смешивали в соотношении 3 мкг Cas9/900 нг онРНК и инкубировали при комнатной температуре в течение по меньшей мере 10 минут. В-клетки промывали ФСБ и суспендировали в буфере Neon T с конечной плотностью $2,5 \times 10^7$ клеток/мл с помощью Cas9/онРНК и предварительно собранного шаблона ДНК. Клетки подвергали электропорированию (1675 В, 10 миллисекунд, 3 импульса) и сразу же распределяли в предварительно нагретую среду без антибиотиков.

Для размножения клеток В-клетки совместно культивировали с облученными (80 мкг) питающими клетками 3Т3-CD40L в присутствии 20 нг/мл IL-21 мыши.

Оценка активности онРНК с помощью отслеживания вставок/делеций с помощью разложения (TIDE). Общая геномная ДНК была выделена из ложных и обработанных Cas9 клеток через 3-5 суток после электропорирования. Область 500-600 п.о., фланкирующую участок разреза, амплифицировали с

помощью ПНР с использованием следующих олигонуклеотидов:

Мышь: Прямая: GGCTCCACCAGACCTCTCTA (SEQ ID NO: 274)

Обратная: AACCTCAGTCACCGTCTCTCT (SEQ ID NO: 275)

Человек: Прямая: ACAGTAAGCATGCCTCCTAAG (SEQ ID NO: 276)

Обратная: GCCACTCTAGGGCCTTTGT (SEQ ID NO: 277)

Результаты. Результаты показаны на фиг. 18А-18С, фиг. 22А и 22В, фиг. 23В-23Е и фиг. 24А-24С. На фиг. 18А, 18В и 18С продемонстрирован успешный разрез мышиной В-клеточной линии А20, первичных В-клеток мыши и В-клеточные линии RAMOS человека соответственно в локусах-мишенях IgH после электропорирования клеток с рибонуклеарными белками Cas9/онПНК. На фиг. 22А и 22В изображено встраивание репортера флуоресцентного белка mCherry в локус IgH первичных В-клеток мыши. На фиг. 23В и 23С продемонстрирована поверхностная экспрессия антитела к РСВ после введения частичной кассеты антител в линии В-клеток мыши А20 (фиг. 23В) и линии В-клеток человека RAMOS (фиг. 23С). На фиг. 23D и 23Е продемонстрирована секреция антитела к РСВ после введения частичной кассеты антител в линии В-клеток мыши А20 (фиг. 23D) и линии В-клеток человека RAMOS (фиг. 23Е). На фиг. 24А продемонстрирована поверхностная экспрессия антитела к РСВ после введения частичной кассеты антител в первичные В-клетки мыши, первоначально (левые панели) и после обогашения и разможения *in vitro* (правые панели). На фиг. 24В продемонстрирована секреция антитела к РСВ после вставки частичной кассеты антител в первичные линии В-клеток мыши. На фиг. 24С продемонстрирован *in vitro* пролиферативный потенциал сконструированных В-клеток.

Пример 2.

Целью этого примера было получение генетически модифицированных В-клеток с определенной специфичностью, которые поддерживают нативный контроль секретируемой и поверхностной экспрессии Ig посредством генной инженерии локуса IgH. Локус IgH в В-клетках является трудной областью для нацеливания для геномной инженерии из-за высоко вариабельных последовательностей, присутствующих в В-клетках. Развитие В-клеток приводит к рекомбинации элементов V, D и J на более чем 1 мегаоснование ДНК с образованием вариабельных областей VDJ, фундаментальных для разнообразия антител. Позднее в онтогенезе В-клеток переключение классов между различными константными областями приводит к потере ДНК в сходном диапазоне последовательностей (Reviewed in Watson, et al., (2017). Trends Immunol 38(7): 459-470).

Эта вариабельность последовательности делает непрактичным прямое нацеливание на кодирующие области антитела. Однако небольшая область ДНК между последним сегментом гена J и областью переключения, участвующей в переключении класса, присутствует во всех В-клетках. Эта универсальная мишень содержит критический интронный энхансер E_μ, один из нескольких сильных энхансерных элементов, которые взаимодействуют для обеспечения высокого уровня экспрессии генов IgH, несмотря на их слабые промоторы. Активность этих энхансеров частично регулируется близостью промоторов относительно энхансера E_μ, и вставка трансгена между рекомбинированными сегментами VDJ и энхансером E_μ может полностью блокировать транскрипцию VDJ (Delpy, et al., (2002). J Immunol 169(12): 6875-6882). По этой причине способы, используемые в этом примере, нацелены на область выше энхансера E_μ для вставки новой кассеты антител (фиг. 26А). Посредством нацеливания на эту область встроенные гены emAb могут управляться нативным (но вставленным) промотором IgH, максимизируя нативный контроль экспрессии иммуноглобина.

Чтобы включить вставку за раз и свести к минимуму нецелевые взаимодействия, конструкции emAb были экспрессированы как слияние одной цепи. Это слияние состоит из полноразмерной последовательности легкой цепи, связанной с вариабельной областью тяжелой цепи глицин-сериновым линкером из 57 аминокислот, как было описано для одноцепочечных фрагментов F(ab). (Koerber, et al., (2015). J Mol Biol 427(2): 576-586) (фиг. 26А). Этот линкер содержит 3 tandemных повтора мотива StreptagII, чтобы облегчить обнаружение и обогащение генетически модифицированных клеток (Schmidt & Skerra (2007). Nat Protoc 2(6): 1528-1535). Физическое связывание легкой и тяжелой цепей сводит к минимуму возможность несовпадения между вставленным emAb и эндогенной легкой цепью. Оптимизированная граница сплайсинга позволяет emAb сплайсироваться к нижестоящим константным областям IgH. Это позволяет экспрессировать emAb как любой из классов изотипа тяжелой цепи.

Эта стратегия была опробована на линии В-клеток человека RAMOS. Эта линия В-клеток, происходящая от лимфомы Беркитта, нативно экспрессирует поверхностные и секретируемые формы IgM в паре с легкой цепью лямбда. В этих экспериментах экспрессию сконструированного αРСВ-emAb, полученного из паливизумаба, детектировали с использованием мономерного белка РСВ-F и стрептактина, модифицированного стрептавидина с высокой аффинностью к мотивам Streptag II в линкере. αГенетически модифицированные клетки RAMOS РСВ-emAb экспрессировали сконструированное РСВ-специфическое антитело, которое можно было обнаружить на поверхности клеток (фиг. 26В) и в виде секретируемой формы в супернатанте (фиг. 26С). Чтобы подтвердить, что emAb BCR собирается с вторичными белковыми комплексами, важными для передачи сигналов BCR, клетки RAMOS подвергли стимуляции мультимеризованным антигеном РСВ-F. α-Сконструированные, но не контрольные клетки

PCB-emAb демонстрировали быструю и устойчивую передачу сигналов кальция в ответ на белковый антиген (фиг. 26D). Эти данные послужили подтверждением жизнеспособности инженерного подхода emAb.

Затем первичные В-клетки человека были генетически модифицированы с использованием много-ступенчатого процесса экспансии и дифференцирования (фиг. 27A). Электропорирование предварительно комплексных направляющих РНК и Cas9 приводит к высокоэффективному разрезанию геномной ДНК, что приводит к дефектному восстановлению этой области в 70% аллелей-мишеней, проанализированных у нескольких независимых доноров (фиг. 27B). Сайт-мишень онРНК сильно консервативен у людей, при этом не сообщается о единичных нуклеотидных полиморфизмах, зарегистрированных с частотой выше 1% (фиг. 27C). Добавление ААВ-доставленной кассеты α PCB-emAb эффективно перепрограммировало В-клетки человека для связывания белка PCB-F (фиг. 27D). Примечательно, что emAb В-клетки были успешно получены из каждого тестируемого донора-человека со средней степенью инженерии 24% (фиг. 27E). Культивирование и дифференцирование *in vitro* во время выработки emAb увеличили потенциал секреции антител. Праймированные клетки на 2-е сутки экспрессировали высокие уровни CD19 и низкие уровни маркеров плазматических клеток CD138, CD27 и CD138, в отличие от клеток на 18-е сутки, которые имели более низкие уровни CD19 и повышенные CD38, CD27 и CD138 (фиг. 27F). В соответствии с этими изменениями в маркерах клеточной поверхности дифференцированные В-клетки, сконструированные с помощью emAb, секретируют значительное количество целевого антитела (фиг. 27G). Взятые вместе, эти данные демонстрируют способность быстро и эффективно создавать первичные В-клетки для получения специфических защитных антител.

Для демонстрации гибкого аспекта платформы были протестированы кассеты emAb, полученные из 3 дополнительных широко нейтрализующих антивирусных антител, включая VRC01, нацеленное на ВИЧ, АММ01 нацеленное на ВЭБ и MEDI8852 нацеленное на НА-стволы гриппа. Первичные В-клетки были эффективно перепрограммированы всеми 4 конструкциями, которые включали антитела с легкими цепями как каппа (Palivizumab, VRC01, Medi8852), так и лямбда (АММ01) (фиг. 28). Эти данные демонстрируют гибкий и широко применимый характер платформы emAb.

Блокирование выработки эндогенной тяжелой цепи Ig важно для максимизации выработки emAb и минимизации потенциала для производства неизвестных эндогенных антител из генетически модифицированных клеток. Линия В-клеток RAMOS эндогенно экспрессирует IgH в паре с легкой цепью лямбда. Конструирование этих клеток с помощью α PCB-emAb, связанного с легкой цепью каппа, позволяет использовать поверхностную экспрессию легкой цепи лямбда в качестве эффективной меры экспрессии IgH. Кроме того, клетки RAMOS подверглись транслокации *c-myc*, разрушая один аллель IgH, так что любая вставка emAb при необходимости будет в продуктивном аллеле (фиг. 29A). Входные клетки RAMOS экспрессируют высокие уровни легкой цепи лямбда на поверхности, тогда как клетки, экспрессирующие α PCB-emAb, почти полностью потеряли экспрессию легкой цепи лямбда (фиг. 29B). Эти данные указывают на то, что вставка emAb в продуктивный аллель может эффективно блокировать экспрессию эндогенного IgH. Почти во всех первичных В-клетках один аллель IgH обладает продуктивной перестройкой VDJ, тогда как другой аллель не подвергался рекомбинации VDJ или был непродуктивно рекомбинирован. Однако оба этих аллеля обладают потенциальными сайтами для вставки emAb (фиг. 29C). Чтобы проверить эффекты вставки emAb, очищенные легкие цепи лямбда, экспрессирующие первичные В-клетки, были генетически модифицированы α PCB-emAb. Входные клетки продолжали экспрессировать эндогенное антитело в паре с легкой цепью лямбда на поверхности. Напротив, половина α В-клеток, сконструированных из PCB-emAb, утратила экспрессию легкой цепи лямбда (фиг. 29D). Дифференциальные паттерны экспрессии, наблюдаемые в RAMOS и первичных В-клетках, позволяют предположить, что вставка emAb может блокировать эндогенную экспрессию IgH, если она встроена в продуктивный аллель. Дифференциальная экспрессия поверхностной легкой цепи представляет собой способ очистки клеток, которые экспрессируют исключительно конструкцию emAb. Альтернативно, потенциал для вставки в любой аллель дает возможность клетки экспрессирующие двойное антитело emAb, либо путем отбора исходного пула В-клеток антивирусной памяти для конструирования, либо путем вставки другой кассеты в каждый аллель.

Продемонстрировав способность конструировать В-клетки, была подтверждена защитная способность клеток на мышинных моделях вирусной инфекции. Мышиные emAb В-клетки получали с использованием процесса праймирования, электропорирования+доставки emAb-кассеты и экспансии, аналогичной той, которая используется в первичных В-клетках человека (фиг. 30A). Электропорирование в сочетании с предварительно скомплексованными направляющей РНК и Cas9, и разрезание были высокоэффективными, что привело к неправильному восстановлению этой области в 80% анализируемой ДНК (фиг. 30B). Доставка мышинной α PCB-emAb-кассеты через воспроизводимо модифицированные ААВ мышинные В-клетки, с 8-24% В-клеток мыши связывающихся с PCB-F (фиг. 30C, 30D). Вставку в 1-7% клеток также осуществляли с использованием двухцепочечной ДНК (дцДНК), содержащей короткие области гомологии, вместо ААВ (фиг. 30C, 30D (см. также пример 1), предлагая потенциал для конструирования emAb В-клеток с использованием чисто синтетических компонентов. Высокие титры секрет-

руемых сконструированных антител также могут быть обнаружены в культуральных супернатантах, полученных с помощью обеих методик (фиг. 30E).

Для проверки потенциала противовирусной защиты $1,5 \times 10^7$ генетически модифицированных В-клеток мыши вводили мышам Balbc/byJ дикого типа с последующим взятием крови и заражением РСВ (фиг. 31A). РСВ-специфические антитела и генетически модифицированные В-клетки присутствовали в крови через 6 суток после переноса генетически модифицированных В-клеток (фиг. 31B, 31C). Важно отметить, что мыши, получающие генетически модифицированные В-клетки, были почти полностью защищены от инфекции РСВ (фиг. 31D). Эта защита приблизилась к защите, обеспечиваемой инъекцией паливизумаба за 2 суток до заражения (фиг. 31D). Перенос смешанных клеток человека emAb, нацеленных на РСВ и вирус гриппа, у мышей NOD-scid IL2Rgammanull (NSG) приводит к получению сывороточных титров антител, нацеленных на оба вируса (фиг. 32A, 32B). Эти результаты показывают, что описанные в данном документе генетически модифицированные В-клетки защищают от вирусной инфекции.

Способы. Разработка шаблонных последовательностей одноцепочечных антител. Человек: Конструкция антитела включала промоторную область тяжелой цепи IgVH1-69 (SEQ ID NO: 111), легкую цепь полноразмерного антитела (например, SEQ ID NO: 113, 145, 154 и 161 (нуклеотидная) и SEQ ID NO: 119, 148, 157 и 165 (аминокислотная)), 57-аминокислотный глицин-сериновый линкер, содержащий 3 tandemные копии мотива Streptag II (SEQ ID NO: 116 (нуклеотид) и SEQ ID NO: 122 (аминокислотная)), переменную область тяжелой цепи (например, SEQ ID NO: 117, 147, 156 и 164 (нуклеотидная) и SEQ ID NO: 123, 150, 159 и 168 (аминокислотная)) и границу сплайсинга с 60 парами оснований фланкирующей последовательности, полученной из соответствующих переменных областей IgHJ (например, SEQ ID NO: 124 и 151).

Мышь. Конструкции антител включали промотор тяжелой цепи J5558H10 (SEQ ID NO: 128, V.A Love et. Al Molecular Immunology 2000), полноразмерную легкую цепь кодон-оптимизированных антител (например, SEQ ID NO: 130 (нуклеотид) и SEQ ID NO: 135 (аминокислота)), 57-аминокислотный глицин-сериновый линкер, содержащий три tandemные копии последовательности Streptag II (SEQ ID NO: 116 (нуклеотид) и SEQ ID NO: 122 (аминокислота)), кодон-оптимизированную переменную область тяжелой цепи антитела (например, SEQ ID NO: 133 (нуклеотид) и SEQ ID NO: 138 (аминокислота)) и границу сплайсинга с 60 парами оснований фланкирующей последовательности, полученной из генного сегмента IGHIJ3 мыши (SEQ ID NO: 139).

Полноразмерные последовательности типичных конструкций антител представлены на фиг. 25B-25I.

Получение рекомбинантных векторов AAB. Векторы AAB генерировали путем тройной трансфекции вектора AAB, капсида серотипа 6 и аденовирусной плазмиды-помощника (pHelper) в клетки HEK293T с использованием PEL Через 24 часа после трансфекции среду меняли на бессывороточную среду DMEM, и через 72 часа клетки собирали, лизировали путем замораживания-оттаивания, обрабатывали бензоназой, очищали в градиенте иодисанола с последующим концентрированием в ФСБ с использованием колонки Amicon Ultra-15 (EMD Millipore)(Choi, et al., (2007). Curr Protoc Mol Biol Chapter 16: Unit 16 25). Титры вируса в исходном растворе определяли с помощью кПЦП геномов AAB и они варьировались от 5×10^{10} до 1×10^{12} на микролитр (Aurnhammer, et al., (2012). Hum Gene Ther Methods 23(1): 18-28).

Получение дцДНК-шаблонов emAb мыши.

α Шаблоны РСВ-emAb амплифицировали и добавляли короткие области гомологии с помощью модифицированных олигоДНК следующим образом:

Прямой праймер: (содержит 5'-фосфат, область геномной гомологии мыши, выделенную жирным шрифтом)

/5Phos/ACCACCTCTGTGACAGCATTTATACAGTATCCGATGGACAAGTGAG

TGTCTCAGGTTAGGATTCT (SEQ ID NO: 278)

Обратный праймер (содержит фосфоротиоат-стабилизированные связи ДНК (*) область геномной гомологии мыши, выделенную жирным шрифтом)

T*A*A*AGAAAGTGCCCCACTCCACTCTTGTCCSTATGCTTGACCACAAT

GAATACTCCACC (SEQ ID NO: 279)

Шаблон дцДНК амплифицировали с помощью ПЦР, очищали и концентрировали с использованием колонок для очистки minElute PCR (Qiagen).

Клеточные линии. 3T3-msCD40L были получены от доктора Марка Коннора в NIH AIDS Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH: Номер в каталоге #12535. Клетки 3T3 культивировали в среде DMEM с 10% фетальной телячьей сывороткой (Gibco), 100 ед/мл пенициллина плюс 100 мкг/мл стрептомицина (Gibco) и G418 (350 мкг/мл).

Клетки RAMOS были получены от ATCC (CRL-1596™). Клетки RAMOS культивировали в среде RPMI с 10% фетальной телячьей сывороткой (Gibco) и 100 ед/мл пенициллина плюс 100 мкг/мл стрептомицина (Gibco).

Культура В-клеток мыши и электропорирование. Среда В-клеток включала среду RPMI с 10% фе-

тальной телячьей сывороткой (Gemini Biosciences), 10 mM HEPES (Gibco), 1 mM пируват натрия (Gibco), 55 мкМ бета-меркаптоэтанол (Sigma) и 100 ед/мл пенициллина плюс 100 мкг/мл стрептомицина (Gibco) за исключением стадий, свободных от антибиотиков, как отмечено.

В-клетки выделяли из селезенки и лимфатических узлов с помощью негативного отбора с помощью магнитных микроносителей (Miltenyi) и культивировали в течение 24 часов при 2×10^6 /мл в В-клеточной среде с добавлением 100 нг/мл рекомбинантного свободного от меченного НА носителя CD40L мыши (R&D systems), 100 нг/мл антитела к НА (клон 543851, R&D systems) и 4 нг/мл IL-4 мыши (R&D systems). Затем В-клетки электропорировали с использованием системы трансфекции Neon следующим образом. Белок Cas9 (Invitrogen) и синтетическую онРНК (Synthego) смешивали в соотношении 1 мкг Cas9 к 300 нг онРНК и инкубировали при комнатной температуре в течение по меньшей мере 10 минут. В-клетки промывали ФСБ и суспендировали в буфере Neon T с конечной плотностью $2,5 \times 10^7$ клеток/мл с 12 мкг Cas9 RNP/10 клеток. Для условий дцДНК в электропорирование также включали 7,5 мкг шаблона дцДНК/10⁶ клеток. Клетки подвергали электропорированию (1675 В, 10 миллисекунд, 3 импульса) и сразу же распределяли в предварительно нагретую среду без антибиотиков. Для условий ААВ концентрированный ААВ в ФСБ добавляли до 15% от конечного объема культуры. После электропорирования В-клетки размножали в течение дополнительных 48 часов с помощью среды В-клеток, дополненной 100 нг/мл рекомбинантного CD40L мыши без НА-тэга (R&D systems), 100 нг/мл антитела к НА (клон 543851, системы R&D), 4 нг/мл IL-4 мыши (R&D systems) и 20 нг/мл IL-21 мыши. (Biolegend). Для вторичного размножения В-клетки совместно культивировали с облученными (80 мкг) питающими клетками NIH 3T3-CD40L в присутствии 20 нг/мл IL-21 мыши. (Biolegend).

Культура В-клеток человека и электропорирование. Базальная среда для культуры В-клеток человека (hBCM) была в среде IMDM, с 10% FBS (Gemini Biosciences), 100 ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина (Gibco), за исключением стадий, свободных от антибиотиков, как отмечалось.

МКПК человека были получены от Онкологического исследовательского центра им. Фреда Хатчинсона. Клетки оттаивали и отбирали с использованием негативного отбора с использованием набора для выделения В-клеток Miltenyi II (человек) в соответствии с протоколом производителя. Выделенные клетки ресуспендировали при $0,5-1,0 \times 10^6$ клеток/мл в hBCM с добавлением 100 нг/мл MEGACD40L (Enzo Life Sciences), 50 нг/мл рекомбинантного IL-2 (Biolegend), 50 нг/мл IL-10 (Shenandoah Biotech), 10 нг/мл IL-15 (Shenandoah Biotech), 1 мкг/мл CpG ODN 2006 (IDT).

После 48 часов стимуляции клетки подвергали электропорированию с использованием Neon Transfection System. Белок Cas9 (Invitrogen) и онРНК H7 (Synthego) предварительно смешивали в соотношении 2:1 в буфере T в течение 20 минут при комнатной температуре. Клетки промывали ФСБ (Gibco) и ресуспендировали в буфере T при конечной концентрации $2,5 \times 10^7$ клеток/мл в буфере T, содержащем предварительно комплексованный RNP Cas9. Смесь Cell-RNP загружали в наконечник для трансфекции Neon 10 мкл и подвергали электропорированию в соответствии с протоколом производителя с настройками 1750 В, 20 мс и 1 импульс. Сразу после электропорирования клетки высевали в стимулирующую среду, как описано выше, без антибиотиков. Через 30 минут добавляли ААВ до конечной концентрации 10-15% объема культуры и тщательно перемешивали. Через 2-4 часа клетки переносили в большую чашку для культивирования, чтобы обеспечить дальнейшее размножение.

Через двое суток после электропорирования клетки окрашивали меченым флуорохромом антигеном или стрептактином, и отбирали генетически модифицированные клетки. Для вторичной экспансии В-клетки совместно культивировали с облученными (80 мкг) питающими клетками NIH 3T3-CD40L в hBCM, содержащими 5 мкг/мл человеческого рекомбинантного инсулина (Sigma), 50 мкг/мл трансферрина (Sigma), 50 нг/мл рекомбинантных IL-2 (Biolegend), 20 нг/мл IL-21 (Biolegend) и 10 нг/мл IL-15 (Shenandoah Biotech).

Чтобы стимулировать дифференцирование в плазматические клетки, клетки переносили из условий размножения в условия свежего культивирования без питания, содержащие hBCM, дополненный 5 мкг/мл рекомбинантного инсулина человека (Sigma), 50 мкг/мл Transferrin (Sigma), 500 ед/мл универсальным белком IFN типа I (R&D Systems), 50 нг/мл IL-6 (Shenandoah Biotech), 10 нг/мл IL-15 (Shenandoah Biotech).

Оценка активности онРНК TIDE. Общую геномную ДНК выделяли из имитационных и обработанных cas9/онРНК клеток через 3-5 суток после электропорирования. Область 500-600 пар оснований, фланкирующую сайт-мишень онРНК, амплифицировали с помощью ПЦР с использованием следующих олигонуклеотидов:

Мышь:

Прямая: GGCTCCACCAGACCTCTCTA (SEQ. ID NO: 274)

Обратная: AACCTCAGTCACCGTCTCTCT (SEQ ID NO: 275)

Человек:

Прямая: ACAGTAAGCATGCCTCCTAAG (SEQ ID NO: 276)

Обратная: GCCACTTAGGGCCTTTGTT (SEQ ID NO: 277)

Очищенный продукт ПЦР секвенировали по Сэнгеру, и частоту вставок/делений в электропорированных клетках Cas9/онРНК относительно имитационных электропорированных клеток определяли с

использованием алгоритма ICE (Hsiau, et al., (2018). "Inference of CRISPR Edits from Sanger Trace Data." bioRxiv).

Белковые антигены. Белок слияния PCB-F, комплекс ВЭБ gh/gI и модифицированный антиген Вич env (426с ТМ4 d1-3) получали, как описано (McLellan, et al., (2013). *Science* 342(6158): 592-598; McGuire, et al., (2016). *Nat Commun* 7: 10618; Snijder, et al., (2018). *Immunity* 48(4): 799-811 e799). Стабилизированный HA-ствол гриппа был получен из клона 3925 VRC, полученного из штамма H1 1999 NC, как описано в (Yassine, et al., (2015). *Nat Med* 21(9): 1065-1070). Мономерный белок преслияния PCB-F метили Alexa-488 (Thermo Fisher). Все другие белки были конъюгированы с биотином с использованием молярного соотношения биотин:белок от 0,8 до 2 с последующей тетрамеризацией со стрептавидином-PE или -APC (прозиром).

Проточная цитометрия. Проточный цитометрический анализ проводили на машине FACSymphony (BD bioscience), клетки сортировали на Aria II (BD bioscience), а данные анализировали с использованием программного обеспечения FlowJo (Tree Star).

EmAb терапевтические исследования на мышах. Исследования на животных были одобрены и проведены в соответствии с Комитетом по уходу и использованию животных при Онкологическом центре им. Фреда Хатчинсона.

Для заражения PCB EmAb или контрольные В-клетки вводили в виде однократной внутривенной (в/в) дозы $1,5 \times 10^7$ клеток. Для пассивного переноса паливизумаба, мыши получали однократную дозу 15 мг/кг в/в. Был предложен GFP-экспрессирующий PCB (в данном документе упоминается как PCB для простоты) (Munir, et al., (2008). *J Virol* 82(17): 8780-8796). Мышей BALB/cByJ соответствующего возраста (Jackson Labs) интраназально инокулировали 10^6 БОЕ очищенного сахарозой PCB в 40 мкл ФСБ. Легкие собирали на 5-е сутки после заражения, и титр определяли, как описано ранее с помощью анализа бляшек (Murphy, et al., (1990). *Vaccine* 8(5): 497-502). Вкратце, легкие гомогенизировали в 2 мл среды в диссоциаторе GentleMACS, осветляли центрифугированием при $400 \times g$ в течение 10 минут, затем быстро замораживали и хранили при -80°C . Супернатант разбавляли 1:10 и 1:20 в среде DMEM в двух экземплярах. 100 мкл каждого разведения добавляли к слитым клеткам Vero в 24-луночных планшетах в течение 2 часов при 37°C . Затем добавляли слой 0,8% метилцеллюлозы и планшеты инкубировали в течение 5 суток перед визуализацией на сканере Turphoon с настройками фильтра для GFP. Титр в БОЕ/легкое рассчитывали путем подсчета количества бляшек при самом высоком положительном разведении и поправки на коэффициент разбавления.

Для приживления человеческих клеток В-клетки человека emAb вводили в виде однократной в.б.-дозы со специфичностью 5×10^6 клеток/emAb (всего 1×10^7) мышам NOD-scid IL2Rgamma^{null} (NSG) (произведенным селекционной компанией FHCRC). Через 7 суток после переноса отбирали кровь и определяли титры emAb человека на PCB-F и HA-ствол в сыворотке с помощью ИФА.

Статистический анализ. Статистический анализ проводили с использованием GraphPad Prism 7. Парные сравнения проводились с использованием непарного t-критерия с поправкой Уэлча.

Описанные в данном документе последовательности нуклеиновых кислот показаны с использованием стандартных буквенных сокращений для нуклеотидных оснований, как определено в 37 C.F.R. §1.822. В некоторых случаях показана только одна цепь каждой последовательности нуклеиновой кислоты, но комплементарная цепь понимается как включенная в варианты осуществления, где это было бы целесообразно. Например, последовательности, комплементарные сайтам-мишеням, включая SEQ ID NO: 5-84 представляют последовательности нРНК, для нацеливания на эти сайты.

Может быть использована любая нуклеиновая кислота, которая кодирует выбранную конструкцию на основе антитела, как описано в данном документе. Варианты последовательностей нуклеиновых кислот, раскрытые в данном документе, включают различные полиморфизмы, мутации и изменения последовательности, в которых различия в последовательности существенно не влияют на функцию кодируемого белка. Термин нуклеиновая кислота или "ген" может включать не только кодирующие последовательности, но также регуляторные области, такие как промоторы, энхансеры и области терминации. Термин далее может включать все интроны и другие последовательности ДНК, сплайсированные из транскрипта мРНК, а также варианты, полученные из альтернативных сайтов сплайсинга. Кодирующая нуклеиновая кислота может представлять собой ДНК или РНК, которая направляет экспрессию одной или более выбранных конструкций на основе антител. Эти последовательности нуклеиновой кислоты могут представлять собой последовательность цепи ДНК, которая транскрибируется в РНК, или последовательность РНК, которая транслируется в белок. Последовательности нуклеиновой кислоты включают как полноразмерные последовательности нуклеиновой кислоты, так и последовательности неполной длины, полученные из полноразмерного белка. Последовательности также могут включать вырожденные кодоны нативной последовательности или последовательности, которые могут быть введены для обеспечения предпочтительности кодонов в конкретном типе клеток. Последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие выбранные конструкции на основе антител, могут быть легко получены из соответствующей аминокислотной последовательности выбранной конструкции на основе антител.

"Варианты" белковых последовательностей включают те, которые имеют одну или более аминокислотных замен, делеций или вставок по сравнению с исходной последовательностью.

кислотных добавок, делеций, позиций остановки или замен по сравнению с белковой последовательностью, раскрытой в другом месте данного документа.

Замена аминокислоты может быть консервативной или неконсервативной заменой. Варианты белковой последовательности, раскрытые в данном документе, могут включать варианты, имеющие одну или более консервативных аминокислотных замен. "Консервативная замена" или "консервативная аминокислотная замена" включает замену, обнаруженную в одной из следующих групп консервативных замен: Группа 1: A, G, S, T; Группа 2: D, E; Группа 3: N, Q; Группа 4: R, K, H; Группа 5: I, L, M, V; и группа 6: F, Y, W.

Кроме того, аминокислоты могут быть сгруппированы в консервативные замещающие группы по сходной функции, химической структуре или составу (например, кислотная, основная, алифатическая, ароматическая или серосодержащая). Например, алифатическая группа может включать, в целях замещения, G, A, V, L и I. Другие группы, включая аминокислоты, которые считаются консервативными заменами друг для друга, включают: серосодержащие: M и C; кислотные: D, E, N и Q; небольшие алифатические, неполярные или слегка полярные остатки: A, S, T, P и G; полярные, отрицательно заряженные остатки и их амиды: D, N, E и Q; полярные, положительно заряженные остатки: H, R и K; большие алифатические неполярные остатки: M, L, I, V и C; и большие ароматические остатки: F, Y и W.

Неконсервативные замены включают те, которые значительно влияют на: структуру пептидного остова в области изменения (например, структуру альфа-спирали или бета-структуры); заряд или гидрофобность молекулы в целевом сайте; или основная часть боковой цепи. Неконсервативные замены, которые, как правило, должны вызывать наибольшие изменения в свойствах белка, представляют собой такие, в которых (i) гидрофильный остаток (например, S или T) можно заменить (или на) гидрофобным остатком (например, L, I, F, V или A); (ii) C или P могут быть заменены (или на) любым другим остатком; (iii) остаток, имеющий электроположительную боковую цепь (например, K, R или H), может быть заменен (или на) электроотрицательным остатком (например, Q или D); или (iv) остаток, имеющий объемную боковую цепь (например, F), может быть заменен (или на) остатком, не имеющим объемной боковой цепи (например, G). Дополнительную информацию можно найти в Creighton (1984) *Proteins*, W.H. Freeman and Company.

Варианты последовательностей нуклеиновой кислоты и белка, раскрытые в данном документе, также включают последовательности, идентичные на по меньшей мере 70%, на по меньшей мере 80%, на по меньшей мере 85%, на по меньшей мере 90%, на по меньшей мере 95%, на по меньшей мере 96%, на по меньшей мере 97%, на по меньшей мере 98% или на по меньшей мере 99% эталонной последовательности, раскрытой в настоящем документе.

"Процент (%) идентичности последовательности" по отношению к последовательностям, указанным в настоящем документе, определяется как процент остатков нуклеиновой кислоты или аминокислоты в последовательности-кандидате, которые идентичны остаткам нуклеиновой кислоты или аминокислоты в контрольной последовательности после выравнивания последовательностей и введение пропусков, если необходимо, для достижения максимальной процентной идентичности последовательности. Выравнивание в целях определения процента идентичности нуклеиновой кислоты или аминокислотной последовательности может быть достигнуто различными способами, которые известны специалисту в данной области техники, например, с использованием общедоступного компьютерного программного обеспечения, такого как BLAST, BLAST-2, ALIGN, ALIGN-2 или Программное обеспечение Megalign (DNASTAR). Специалисты в данной области техники могут определить подходящие параметры для измерения выравнивания, включая любые алгоритмы, необходимые для достижения максимального выравнивания по всей длине сравниваемых последовательностей. Например, % значения идентичности последовательности, генерируемых с помощью компьютерной программы WU-BLAST-2 (Altschul et al., *Methods in Enzymology*, 266:460-480 (1996)), использует несколько параметров поиска, большинство из которых установлены на значения по умолчанию. Те, которые не установлены в значения по умолчанию (то есть регулируемые параметры), устанавливаются со следующими значениями: интервал перекрытия=1, доля перекрытия=0,125, пороговая длина слова (T) = 11 и матрица оценки BLOSUM62.

Варианты обычно проявляют ту же качественную биологическую активность и вызывают по существу сходный биологический ответ с последовательностью нуклеиновой кислоты или пептида сравнения, хотя варианты могут быть выбраны для модификации характеристик эталонной нуклеиновой кислоты или пептида по мере необходимости. Скрининг вариантов может быть выполнен с использованием экспериментальных протоколов, описанных в настоящем документе.

Как будет понятно специалисту в данной области техники, каждый раскрытый в настоящем документе вариант осуществления может содержать, состоять по существу или состоять из его конкретного заявленного элемента, стадии, ингредиента или компонента. Таким образом, термины "включать" или "включая" следует толковать так, что они включают: "включают, состоят или состоят по существу из". Термин "содержит" или "содержать" означает, что он включает, но не ограничивается ими, и позволяет включать неуказанные элементы, стадии, ингредиенты или компоненты даже в больших количествах. Переходная фраза "состоящий из" исключает любой элемент, стадию, ингредиент или компонент, который не указан. Переходная фраза "состоящий по существу из" ограничивает объем варианта осуществле-

ния указанными элементами, стадиями, ингредиентами или компонентами и теми, которые не оказывают существенного влияния на вариант осуществления. Материальный эффект может вызвать статистически значимое снижение экспрессии В-клеток выбранного антитела.

Если не указано иное, все числа, выражающие количества ингредиентов, свойств, такие как молекулярная масса, условия реакции и так далее, используемые в описании и формуле изобретения, следует понимать как измененные во всех случаях термином "около". Соответственно, если не указано иное, числовые параметры, изложенные в описании и прилагаемой формуле изобретения, являются приближительными значениями, которые могут варьироваться в зависимости от желаемых свойств, которые должны быть получены с помощью настоящего изобретения. По меньшей мере, и не как попытка ограничить применение доктрины эквивалентов к объему формулы изобретения, каждый числовой параметр должен по меньшей мере истолковываться с учетом числа сообщаемых значащих цифр и путем применения обычных методов округления. Когда требуется дополнительная ясность, термин "около" имеет значение, разумно приписанное ему специалистом в данной области техники, когда используется в сочетании с указанным числовым значением или диапазоном, то есть обозначает несколько большее или несколько меньшее, чем указанное значение или диапазон в пределах $\pm 20\%$ от заявленного значения; $\pm 19\%$ от заявленного значения; $\pm 18\%$ от заявленного значения; $\pm 17\%$ от заявленного значения; $\pm 16\%$ от заявленного значения; $\pm 15\%$ от заявленного значения; $\pm 14\%$ от заявленного значения; $\pm 13\%$ от заявленного значения; $\pm 12\%$ от заявленного значения; $\pm 11\%$ от заявленного значения; $\pm 10\%$ от заявленного значения; $\pm 9\%$ от заявленного значения; $\pm 8\%$ от заявленного значения; $\pm 7\%$ от заявленного значения; $\pm 6\%$ от заявленного значения; $\pm 5\%$ от заявленного значения; $\pm 4\%$ от заявленного значения; $\pm 3\%$ от заявленного значения; $\pm 2\%$ от заявленного значения; или $\pm 1\%$ от заявленного значения.

Несмотря на то что числовые диапазоны и параметры, определяющие широкий объем изобретения, являются приближительными, числовые значения, приведенные в конкретных примерах, сообщаются настолько точно, насколько это возможно. Однако любое числовое значение по своей природе содержит определенные ошибки, неизбежно возникающие в результате стандартного отклонения, обнаруженного в их соответствующих тестовых измерениях.

Термины в единственном числе и подобные ссылки, используемые в контексте описания изобретения (особенно в контексте следующей формулы изобретения), должны толковаться как охватывающие как единственное, так и множественное число, если в данном документе не указано иное или явно противоречит контексту. Перечисление диапазонов значений в данном документе просто предназначено для того, чтобы служить кратким способом индивидуальной ссылки на каждое отдельное значение, попадающее в диапазон. Если в данном документе не указано иное, каждое отдельное значение включается в описание, как если бы оно было отдельно указано в данном документе. Все способы, описанные в данном документе, могут быть выполнены в любом подходящем порядке, если иное не указано в настоящем документе или иное явно не противоречит контексту. Использование любых и всех примеров или примерных формулировок (например, "таких как"), представленных в настоящем документе, предназначено просто для лучшего освещения изобретения и не ограничивает объем притязаний, заявленных иным образом. Ни одна терминология в описании не должна быть истолкована как указывающая на любой не заявленный элемент, существенный для практического применения изобретения.

Группы альтернативных элементов или вариантов осуществления изобретения, раскрытых в данном документе, не должны рассматриваться как ограничения. Каждый член группы может упоминаться и запрашиваться индивидуально или в любой комбинации с другими членами группы или другими элементами, представленными в данном документе. Предполагается, что один или более членов группы могут быть включены или исключены из группы по соображениям удобства и/или патентоспособности. Когда происходит любое такое включение или удаление, считается, что спецификация содержит измененную группу, таким образом выполняя письменное описание всех групп Маркуша, используемых в прилагаемой формуле изобретения.

Некоторые варианты осуществления этого изобретения описаны в данном документе, включая лучший способ, известный изобретателям для осуществления изобретения. Конечно, изменения в этих описанных вариантах осуществления станут очевидными для специалистов в данной области техники после прочтения предшествующего описания. Изобретатель ожидает, что квалифицированные специалисты будут использовать такие варианты в зависимости от обстоятельств, и изобретатели намерены применять изобретение на практике иным образом, чем конкретно описано в данном документе. Соответственно, это изобретение включает все модификации и эквиваленты объекта изобретения, перечисленного в прилагаемой формуле изобретения, как это разрешено применимым законодательством. Более того, любая комбинация вышеописанных элементов во всех возможных их вариантах охватывается изобретением, если иное не указано в данном документе или иное явно не противоречит контексту.

Кроме того, многочисленные ссылки были сделаны на патенты, печатные публикации, статьи в научном журнале и другие письменные тексты по всему описанию (ссылки на материалы в данном документе). Каждый из упомянутых материалов индивидуально включен в настоящий документ посредством ссылки во всей их полноте для включения основной идеи.

В заключение следует понимать, что варианты осуществления изобретения, раскрытые в настоящем документе, являются иллюстрацией принципов настоящего изобретения. Другие модификации, которые могут быть использованы, входят в объем изобретения. Таким образом, в качестве примера, но не ограничения, альтернативные конфигурации настоящего изобретения могут использоваться в соответствии с изложенными в данном документе идеями. Соответственно, настоящее изобретение не ограничивается этим точно, как показано и описано.

Подробности, показанные в данном документе, приведены в качестве примера и в целях иллюстративного обсуждения только предпочтительных вариантов осуществления настоящего изобретения и представлены в целях предоставления того, что считается наиболее полезным и легко понятным описанием принципов и концептуальных аспектов различных вариантов осуществления изобретения. В связи с этим не предпринимаются попытки показать структурные детали изобретения более подробно, чем это необходимо для фундаментального понимания изобретения, описание, взятое с графическими материалами и/или примерами, делающими очевидным для специалистов в данной области техники, как формы изобретения могут быть воплощены на практике.

Определения и пояснения, используемые в настоящем раскрытии, предназначены для управления в любой будущей конструкции, если только они не будут четко и недвусмысленно изменены в следующих примерах или когда применение значения делает любую конструкцию бессмысленной или по существу бессмысленной. В тех случаях, когда конструкция этого термина делает его бессмысленным или по существу бессмысленным, определение следует взять из Webster's Dictionary, 3rd Edition или из словаря, известного специалистам в данной области техники, такого как Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology (Ed. Anthony Smith, Oxford University Press, Oxford, 2004).

Перечень последовательностей

<110> Онкологический центр им. Фреда Хатчинсона

< 120 > СИСТЕМЫ И СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ В-КЛЕТОК ГЕНЕТИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННЫХ
ДЛЯ ЭКСПРЕССИИ ВЫБРАННЫХ АНТИТЕЛ

<130> F053-0072PCT/18-024-WO-PCT

<150> 62/575 275

<151> 20.10.2017

<150> 62/580 303

<151> 01.11.2017

<150> 62/623 371

<151> 29.01.2018

<160> 366

<170> PatentIn версия 3.5

<210> 1

<211> 722

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 1

```
ctacatggac gtctggggca aaggaccac ggtcacgctc tcctcaggta agaatggcca      60
ctctagggcc tttgttttct gctactgcct gtggggtttc ctgagcattg caggttggtc      120
ctcggggcat gttccgaggg gacctgggcg gactggccag gaggggatgg gcaactgggt      180
gccttgagga tctgggagcc tctgtggatt ttccgatgcc tttggaaaat gggactcagg      240
ttgggtgctg ctgatggagt aactgagcct gggggcttgg ggagccacat ttggacgaga      300
tgctgaaca aaccaggggt cttagtgatg gctgaggaat gtgtctcagg agcggtgtct      360
gtaggactgc aagatcgctg cacagcagcg aatcgtgaaa tattttcttt agaattatga      420
ggtgctgctg gtgtcaacct gcatcttaa ttctttattg gctggaaaga gaactgtcgg      480
agtgggtgaa tccagccagg agggacgctg agccccggtc ttgatgagag cagggttggg      540
```

046539

ggcaggggta gccagaaac ggtggctgcc gtctgacag gggcttaggg aggtccagg 600
acctcagtgc cttgaagctg gtttccatga gaaaaggatt gtttatctta ggaggcatgc 660
ttactgttaa aagacaggat atgtttgaag tggcttctga gaaaaatggg taagaaaatt 720
at 722

<210> 2
<211> 1308
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 2
ctcacttttag gataagtttt aggtaaaatg tgcatacatta tcctgaatta tttcagttaa 60
gcatgttagt tgggtgcata agagaaaact caatcagata gtgctgaaga caggactgtg 120
gagacacctt agaaggacag attctgttcc gaatcaccga tgcggcgtca gcaggactgg 180
cctagcggag gctctgggag ggtggctgcc aggcccggcc tgggctttgg gtctccccgg 240
actaccaga gctgggatgc gtggcttctg ctgccgggcc gactggctgc tcaggcccca 300
gcccttgta atggacttgg aggaatgatt ccatgccaaa gctttgcaag gctcgcagtg 360
accaggcgcc cgacatggta agagacaggc agcccgct gctgcatttg cttctcttaa 420
aactttgat ttgacgtctt atttcacta gaaggggaac tggctttaat tgcttgatga 480
agagcaggag actcatttat gtgagtcttt tgagtacca ttgtctgggt cactcccatt 540
taactttccc taaagcccat ttgaaggaga ggtcgcacga gctgctccac aacctctgaa 600
tggggatggc atgggtaatg atgcttgaga acataccaag cccactggc atcgcccttg 660
tctaagtcat tgactgtagg tcatcatcgc acccttgaaa gtagcccatg ccttccaaag 720
cgatttatgg taaatggcag aattttaagt ggcaaattca gataaaatgc atttcttggt 780
tgtttccaat gatgactggt atctagaggg aatttaaagg caggggttta ctgcagactc 840
agaagggagg ggatgctccg ggaaggtgga ggctctgagc atctcaatac cctcctcttg 900
gtgcagaaga tatgctgcca cttctagagc aaggggacct gctcattttt atcacagcac 960
aggctcctaa attcttggtc tcattctcaa gatgttttaa tgactttaa gcagcaaaga 1020
aatattccac ccaggtagtg gaggtggta atgattggta atgctttgga accaaaacc 1080
agggtggcgt ggggcaggac tgcagggaac tggggatca agtagagga gacaaaagat 1140
ggaagccagc ctggctgtgc aggaaccgg caatgagatg gctttagctg agacaagcag 1200
gtctggtggg ctgaccattt ctggccatga caactccatc cagctttcag aatggactc 1260
agatgggcaa aactgaccta agctgaccta gactaaacaa ggctgaac 1308

<210> 3
<211> 582
<212> ДНК
<213> Mus musculus

<400> 3
ggactactgg ggtcaaggaa cctcagtcac cgtctcctca ggtaagaatg gcctctccag 60
gtctttatct ttaacctttg ttatggagtt ttctgagcat tgcagactaa tcttgatg 120

046539

ttgtccctga gggagccggc tgagagaagt tgggaataa actgtctagg gatctcagag 180
 cctttaggac agattatctc cacatctttg aaaaactaag aatctgtgtg atgggtgttg 240
 tggagtccct ggatgatggg atagggactt tggaggctca tttgaagaag atgctaaaac 300
 aatcctatgg ctggagggat agttggggct gtagttaggag attttcagtt tttagaataa 360
 aagtattagt tgtggaatat acttcaggac cacctctgtg acagcattta tacagtatcc 420
 gatgcatagg gacaaagagt ggagtggggc actttcttta gatttgtgag gaatgttccg 480
 cactagattg tttaaaactt cttttgttg aaggagagct gtcttagtga ttgagtcaag 540
 ggagaaaggc atctagcctc ggtctcaaaa gggtagttgc tg 582

<210> 4
 <211> 1528
 <212> ДНК
 <213> Mus musculus

<400> 4
 ttatttcagt tgaacatgct ggttgggtgt tgagaggaca ctcagtcagt cagtgacgtg 60
 aagggcttct aagccagtcc acatgctctg tgtgaactcc ctctggcctt gcttattggt 120
 gaatgggcca aaggtctgag accaggctgc tgctgggtag gcctggactt tgggtctccc 180
 acccagacct gggaatgtat ggttgtggct tctgccaccc atccacctgg ctgctcatgg 240
 accagccagc ctcggtggct ttgaaggaac aattccacac aaagactctg gacctctccg 300
 aaaccaggca ccgcaaatgg taagccagag gcagccacag ctgtggctgc tgctcttaaa 360
 gcttgtaaac tgtttctgct taagagggac tgagtcttca gtcattgctt tagggggaga 420
 aagagacatt tgtgtgtctt ttgagtaccg ttgtctgggt cactcacatt taactttcct 480
 tgaaaaacta gtaaaagaaa aatgttgctt gtaaccaat aatcatagag ctcatggtac 540
 tttgaggaaa tcttagaaaag cgtgtataca attgtctgga attatctcag ttaagtgtat 600
 tagttgaggt actgatgctg tctctacttc agttatacat gtgggtttga attttgaatc 660
 tattctggct ctcttaagc agaaaattta gataaaatgg atacctcagt ggtttttaat 720
 ggtgggttta atatagaagg aatttaaatt ggaagcta at ttagaatcag taaggaggga 780
 cccaggttaa gaaggcaatc ctgggattct ggaagaaaag atgtttttag tttttataga 840
 aaacactact acattcttga tctacaactc aatgtggttt aatgaatttg aagttgccag 900
 taaatgtact tcctggttgt taaagaatgg tatcaaagga cagtgcttag atccgaggtg 960
 agtgtgagag gacaggggct ggggtatgga tacgcagaag gaaggccaca gctgtacaga 1020
 attgagaaaag aatagagacc tgcagttgag gccagcaggt cggctggact aactctccag 1080
 ccacagtaat gaccagaca gagaagcca gactcataaa gcttctgag caaaattaag 1140
 ggaacaaggt tgagagccct agtaagcgag gctctaaaaa gcacagctga gctgagatgg 1200
 gtgggcttct ctgagtgctt ctaaaatgcg ctaaaactgag gtgattactc tgaggtaagc 1260
 aaagctgggc ttgagccaaa atgaagtaga ctgtaatgaa ctggaatgag ctgggcoct 1320
 aagctaaaact aggctggctt aaccgagatg agccaaaactg gaatgaactt cattaatcta 1380
 ggttgaatag agctaaactc tactgcctac actggactgt tctgagctga gatgagctgg 1440

ggtgagctca gctatgctac gctgtggtgg ggtgagctga tctgaaatga gataactctgg 1500
 agtagctgag atggggtgag atggggtg 1528

<210> 5
 <211> 23
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 5
 ggtcctcggg gcatgttccg agg 23

<210> 6
 <211> 23
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 6
 gggcatgttc cgaggggacc tgg 23

<210> 7
 <211> 23
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 7
 gcattgcagg ttggtcctcg ggg 23

<210> 8
 <211> 23
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 8
 tcctcggggc atgttccgag ggg 23

<210> 9
 <211> 23
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 9
 ggcattgttc gaggggacct ggg 23

<210> 10
 <211> 23
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 10
 gtctcaggag cgggtgtctgt agg 23

<210> 11
 <211> 23
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 11
 agcattgcag gttggtcctc ggg 23

<210> 12

<211> 23
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

 <400> 12
 cctgggcgga ctggccagga ggg 23

 <210> 13
 <211> 23
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

 <400> 13
 actggggtgc cttgaggatc tgg 23

 <210> 14
 <211> 23
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

 <400> 14
 cccagtgcc catcccctcc tgg 23

 <210> 15
 <211> 23
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

 <400> 15
 ctaagacccc tggtttgttc agg 23

 <210> 16
 <211> 23
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

 <400> 16
 tgtggatfff ccgatgcctt tgg 23

 <210> 17
 <211> 23
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

 <400> 17
 aggaccaacc tgcaatgctc agg 23

 <210> 18
 <211> 23
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

 <400> 18
 ctcaggttgg gtgcgtctga tgg 23

 <210> 19
 <211> 23
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

 <400> 19
 ccctcctggc cagtccgccc agg 23

<210> 20
 <211> 23
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

 <400> 20
 ggccaggagg ggatgggcac tgg 23

 <210> 21
 <211> 23
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

 <400> 21
 gagatgcctg aacaaccag ggg 23

 <210> 22
 <211> 23
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

 <400> 22
 aggggtctta gtgatggctg agg 23

 <210> 23
 <211> 23
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

 <400> 23
 atgggactg ggtgccttg agg 23

 <210> 24
 <211> 23
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

 <400> 24
 ttccgatgcc tttgaaaat ggg 23

 <210> 25
 <211> 23
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

 <400> 25
 ctgacgccgc atcgtgatt cgg 23

 <210> 26
 <211> 23
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

 <400> 26
 ttagacaagg gcgatgccag tgg 23

 <210> 27
 <211> 23
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

 <400> 27

cgtgcgacct ctccttcaaa tgg	23
<210> 28	
<211> 23	
<212> ДНК	
<213> Homo sapiens	
<400> 28	
agcatatcctt ctgcaccaag agg	23
<210> 29	
<211> 23	
<212> ДНК	
<213> Homo sapiens	
<400> 29	
atattccacc caggtagtgg agg	23
<210> 30	
<211> 23	
<212> ДНК	
<213> Homo sapiens	
<400> 30	
gtgcgacctc tccttcaaat ggg	23
<210> 31	
<211> 23	
<212> ДНК	
<213> Homo sapiens	
<400> 31	
aggtcccctt gctctagaag tgg	23
<210> 32	
<211> 23	
<212> ДНК	
<213> Homo sapiens	
<400> 32	
ctctagataa cagtcacat tgg	23
<210> 33	
<211> 23	
<212> ДНК	
<213> Homo sapiens	
<400> 33	
ttgtctaagt cattgactgt agg	23
<210> 34	
<211> 23	
<212> ДНК	
<213> Homo sapiens	
<400> 34	
ccaaagcgat ttatggtaaa tgg	23
<210> 35	
<211> 23	
<212> ДНК	
<213> Homo sapiens	

<400> 35
 tcttttgagt gaccattgtc tgg 23

<210> 36
 <211> 23
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 36
 ccatttacca taaatcgctt tgg 23

<210> 37
 <211> 23
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 37
 agggcgatgc cagtggggct tgg 23

<210> 38
 <211> 23
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 38
 agctaaagcc atctcattgc cgg 23

<210> 39
 <211> 23
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 39
 ccacaacctc tgaatgggga tgg 23

<210> 40
 <211> 23
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 40
 ttaattgctt gatgaagagc agg 23

<210> 41
 <211> 23
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 41
 tagacaaggg cgatgccagt ggg 23

<210> 42
 <211> 23
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 42
 aagctgacct agactaaaca agg 23

<210> 43
 <211> 23

<212> ДНК
 <213> Homo sapiens

 <400> 43
 gcaggaacc ggcaatgaga tgg 23

 <210> 44
 <211> 23
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

 <400> 44
 tctgttccga atcaccgatg cgg 23

 <210> 45
 <211> 23
 <212> ДНК
 <213> Mus musculus

 <400> 45
 caactaccct tttgagaccg agg 23

 <210> 46
 <211> 23
 <212> ДНК
 <213> Mus musculus

 <400> 46
 ttatacagta tccgatgcat agg 23

 <210> 47
 <211> 23
 <212> ДНК
 <213> Mus musculus

 <400> 47
 tatacagtat ccgatgcata ggg 23

 <210> 48
 <211> 23
 <212> ДНК
 <213> Mus musculus

 <400> 48
 catctagcct cggctc aaa agg 23

 <210> 49
 <211> 23
 <212> ДНК
 <213> Mus musculus

 <400> 49
 cactctttgt ccctatgcat cgg 23

 <210> 50
 <211> 23
 <212> ДНК
 <213> Mus musculus

 <400> 50
 atctagcctc ggtctcaaaa ggg 23

<210> 51
 <211> 23
 <212> ДНК
 <213> Mus musculus

 <400> 51
 aagttttaaa caatctagtg cgg 23

<210> 52
 <211> 23
 <212> ДНК
 <213> Mus musculus

 <400> 52
 aagatgctaa aacaatccta tgg 23

<210> 53
 <211> 23
 <212> ДНК
 <213> Mus musculus

 <400> 53
 tgctaaaaca atcctatggc tgg 23

<210> 54
 <211> 23
 <212> ДНК
 <213> Mus musculus

 <400> 54
 aagtcctat cccatcatcc agg 23

<210> 55
 <211> 23
 <212> ДНК
 <213> Mus musculus

 <400> 55
 gggagaaagg catctagcct cgg 23

<210> 56
 <211> 23
 <212> ДНК
 <213> Mus musculus

 <400> 56
 tgagcattgc agactaatct tgg 23

<210> 57
 <211> 23
 <212> ДНК
 <213> Mus musculus

 <400> 57
 ttagttgtgg aatatacttc agg 23

<210> 58
 <211> 23
 <212> ДНК
 <213> Mus musculus

 <400> 58
 tggtgagtc cctggatgat ggg 23

<210> 59
 <211> 23
 <212> ДНК
 <213> Mus musculus

 <400> 59
 gtggagataa tctgtcctaa agg 23

 <210> 60
 <211> 23
 <212> ДНК
 <213> Mus musculus

 <400> 60
 agtccctatc ccatcatcca ggg 23

 <210> 61
 <211> 23
 <212> ДНК
 <213> Mus musculus

 <400> 61
 atcttggata tttgtccctg agg 23

 <210> 62
 <211> 23
 <212> ДНК
 <213> Mus musculus

 <400> 62
 gggatagttg gggctgtagt tgg 23

 <210> 63
 <211> 23
 <212> ДНК
 <213> Mus musculus

 <400> 63
 caggtaagaa tggcctctcc agg 23

 <210> 64
 <211> 23
 <212> ДНК
 <213> Mus musculus

 <400> 64
 tctctcagcc ggctccctca ggg 23

 <210> 65
 <211> 23
 <212> ДНК
 <213> Mus musculus

 <400> 65
 ccgaaaccag gcaccgcaaa tgg 23

 <210> 66
 <211> 23
 <212> ДНК
 <213> Mus musculus

<400> 66
 caccgcaaat ggtaagccag agg 23

<210> 67
 <211> 23
 <212> ДНК
 <213> Mus musculus

<400> 67
 ggcttaccat ttgcggtgcc tgg 23

<210> 68
 <211> 23
 <212> ДНК
 <213> Mus musculus

<400> 68
 tgcggtgcct ggtttcggag agg 23

<210> 69
 <211> 23
 <212> ДНК
 <213> Mus musculus

<400> 69
 cagctatgct acgctgtggt ggg 23

<210> 70
 <211> 23
 <212> ДНК
 <213> Mus musculus

<400> 70
 aaggacagtg cttagatccg agg 23

<210> 71
 <211> 23
 <212> ДНК
 <213> Mus musculus

<400> 71
 tcagtcagtc agtgacgtga agg 23

<210> 72
 <211> 23
 <212> ДНК
 <213> Mus musculus

<400> 72
 catgctggtt ggtggttgag agg 23

<210> 73
 <211> 23
 <212> ДНК
 <213> Mus musculus

<400> 73
 tcttttgagt accgttgctt ggg 23

<210> 74
 <211> 23
 <212> ДНК

<213> Mus musculus
 <400> 74
 tggcccattc aacaataagc agg 23

<210> 75
 <211> 23
 <212> ДНК
 <213> Mus musculus
 <400> 75
 ctgggccgct aagctaaact agg 23

<210> 76
 <211> 23
 <212> ДНК
 <213> Mus musculus
 <400> 76
 gccagcctag tttagcttag cgg 23

<210> 77
 <211> 23
 <212> ДНК
 <213> Mus musculus
 <400> 77
 tgaagtagac tgtaatgaac tgg 23

<210> 78
 <211> 23
 <212> ДНК
 <213> Mus musculus
 <400> 78
 gacctgggaa tgtatggttg tgg 23

<210> 79
 <211> 23
 <212> ДНК
 <213> Mus musculus
 <400> 79
 ggtatggata cgcagaagga agg 23

<210> 80
 <211> 23
 <212> ДНК
 <213> Mus musculus
 <400> 80
 gttgagagcc ctagtaagcg agg 23

<210> 81
 <211> 23
 <212> ДНК
 <213> Mus musculus
 <400> 81
 gccgctaagc taaactaggc tgg 23

<210> 82

<211> 23
 <212> ДНК
 <213> Mus musculus

 <400> 82
 tcagctatgc tacgctgtgt tgg 23

<210> 83
 <211> 23
 <212> ДНК
 <213> Mus musculus

 <400> 83
 ttttagagcc tcgcttacta ggg 23

<210> 84
 <211> 23
 <212> ДНК
 <213> Mus musculus

 <400> 84
 ctctatgatt attggttaac agg 23

<210> 85
 <211> 834
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

 <400> 85
 gtagtgtgaaa agtggctcttg aaaaatacta aatgaaggc cactctatca gaatatcaaa 60
 gtgtttctcc ttaatcacia agagaaaacg agttaacctt aaaagattgt gaacacagtc 120
 attatgaaaa taatgctctg aggtatcgaa aaagtatttg agattaatta tcacatgaag 180
 ggataacaag ctaatttaaa aaactttttg aatacagtc taaactctcc ctaagactgt 240
 ttaatttctt aaacatctta ctttaaaaat gaatgcagtt tagaagttga tatgctgttt 300
 gcacaaacta gcagttgata agctaagatt ggaaatgaaa ttcagatagt taaaaaagc 360
 cttttcagtt tcggctcagcc tcgcttatt ttgaaaacgc aaattgtcca ggtgttgttt 420
 tgctcagtag agcactttca gatctgggccc tgggcaaac cacctcttca caaccagaag 480
 tgataaattt accaattgtg tttttttgct tcctaaaata gactctcgcg gtgacctgct 540
 tcctgccacc tgctgtgggt gccggagacc cccatgcagc catcttgact ctaattcatc 600
 atctgcttcc agcttcgctc aattaattaa aaaaaataac ttgatttatg atggcaaaa 660
 cgcagtcccg catcggggcc gacagcactg tgctagtatt tcttagctga gcttgctttg 720
 gcctcaattc cagacacata tcactcatgg gtgttaatca aatgataaga atttcaaata 780
 cttggacagt taaaaaatt aatatacttg aaaatctctc acatttttaa gtca 834

<210> 86
 <211> 1002
 <212> ДНК
 <213> Mus musculus

 <400> 86
 agtctagata attgcattca tttaaaaaaa aagtctttct cctaaaatga atactcagaa 60
 agtggctcttg aaaaagattt gtgaagccgt tttgaccaga atgtcaaagt cttaatagta 120

aggcaaaaaca aacaactaaa aaagatcatg aacaaagtca ctgtaaatgc ttcgggtatt 180
ggaaaagaat tgaatggaga ccaataatca gaggaagaa taatagagta attttaagaa 240
gttttctaaa tatattagaa attaaagaca ctaaagtctt tcaatttctt acataaccta 300
atthtgaaaa tgaattctaa atacatttta gaagtcgata aacttaagtt tggggaaact 360
agaactactc aagctaaaat taaaaggttg aactcaataa gttaaaagag gacctctcca 420
gtttcggctg aatcctcaac ttattttaga aatgcaaatt acccaggtgg tgttttgctc 480
agcctggact ttcggtttgg tggggctgga cagagtgttt caaaaccact tcttcaaacc 540
acagctacaa gtttacctag tggttttatt ttcccttccc caaatagcct tgccacatga 600
cctgcttctt gccagctgct gcaggtgttc tggttctgat cggccatctt gactccaact 660
caacattgct caattcattt aaaaatattt gaaacttaat ttattattgt taaaagtcag 720
ttctgaatag gttatgagag agcctcactc ccattcctcg gttaaaacttt aagtaatatc 780
agttctacac aaacaagacc tcaaactgat tgacaagaat tttggacatt taaaaaatg 840
agtacttgaa aaccctctca ctttttaaag tcacagtatt taactatttt tcctaggaac 900
caacttaaga gtaaaagcaa catcttctaa tattccatac acatacttct gtgttccttt 960
gaaagctgga cttttgcagg ctccaccaga cctctctaga ca 1002

<210> 87
<211> 20
<212> РНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> онРНК-mIgH_3 мыши с Фиг. 25А

<400> 87
uuauasagua ussgaugsau 20

<210> 88
<211> 20
<212> РНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> онРНК-hIgH-6 человека с Фиг. 25А

<400> 88
gsauugcagg uugguccisg 20

<210> 89
<211> 20
<212> РНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> онРНК-hIgH-7 человека с Фиг. 25А

<400> 89
gucisaggag sggugucigu 20

<210> 90
<211> 36

<212> ДНК
 <213> Mus musculus

 <400> 90
 catcggatac tgtataaatg ctgtcacaga ggtggt 36

 <210> 91
 <211> 36
 <212> ДНК
 <213> Mus musculus

 <400> 91
 catagggaca aagagtggag tggggcactt tcttta 36

 <210> 92
 <211> 36
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

 <400> 92
 gacaccgctc ctgagacaca ttcctcagcc atcact 36

 <210> 93
 <211> 36
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

 <400> 93
 tgtaggactg caagatcgct gcacagcagc gaatcg 36

 <210> 94
 <211> 37
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

 <400> 94
 gggaccaacc tgcaatgctc aggaaacccc acaggca 37

 <210> 95
 <211> 37
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

 <400> 95
 ttcggggcat gttccgaggg gacctgggcg gactggc 37

 <210> 96
 <211> 127
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> выше по последовательности олигонуклеотид сплайсинга для онРНК-mIgh_3 мышцы

 <400> 96
 cttcgagaca tgtacagacc atttagatgt agtatcaaag cctaatatct caatcttaaa 60
 atagaatcct aacctgagac actcacttgt ccacggata ctgtataaat gctgtcacag 120
 aggtggt 127

 <210> 97
 <211> 86

<212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> ниже по последовательности олигонуклеотид сплайсинга для онРНК-mIgH_3 мыши

 <400> 97
 cttctcccat tctaaatgca tgttgggggg attctggggc ttcaggacca catagggaca 60

 aagagtggag tggggcactt tcttta 86

 <210> 98
 <211> 127
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> выше по последовательности олигонуклеотид сплайсинга для онРНК-hIgH-7 чело-
 века

 <400> 98
 gtgcacagcg ctcttcccgс tgсagaаса асссаассс сaggatgcac tcctcactgt 60

 гаасссacat tttattggcc тaaagattac ggacaccgct сctgagacac attcctcagc 120

 catcact 127

 <210> 99
 <211> 86
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> ниже по последовательности олигонуклеотид сплайсинга для онРНК-hIgH-7 чело-
 века

 <400> 99
 gtctggggat агсggggagc сagggtgtact gggccaggca agggctttgg tgtaggactg 60

 сааgatcgct gcacagcagc gaatcg 86

 <210> 100
 <211> 128
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> выше по последовательности олигонуклеотид сплайсинга для онРНК-hIgH-6 чело-
 века

 <400> 100
 gtgcacagcg ctcttcccgс tgсagaаса асссаассс сaggatgcac tcctcactgt 60

 гаасссacat tttattggcc тaaagattac ggggaccaac ctgсаatgct сaggaaассс 120

 сасaggca 128

 <210> 101
 <211> 87
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> ниже по последовательности олигонуклеотид сплайсинга для онРНК-hIgH-6 чело-
 века

<400> 101
 gtctggggat agcggggagc caggtgtact gggccaggca agggctttgg ttcggggcat 60
 gttccgaggg gacctgggcg gactggc 87

<210> 102
 <211> 2531
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> анти-RSV емAb AAV человека

<400> 102
 tgtgacgccc ggagacagaa ggtctctggg tggctggggt tttgtggggg gaggatggac 60
 attctgccat tgtgattact actactacta ctacatggac gtctggggca aagggaccac 120
 ggtcaccgtc tcctcaggta agaatggcca ctctagggcc tttgttttct gctactgcct 180
 gtggggtttc ctgagcattg caggttggtc ctcggggcat gttccgaggg gacctgggcg 240
 gactggccag gaggggatgg gcaactgggt gccttgagga tctgggagcc tctgtggatt 300
 ttccgatgcc tttggaaaat gggactcagg ttgggtgcgt ctgatggagt aactgagcct 360
 gggggcttgg ggagccacat ttggacgaga tgctgaaca aaccaggggt cttagtgatg 420
 gctgaggaat gtgtctcagg agcggtgtct gatcgtaatc tttaggccaa taaaatgtgg 480
 gttcacagtg aggagtgcac cctgggggtt gggtttgttc tgcagcggga agagcgctgt 540
 gcacagaaag cttagaaatg gggcaagaga tgcttttctc caggcaggat ttagggcttg 600
 gtctctcagc atcccacact tgtacagctg atgtggcadc tgtgttttct ttctcatcct 660
 agatcaggct ttgagctgtg aaataccctg cctcatgcac atgcaaataa cctgaggctc 720
 tctgagataa atatatat attggtgcc tgaggtttaa acgccgccac catggctacc 780
 ggcagcagaa caagcctgct gctcgtttt ggactgctct gtctcccctg gttgcaagaa 840
 ggcagcggcg acatccagat gacacagagc cctagcacac tgtctgccag cgtggggcag 900
 agagtgacca tcacatgcaa gtgccagctg agcgtgggct acatgcaact gtatcagcaa 960
 aagcccggca agcccctaa gctgctgac tacgatacct ccaagctggc ctctggcggtg 1020
 ccctccagat tttctggcag cggcagcgga accgagttca ccctgacat ctcaagcctg 1080
 cagcctgacg acttcgtac gtactactgc ttccaaggca gcggctaccc cttcacattt 1140
 ggcggcggaa caaagctgga aatcaagcgg actgtggccg ctcttagcgt gttcatcttt 1200
 ccacctagcg acgagcagct gaagtctggc actgcctctg tcgtgtgcct gctgaacaac 1260
 ttctaccctc gagaggccaa ggtgcagtgg aaagtggaca atgccctgca gagcggcaac 1320
 agccaagagt ctgtgaccga gcaggactcc aaggattcca cctacagcct gtctagcacc 1380
 ctgactctga gcaaggccga ctacgagaag cacaaggtgt acgcctgcca agtgacacac 1440
 cagggactga gcagccctgt gaccaagagc ttcaatcggg gcgagtgcgg aggaagtagt 1500
 ggcagcggga gtgggtccaa ttggagtcat cctcaatttg agaaaggagg gggagggctc 1560
 aattggtctc atccgcagtt tgagaagggc ggcggcggct ccaattggtc ccatccccag 1620
 tttgaaaag gctctggtgg aggtggtagt gctggtgggc aagtgaccct gagagagtct 1680

ggacctgctc tggccaagcc cacacagacc ctgacactga cctgcacctt cagcggcttt 1740
 agcctgagca caagcggcat gagcgtcggc tggattagac agcctcctgg caaagccctg 1800
 gaatggctgg ccgacatttg gtgggacgac aagaaggact acaaccccag cctgaagtcc 1860
 cggctgacca tcagcaagga caccagcaag aaccagggtg tgctgaaagt gaccaacatg 1920
 gaccctgccg acaccgccac ctactactgt gccagatcca tgatcaccaa ctggtacttc 1980
 gacgtgtggg gagccggcac cacaaccgtc tcttcaggta agtctgctgt ctggggatag 2040
 cggggagcca ggtgtactgg gccaggcaag ggctttggat cgtaggactg caagatcgct 2100
 gcacagcagc gaatcgtgaa atattttctt tagaattatg aggtgcgctg tgtgtcaacc 2160
 tgcatcttaa attctttatt ggctggaaag agaactgtcg gagtgggtga atccagccag 2220
 gagggacgcg tagccccggt cttgatgaga gcagggttg gggcaggggt agcccagaaa 2280
 cgggtggctgc cgtcctgaca ggggcttagg gaggctccag gacctcagtg cettgaagct 2340
 ggtttccatg agaaaaggat tgtttatctt aggaggcatg cttactgtta aaagacagga 2400
 tatgtttgaa gtggcttctg agaaaaatgg ttaagaaaat tatgacttaa aaatgtgaga 2460
 gattttcaag tatattaatt tttttaactg tccaagtatt tgaaattctt atcatttgat 2520
 taacacccat g 2531

<210> 103
 <211> 3134
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> антиRSV емAb AAV МЫШИ

<400> 103
 ccagggggtga ttctagtcag actctggggg ttttgtcggg tatagaggaa aaatccacta 60
 ttgtgattac tatgctatgg actactgggg tcaaggaacc tcagtcaccg tctcctcagg 120
 taagaatggc ctctccaggc ctttattttt aacctttgtt atggagtttt ctgagcattg 180
 cagactaatc ttggatattt gtcctgagg gagccggctg agagaagttg ggaataaac 240
 tgtctagggg tctcagagcc tttaggacag attatctcca catctttgaa aactaagaa 300
 tctgtgtgat ggtgttgggt gagtccctgg atgatgggat agggactttg gaggctcatt 360
 tgaggagat gctaaaacaa tcctatggct ggaggatag ttggggctgt agttggagat 420
 tttcagtttt tagaataaaa gtattagttg tggaatatac ttcaggacca cctctgtgac 480
 agcatttata cagtatccga tggatgacaa gtgagtgtct caggttagga ttctatttta 540
 agattgagat attaggcttt gatactacat ctaaatggtc tgtacatgtc tcgaagaaag 600
 ttcttcagac agagttagga cttggatcca ggagttagga cttggactga ctcaggagga 660
 ctctagtttc ttcttctoca gctggaatgt ccttatgtaa gaaaagcctt gcctcatgag 720
 tatgcaaate atgtgcgact gtgatgatta atataggat atccacacca aacatcatat 780
 gagccctate ttctctacag aactgaate tcaaggtcct tacaatggaa accgacacac 840
 tgctgctgtg ggtgctgctt ctttgggtgc ccggaagcac aggcgacatc cagctgacac 900

agagccctgc catcatgtct gctagccctg gcgagaaagt gacaatgacc tgttccgcca	960
gcagctccgt gggctacatg cactggtatc agcagaagtc tagcacaagc cccaagctgt	1020
ggatctacga cacctccaag ctggcctctg gcggtccagg cagatTTTTct ggaagcggca	1080
gcggaacag ctacagcctg actatcagct ccatccaggc cgaggatgtg gctacctact	1140
actgcttcag aggcagcggc tacccttca catttgcca gggaccaag ctggaaatca	1200
aggccgatgc cgctcctacc gtgtctatct ttccacctag cagcgagcag ctgacatctg	1260
gcggagcctc tgtcgtgtgc ttctgaaca acttctaccc taaggacatc aacgtcaagt	1320
ggaagatcga cggctccgag agacagaacg gcggtctgaa ctcttgacc gaccaggaca	1380
gcaaggatag cacctacagc atgagcagca ctctgacct gacaaaggac gactacgaga	1440
ggcacaactc ctacacatgc gaggccacac acaagaccag cacatcccca atcgtgaagt	1500
ccttcaaccg gaacgagtgc ggaggaagta gtggcagcgg gactgggtcc aattggagtc	1560
atcctcaatt tgagaaagga gggggagggc ccaattggtc tcatccgcag tttgagaagg	1620
gcggcggcgg ctccaattgg tcccatcccc agtttgaaaa aggtctgggt ggaggtggta	1680
gtgctggtgg gcaggtgaa ctgcaagaaa gcgccctgg catcctgcag cttctcaga	1740
cactgagcct gacctgtagc ttcagcggct tcagcctgag cacaagcggc atgtctgtcg	1800
gctggatcag acagccttct ggcgaaggac tggaatggct ggccgacatt tgggtgggacg	1860
acaagaagga ctacaacccc agcctgaagt ccagactgac catcagcaag gacaccagca	1920
gcaaccaggt gttcctgaag atcaccggcg tggacacagc cgataccgcc acctattact	1980
gcgccagatc catgatcacc aactggtact tcgacgtgtg gggcgctggc accacagtga	2040
ccgtctctc agtgtagtcc taacttctcc cattctaaat gcatgttggg gggattctgg	2100
gccttcagga ccaccatgta ccaaaagcca taacgatcgg tgggagtatt catttggtc	2160
aagatccata gggacaaaga gtggagtggg gcactttctt tagatttgtg aggaatgttc	2220
cgcactagat tgtttaaacc ttcatTTgtt ggaaggagag ctgtcttagt gattgagtca	2280
agggagaaag gcatctagcc tcggtctcaa aaggtagtt gctgtctaga gaggtctgg	2340
ggagcctgca aaagtccagc tttcaaagga acacagaagt atgtgtatgg aatattagaa	2400
gatgttgctt ttactcttaa gttggttctt aggaaaaata gttaaatact gtgactttaa	2460
aatgtgagag ggttttcaag tactcatttt tttaaatgtc caaaatTTTT gtcaatcagt	2520
ttgaggtctt gtttgtgtag aactgatatt acttaaagtt taaccgagga atgggagtga	2580
ggctctctca taacctattc agaactgact tttacaata ataaattaag tttaaaatat	2640
ttttaaata gaattgacaa gttgagttgg agtcaagatg gccgatcaga accagaacac	2700
ctgcagcagc tggcaggaag caggtcatgt ggcaaggcta tttggggaag ggaaaataaa	2760
accactaggt aaactttag ctgtggtttg aagaagtgggt tttgaaacac tctgtccagc	2820
cccacaaac cgaaagtcca ggctgagcaa aacaccactt ggtaatttg catttctaaa	2880
ataagttgag gattcagccg aaactggaga ggtcctcttt taacttattg agttcaacct	2940
tttaatttta gcttgagtag ttctagtttc cccaaactta agtttatcga cttctaaat	3000

gtatttagaa ttcattttca aaattagggt atgtaagaaa ttgaaggact ttagtgcctt 3060
 taatttctaa tatatttaga aaacttctta aaattactct attattcttc cctctgatta 3120
 ttggtctcca ttca 3134

<210> 104
 <211> 1736
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> ms-emAb-RSV-дцДНК

<400> 104
 accacctctg tgacagcatt tatacagtat ccgatggatg acaagtgagt gtctcagggt 60
 aggattctat ttaagattg agatattagg ctttgatact acatctaaat ggtctgtaca 120
 tgtctcgaag aaagtcttc agacagagtt aggacttggg tccaggagtt aggacttggg 180
 ctgactcagg aggactctag tttcttcttc tccagctgga atgtccttat gtaagaaaag 240
 ccttgctca tgagtatgca aatcatgtgc gactgtgatg attaatatag ggatatccac 300
 accaaacatc atatgagccc tatcttctct acagacactg aatctcaagg tccttacaat 360
 ggaaaccgac aactgctgc tgtgggtgct gcttctttgg gtgcccggaa gcacaggcga 420
 catccagctg acacagagcc ctgccatcat gtctgctagc cctggcgaga aagtgacaat 480
 gacctgttc gccagcagct ccgtgggcta catgcaactg tatcagcaga agtctagcac 540
 aagccccaag ctgtggatct acgacacctc caagctggcc tctggcgtgc caggcagatt 600
 ttctggaagc ggcagcggca acagctacag cctgactatc agtccatcc aggccgagga 660
 tgtggctacc tactactgct tcagaggcag cggctacccc ttcacatttg gccaggcacc 720
 caagctggaa atcaaggccg atgccgctcc taccgtgtct atctttccac ctagcagcga 780
 gcagctgaca tctggcggag cctctgtcgt gtgcttctg aacaacttct accctaagga 840
 catcaacgtc aagtggaaga tcgacggctc cgagagacag aacggcgtgc tgaactcttg 900
 gaccgaccag gacagcaagg atagcaccta cagcatgagc agcactctga ccctgacaaa 960
 ggacgagtac gagaggcaca actcctacac atgcgaggcc acacacaaga ccagcacatc 1020
 cccaatcgtg aagtccttca accggaacga gtgcggagga agtagtgga gcgggagtg 1080
 gtccaattgg agtcatcctc aatttgagaa aggaggggga gggccaatt ggtctcatcc 1140
 gcagtttgag aaggcggcg gcggctcaa ttggtcccat cccagtttg aaaaaggctc 1200
 tgggtggaggt gtagtgctg gtgggcaggt ggaactgcaa gaaagcggcc ctggcatcct 1260
 gcagccttct cagacactga gcctgacctg tagcttcagc ggcttcagcc tgagcacaag 1320
 cggcatgtct gtcggctgga tcagacagcc ttctggcgaa ggactggaat ggctggccga 1380
 catttggtgg gacgacaaga aggactaaaa cccagcctg aagtcagac tgaccatcag 1440
 caaggacacc agcagcaacc aggtgttctc gaagatcacc ggcgtggaca cagccgatac 1500
 cgccacctat tactgcgcca gatccatgat caccaactgg tacttcgacg tgtggggcgc 1560
 tggcaccaca gtgacctct cctcaggtga gtccctaact ctcccattct aatgcatgt 1620

tggggggatt ctgggccttc aggaccacca tgtacaaaa gccataacga tcggtgggag 1680
 tattcattgt ggtaagatc catagggaca aagagtggag tggggcactt tcttta 1736

 <210> 105
 <211> 2551
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> hu-emAb-VRC01-AAV

 <400> 105
 tgtgacgccc ggagacagaa ggtctctggg tggctggggt tttgtggggg gaggatggac 60
 attctgccat tgtgattact actactacta ctacatggac gtctggggca aagggaccac 120
 ggtcaccgtc tcctcaggta agaatggcca ctctagggcc tttgttttct gctactgcct 180
 gtggggtttc ctgagcattg caggttggtc ctcggggcat gttccgaggg gacctgggcg 240
 gactggccag gaggggatgg gcaactgggt gccttgagga tctgggagcc tctgtggatt 300
 ttccgatgcc tttggaaaat gggactcagg ttgggtgcgt ctgatggagt aactgagcct 360
 gggggccttg ggagccacat ttggacgaga tgctgaaca aaccaggggt cttagtgatg 420
 gctgaggaat gtgtctcagg agcgtgtct gatcgtaatc tttaggcca taaaatgtgg 480
 gttcacagtg aggagtgcac cctgggggtg gggtttgctc tgcagcggga agagcgctgt 540
 gcacagaaag cttagaaatg gggcaagaga tgcttttctc caggcaggat ttagggcttg 600
 gtctctcagc atcccacact tgtacagctg atgtggcacc tgtgttttct ttctcatcct 660
 agatcaggct ttgagctgtg aaataccctg cctcatgcat atgcaaataa cctgaggtct 720
 tctgagataa atatatatat attggtgcc tgagagcacc acgccgccac catggctacc 780
 ggcagcagaa caagcctgct gctcgtttt ggactgctct gtctcccctg gttgcaagaa 840
 ggcagcgcg aaattgtggt gacacagtct ccaggcacc tgtctttgtc tccaggggaa 900
 acagccatca tctcttgtcg gaccagttag tatggttctc tagcctggta tcaacagagg 960
 cccggccagg ccccaggct cgtcatctat tcgggctcta ctcgggccgc tggcatccca 1020
 gacaggttca gcggcagtcg gtgggggcca gactacaatc tcaccatcag caacctggag 1080
 tcggggagatt ttggtgttta ttattgccag cagtatgaat tttttggcca ggggaccaag 1140
 gtccaggctc acattaagcg cactgtggcc gctcctagcg tgtcatctt tccacctagc 1200
 gacgagcagc tgaagtctgg cactgcctct gtcgtgtgcc tgctgaacaa cttctaccct 1260
 cgagaggcca aggtgcagtg gaaagtggac aatgccctgc agagcggcaa cagccaagag 1320
 tctgtgaccg agcaggactc caaggattcc acctacagcc tgtctagcac cctgactctg 1380
 agcaaggccg actacgagaa gcacaagggtg tacgcctgcg aagtgacaca ccagggactg 1440
 agcagccctg tgaccaagag cttcaatcgg gcgagtgcg gaggtcaag tggtccggg 1500
 agtgggagca attggtcaca ccccagttt gaaaaaggcg gtggggggag taactggtct 1560
 catccgcagt tcgaaaaggg tggaggaggg agcaactgga gtcacccaca atttgagaaa 1620
 ggctcagggt gtggtggtag cgctgggggg caggtgcagc tgggtcagtc tgggggtcag 1680

atgaagaagc ctggcgagtc gatgagaatt tcttgtcggg cttctggata tgaatttatt 1740
 gattgtacgc taaattggat tCGTctggcc cccggaaaaa ggCctgagtg gatgggatgg 1800
 ctgaagcctc gaggtggcgc ggtcaactac gcacgtccac ttcagggcag agtgaccatg 1860
 actcgagacg tttattccga cacagccttt ttggagctgc gctcgttgac agtagacgac 1920
 acggccgtct acttttgtag taggggaaaa aactgtgatt acaattggga cttcgaacac 1980
 tggggccggg gcaccccggt catcgtctca tcaggtgagt tggctttcct tctgcctcct 2040
 ttctctgggc ccagcgtcct ctgacctgga gctgggagat aatgtccggg ggctccttat 2100
 cgtaggactg caagatcgct gcacagcagc gaatcgtgaa atattttctt tagaattatg 2160
 aggtgcgctg tgtgtcaacc tgcacttaa attctttatt ggctggaaag agaactgtcg 2220
 gagtgggtga atccagccag gagggacgcg tagcccggt cttgatgaga gcagggttgg 2280
 gggcaggggt agcccagaaa cggtggctgc cgtcctgaca ggggcttagg gaggctccag 2340
 gacctcagtg ccttgaagct ggtttccatg agaaaaggat tgtttatctt aggaggcatg 2400
 cttactgtta aaagacagga tatgtttgaa gtggcttctg agaaaaatgg ttaagaaaat 2460
 tatgacttaa aatgtgaga gattttcaag tatattaatt tttttaactg tccaagtatt 2520
 tgaaattcct atcatttgat taacacccat g 2551

<210> 106

<211> 2544

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> hu-emAb-Medi8852-AAV

<400> 106

tgtgacgccc ggagacagaa ggtctctggg tggctggggt tttgtggggg gaggatggac 60
 attctgccat tgtgattact actactacta ctacatggac gtctggggca aagggaccac 120
 ggtcaccgtc tcctcaggtc agaatggcca ctctagggcc tttgttttct gctactgcct 180
 gtggggtttc ctgagggcat gttccgaggg gacctgggcg gactggccag gaggggatgg 240
 gcaactggggg gccttgagga tctgggagcc tctgtggatt ttccgatgcc tttggaaaat 300
 gggactcagg ttgggtgcgt ctgatggagt aactgagcct gggggcttgg ggagccacat 360
 ttggacgaga tgctgaaca aaccaggggt cttagtgatg gctgaggaat gtgtctcagg 420
 agcgtgtct gatcgtaatc tttaggccaa taaaatgtgg gttcacagtg aggagtgcac 480
 cctgggggtg gggtttgttc tgcagcggga agagcgtgt gcacagaaag cttagaaatg 540
 gggcaagaga tgcttttctc caggcaggat ttaggccttg gtctctcagc atcccacact 600
 tgtacagctg atgtggcacc tgtgttttct ttctcatcct agatcaggct ttgagctgtg 660
 aaataccctg cctcatgcat atgcaaataa cctgaggtct tctgagataa atatagatat 720
 attggtgcc tgaggccgcc accatggcta ccggcagcag aacaagcctg ctgctcgctt 780
 ttggactgct ctgtctccc tggttgcaag aaggcagcgc cgatattcag atgaccagaa 840
 gcccttcag cctgtccgct tcagtggggg atcaggtgac cattacctgc cgaaccagcc 900

046539

agagcctgag ctctacacg cactggtatc agcagaagcc cggcaaagcc cctaagctgc 960
 tgatctacgc cgcttctagt cgggggtccg gagggtccaag ccggttctcc ggatctggga 1020
 gtggaaccga ctttaccctg acaatttcaa gctctgagcc cgaggatttc gctacatact 1080
 actgtcagca gagcagaact ttcgggcagg gactaaggt ggagatcaaa cggactgtgg 1140
 ccgctcctag cgtgttcac tttccaccta gcgacgagca gctgaagtct ggactgcct 1200
 ctgtcgtgtg cctgtgtaac aacttctacc ctgagagggc caaggtgcag tggaaagtgg 1260
 acaatgccct gcagagcggc aacagccaag agtctgtgac cgagcaggac tccaaggatt 1320
 ccacctacag cctgtctagc accctgactc tgagcaagggc cgactacgag aagcacaagg 1380
 tgtacgcctg cgaagtgaca caccagggac tgagcagccc tgtgaccaag agcttcaatc 1440
 ggggcgagtg cggaggaagt agtggcagcg ggagtgggtc caattggagt catcctcaat 1500
 ttgagaaagg agggggaggg tccaattggg tctatccgca gtttgagaag ggcggcggcg 1560
 gctccaattg gtcccatccc cagtttgaag aaggctctgg tggaggtggg agtgcctggg 1620
 ggcaggtcca gctgcagcag agcggccccg gactgggtcaa gccttcacag aactgagcc 1680
 tgacatgcgc cattagcggg gatagcgtga gctcctacaa tgccgtgtgg aactggatca 1740
 ggcagtctcc aagtcgagga ctggagtggc tgggacgaac atactataga tccgggtggg 1800
 acaatgacta tgcgtaata gtgaaaagcc gaattactat caaccccgat acctccaaga 1860
 atcagttctc tctgcagctg aacagtgtga ccctgagga cacagccgtg tactactgcg 1920
 ccagaagcgg ccatatcacc gtctttggcg tcaatgtgga tgctttcgat atgtgggggc 1980
 aggggactat ggtcaccgct tcttcaggtg agttggcttt cttctgcct ctttctctg 2040
 ggcccagcgt cctctgacct ggagctggga gataatgtcc gggggctcct tatcgtagga 2100
 ctgcaagatc gctgcacagc agcgaatcgt gaaatatttt ctttagaatt atgaggtgcg 2160
 ctgtgtgtca acctgcatct taaattcttt attggctgga aagagaactg tcggagtggg 2220
 tgaatccagc caggagggac gcgtagcccc ggtcttgatg agagcagggt tgggggcagg 2280
 ggtagcccag aaacggtggc tgccgtcctg acaggggctt agggaggctc caggacctca 2340
 gtgccttgaa gctggtttcc atgagaaaag gattgtttat cttaggaggc atgcttactg 2400
 ttaaaagaca ggatattgtt gaagtggctt ctgagaaaaa tggttaagaa aattatgact 2460
 taaaaatgtg agagattttc aagtatatta atttttttaa ctgtccaagt atttgaatt 2520
 cttatcattt gattaacacc catg 2544

<210> 107
 <211> 2555
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> hu-emAb-AMM01-AAV

<400> 107
 tgtgacgccc ggagacagaa ggtctctggg tggctggggt tttgtggggg gaggatggac 60
 attctgccat tgtgattact actactacta ctacatggac gtctggggca aagggaccac 120

ggtcaccgctc	tcctcaggta	agaatggcca	ctctagggcc	tttgtttct	gctactgcct	180
gtggggtttc	ctgagggcat	gttccgaggg	gacctgggcg	gactggccag	gaggggatgg	240
gcactggggg	gccttgagga	tctgggagcc	tctgtggatt	ttccgatgcc	tttggaatat	300
gggactcagg	ttgggtgcgt	ctgatggagt	aactgagcct	gggggcttgg	ggagccacat	360
ttggacgaga	tgctgaaca	aaccaggggt	cttagtgatg	gctgaggaat	gtgtctcagg	420
agcgggtgtc	gatcgtaatc	tttaggcca	taaaatgtgg	gttcacagtg	aggagtgcac	480
cctgggggtg	gggtttgttc	tgacgagga	agagcgctgt	gcacagaaag	cttagaaatg	540
gggcaagaga	tgcttttct	caggcaggat	ttagggcttg	gtctctcagc	atcccacact	600
tgtacagctg	atgtggcatc	tgtgttttct	ttctcatcct	agatcaggct	ttgagctgtg	660
aaataccctg	cctcatgcat	atgcaataa	cctgaggtct	tctgagataa	atatagatat	720
attggtgccc	tgagagcatc	acgccgccac	catggctacc	ggcagcagaa	caagcctgct	780
gctcgttttt	ggactgctct	gtctcccctg	ggtgcaagaa	ggcagcgctc	cctatgagct	840
gactcagcca	ccctcagtgt	cagtggcccc	ggggcagagg	gccacaatta	cctgtggggg	900
acacaacatc	ggagctaaaa	atgtccactg	gtaccagcag	aagccaggcc	aggcccctgt	960
cctggtcatc	caatatgata	gcgaccggcc	ctcagggatc	cctgagcgat	tctctggctc	1020
caactctggg	agcacggcca	ccctgaccat	cagcagggtc	gaagccgggg	atgaggccga	1080
ctattactgt	caggtgtggg	atagtggtcg	tgggcatccc	ctttatgtct	tcggaggtgg	1140
gaccaaggtc	accgtcctag	gtcagcccaa	ggccaacccc	actgtcactc	tgttcccacc	1200
ctcgagtgag	gagcttcaag	ccaacaaggc	cacactgggtg	tgtctcataa	gtgacttcta	1260
cccgggagcc	gtgacagtgg	cctggaaggc	agatagcagc	cccgtcaagg	cgggagtgga	1320
gaccaccaca	ccctccaaac	aaagcaacaa	caagtacgcg	gccagcagct	acctgagcct	1380
gacgcctgag	cagtggaagt	cccacagaag	ctacagctgc	caggtcacgc	atgaagggag	1440
caccgtggag	aagacagtgg	cccctacaga	atggtcagga	ggaagttagtg	gcagcgggag	1500
tgggtccaat	tggagtcatc	ctcaatttga	gaaaggaggg	ggaggggtcca	attggtctca	1560
tccgcagttt	gagaagggcg	gcggcggtc	caattggtcc	catccccagt	ttgaaaagg	1620
ctctgggtga	ggtggtagtg	ctggtgggca	ggttcagctg	gtgcagctctg	gagctgatgt	1680
gaagaagcct	ggggcctcag	tgaaggctc	ctgcaaggct	tctggttaca	cctttattca	1740
ttttggtatc	agttgggtgc	ggcaggcccc	tggacaaggg	cttgagtgga	tgggatggat	1800
cgacactaat	aatggtaaca	caactatgc	acagagtctc	cagggcagag	tcaccatgac	1860
cacagataca	tccacgggca	cagcctacat	ggagctgagg	agcctctcga	ctgacgacac	1920
ggccgtgtat	ttctgtgcgc	gagctctgga	aatggggcat	agaagtggct	tcccatttga	1980
ctactggggc	cagggagtcc	tggtcaccgt	ctccccaggt	gagttggctt	tccttctgcc	2040
tcctttctct	gggcccagcg	tcctctgacc	tggagctggg	agataatgtc	cgggggctcc	2100
ttatcgtagg	actgcaagat	cgetgcacag	cagcgaatcg	tgaaatattt	tctttagaat	2160
tatgaggtgc	gctgtgtgtc	aacctgcatc	ttaaattctt	tattggctgg	aaagagaact	2220

046539

gtcggagtgg gtgaatccag ccaggagggg cgcgtagccc cggctcttgat gagagcaggg 2280
 ttgggggcag gggtagccca gaaacggtgg ctgccgtcct gacaggggct tagggaggct 2340
 ccaggacctc agtgccttga agctggtttc catgagaaaa ggattgttta tcttaggagg 2400
 catgcttact gttaaaagac aggatatggt tgaagtggct tctgagaaaa atggttaaga 2460
 aaattatgac ttaaaaatgt gagagatfff caagtatatt aatfffff tta actgtccaag 2520
 tatttgaat tcttatcatt tgattaacac ccatg 2555

<210> 108

<211> 2261

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Balb/C mRSV-интегрирование сплайсинга

<400> 108

ctactgggggt caaggaacct cagtcaccgt ctctcaggt aagaatggcc tctccaggtc 60
 tttatffffa acctttgtta tggagtffff tgagcattgc agactaatct tggatatttg 120
 tccctgaggg agccggctga gagaagtgg gaaataaact gtctagggat ctcagagcct 180
 ttaggacaga ttatctccac atctttgaaa aactaagaat ctgtgtgatg gtgttgggtg 240
 agtccttggg tgatgggata gggactttgg aggctcattt gaagaagatg ctaaaacaat 300
 cctatggctg gagggatagt tggggctgta gttggagatt ttcagttfff agaataaaag 360
 tattagtgtt ggaatatact tcaggaccac ctctgtgaca gcatttatac agtatccgat 420
 ggacaagtga gtgtctcagg ttaggattct attttaagat tgagatatta ggctttgata 480
 ctacatctaa atggctctga catgtctcga agaaagtctt tcagacagag ttaggacttg 540
 gatccaggag ttaggacttg gactgactca ggaggactct agtttcttct tctccagctg 600
 gaatgtcctt atgtaagaaa agccttgctt catgagtatg caaatcatgt gcgactgtga 660
 tgattaatat agggatatcc acaccaaaaa tcatatgagc cctatcttct ctacagacac 720
 tgaatctcaa ggtccttaca atggaaaccg acacactgct gctgtgggtg ctgcttcttt 780
 ggggtccccg aagcacaggc gacatccagc tgacacagag cctgccatc atgtctgcta 840
 gccctggcga gaaagtgaca atgacctgtt ccgccagcag ctccgtgggc tacatgcact 900
 ggtatcagca gaagtctagc acaagcccc aagctgtggat ctacgacacc tccaagctgg 960
 cctctggcgt gccaggcaga ttttctggaa gcggcagcgg caacagctac agcctgacta 1020
 tcagctccat ccaggccgag gatgtggcta cctactactg cttcagaggc agcggctacc 1080
 ccttcacatt tggccagggc accaagctgg aaatcaaggc cgatgccgct cctaccgtgt 1140
 ctatctttcc acctagcagc gagcagctga catctggcgg agcctctgtc gtgtgcttcc 1200
 tgaacaactt ctaccctaag gacatcaacg tcaagtggaa gatcgacggc tccgagagac 1260
 agaacggcgt gctgaactct tggaccgacc aggacagcaa ggatagcacc tacagcatga 1320
 gcagcactct gacctgaca aaggacgagt acgagaggca caactcctac acatgcgagg 1380
 ccacacaaa gaccagcaca tccccaatcg tgaagtcctt caaccggaac gagtgcggag 1440

gaagtagtgg cagcgggagt gggccaatt ggagtcaccc tcaatttgag aaaggagggg 1500
 gaggtccaa ttggtctcat ccgagtttg agaagggcg cgccggctcc aatgggtccc 1560
 atccccagtt tgaaaaaggc tctgggtggag gtggtagtgc tgggtggcag gtggaactgc 1620
 aagaaagcgg ccctggcatc ctgcagcctt ctcagacact gagcctgacc tgtagcttca 1680
 gcggcttcag cctgagcaca agcggcatgt ctgtcggctg gatcagacag ccttctggcg 1740
 aaggactgga atggctggcc gacatttggg gggacgaca gaaggactac aacccagcc 1800
 tgaagtccag actgaccatc agcaaggaca ccagcagcaa ccaggtgttc ctgaagatca 1860
 ccggcgtgga cacagccgat accgccacct attactgccc cagatccatg atcaccaact 1920
 ggtacttcga cgtgtggggc gctggcacca cagtgaccgt ctctcaggt gagtccctaac 1980
 ttctcccatt ctaaatgcat gttgggggga ttctgggctt tcaggaccac atagggacaa 2040
 agagtggagt ggggcacttt ctttagatth gtgaggaatg ttccgacta gattgtttaa 2100
 aacttcattt gttggaagga gagctgtctt agtgattgag tcaagggaga aaggcatcta 2160
 gcctcgtct caaaagggta gttgctgtct agagaggtct ggtggagcct gcaaaagtcc 2220
 agctttcaaa ggaacacaga agtatgtgta tggaatatta g 2261

<210> 109

<211> 1707

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> TT-hRSV-T7-интегрированный

<400> 109

gtcttagtga tggctgagga atgtgtctca ggagcgggtg ccgtaatctt tagccaata 60
 aatgtgggt tcacagtgag gagtgcaccc tggggttggg gtttgttctg cagcgggaag 120
 agcgtgtgac acagaaagct tagaaatggg gcaagagatg ctttctctca ggcaggatth 180
 agggcttggg ctctcagcat cccacacttg tacagctgat gtggcatctg tgttttctth 240
 ctcatcctag atcaggctth gagctgtgaa ataccctgcc tcatgcatat gcaataacc 300
 tgaggcttcc tgagataaat atagatatah tggtgccctg aggtttaaacc gccgccacca 360
 tggctaccgg cagcagaaca agcctgctgc tcgcttttgg actgctctgt ctcccctggg 420
 tgcaagaagg cagcggcagc atccagatga cacagagccc tagcacactg tctgccagcg 480
 tggcgacag agtgaccatc acatgcaagt gccagctgag cgtgggctac atgactggg 540
 atcagcaaaa gcccgcaag gccctaagc tgctgatcta cgatacctcc aagctggcct 600
 ctggcgtgcc ctccagatth tctggcagcg gcagcggaac cgagttcacc ctgaccatct 660
 caagcctgca gcctgacgac ttcgctacgt actactgctt ccaaggcagc ggctaccct 720
 tcacatttgg cggcggaaca aagctggaaa tcaagcggac tgtggccgct cctagcgtgt 780
 tcacttttcc acctagcagc gagcagctga agtctggcac tgcctctgtc gtgtgctgac 840
 tgaacaactt ctaccctcga gaggccaagg tgcagtggaa agtggacaat gccctgcaga 900
 gcggcaacag ccaagagtct gtgaccgagc aggactccaa ggattccacc tacagcctgt 960

046539

ctagcaccct gactctgagc aaggccgact acgagaagca caaggtgtac gcctgcgaag 1020
 tgacacacca gggactgagc agccctgtga ccaagagctt caatcggggc gagtgcggag 1080
 gaagtagtgg cagcgggagt gggccaatt ggagtcaccc tcaatctgag aaaggagggg 1140
 gagggccaat ttggtctcat ccgagctttg agaagggcgg cggcggctcc aattggctcc 1200
 atccccagtt tgaaaaaggc tctggaggag gtggtagtgc tggggggcaa gtgaccctga 1260
 gagagtctgg acctgctctg gtcaagccca cacagaccct gacctgacc tgcaccttca 1320
 gcggctttag cctgagcaca agcggcatga gcgtcggctg gattagacag cctcctggca 1380
 aagccctgga atggctggcc gacatttggg gggacgacaa gaaggactac aaccacagcc 1440
 tgaagtcccg gctgaccatc agcaaggaca ccagcaagaa ccaggtgggtg ctgaaagtga 1500
 ccaacatgga cctgcccagc accgccacct actactgtgc cagatccatg atcaccaact 1560
 ggtacttcga cgtgtgggga gccggcacca caaccgtctc ttcaggttaag tctgctgtct 1620
 ggggatagcg gggagccagg tgtactgggc caggcaaggg ctttgggtga ggactgcaag 1680
 atcgtgcac agcagcgaat cgtgaaa 1707

<210> 110
 <211> 450
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 110
 tgtgacgccc ggagacagaa ggtctctggg tggctggggt tttgtggggg gaggatggac 60
 attctgccat tgtgattact actactacta ctacatggac gtctggggca aagggaccac 120
 ggtcaccgtc tcctcaggta agaatggcca ctctagggcc tttgttttct gctactgctt 180
 gtggggtttc ctgagcattg caggttggtc ctccgggcat gttccgaggg gacctgggag 240
 gactggccag gaggggatgg gcaactgggt gccttgagga tctgggagcc tctgtggatt 300
 ttccgatgcc tttggaaaat gggactcagg ttgggtgcgt ctgatggagt aactgagcct 360
 gggggccttg ggagccacat ttggacgaga tgctgaaca aaccaggggt cttagtgatg 420
 gctgaggaat gtgtctcagg agcgggtgtc 450

<210> 111
 <211> 300
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 111
 gtaatcttta ggccaataaa atgtgggttc acagtgagga gtgcatcctg gggttggggg 60
 ttgttctgca gcgggaagag cgctgtgcac agaaagctta gaaatggggc aagagatgct 120
 tttcctcagg caggatttag ggcttggctc ctccagcatc cacacttgta cagctgatgt 180
 ggcatctgtg ttttctttct catcctagat caggctttga gctgtgaaat accctgcctc 240
 atgcatatgc aaataacctg aggtcttctg agataaatat agatatattg gtgccctgag 300

<210> 112
 <211> 78

<212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Кодирующая последовательность сигнального пептида

 <400> 112
 atggctaccg gcagcagaac aagcctgctg ctcgcttttg gactgctctg tctcccctgg 60
 ttgсаагааg gcagcgcc 78

 <210> 113
 <211> 717
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Кодирующая последовательность легкой цепи hRSV

 <400> 113
 atggctaccg gcagcagaac aagcctgctg ctcgcttttg gactgctctg tctcccctgg 60
 ttgсаагааg gcagcgccga catccagatg acacagagcc ctagcacact gtctgccagc 120
 gtggcgгaca gagtgaccat cacatgcaag tgccagctga gcgtgggcta catgcactgg 180
 tatcagcaaa agcccggcaа ggcccctaag ctgctgatct acgatacctc caagctggcc 240
 tctggcgtgc cctccagatt ttctggcagc ggсagcggaа ccgagttcac cctgaccatc 300
 tcaagcctgc agcctgacga cttcgctacg tactactgct tccaaggcag cgгctacccc 360
 ttcacatttg gcggcggaac aaagctggaа atcaagcgga ctgtggccgc tcctagcgtg 420
 ttcactcttc cacctagcga cgagcagctg aagtctggca ctgcctctgt cgtgtgcctg 480
 ctgaacaact tctaccctcg agaggccaag gtgcagtgga aagtggacaа tgcctgcag 540
 agcgгcaaca gccaaгagtc tgtgaccgag caggactcca aggattccac ctacagcctg 600
 tctagcaccс tgactctgag caaggccgac tacgagaagc аcaaggtgta cgcctgcgaa 660
 gtgacacacc agggactgag cagccctgtg accaaгagct tcaatcgggg cgagtgс 717

 <210> 114
 <211> 321
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Кодирующая последовательность переменной легкой цепи hRSV

 <400> 114
 gatatccaga tgacacagag ccctagcaca ctgtctgcca gcgtgggсga cagagtгacc 60
 atcacatgca agtgccagct gagcgtgggc tacatgcact ggtatcagca aaagcccggc 120
 aaggccccta agctgctgat ctacgatacc tccaagctgg cctctggcgt gccctccaga 180
 tttctggca gcggcagcgg aaccgagttc accctgacca tetcaagcct gcagcctgac 240
 gacttcgcta cgtactactg cttccaaggc agcggctacc cttcacatt tggcgгcgga 300
 аcaaaгctgg аaatcaagcg g 321

 <210> 115
 <211> 318

<212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Кодирующая последовательность константной легкой цепи каппа

<400> 115
 actgtggccg ctccctagcgt gttcatcttt ccacctagcg acgagcagct gaagtctggc 60
 actgcctctg tcgtgtgctt gctgaacaac ttctaccctc gagaggccaa ggtgcagtgg 120
 aaagtggaca atgcctgca gacgcgcaac agccaagagt ctgtgaccga gcaggactcc 180
 aaggattcca cctacagcct gtctagcacc ctgactctga gcaaggccga ctacgagaag 240
 cacaaggtgt acgcctgcga agtgacacac cagggactga gcagccctgt gaccaagagc 300
 ttcaatcggg gcgagtgc 318

<210> 116
 <211> 171
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Кодирующая последовательность линкера GSSG-streptag

<400> 116
 ggaggaagta gtggcagcgg gagtgggtcc aattggagtc atcctcaatt tgagaaagga 60
 gggggagggt ccaattggtc tcaccgagcag tttagaagg gcggcggcgg ctccaattgg 120
 tcccatcccc agtttgaaaa aggctctggt ggaggtggta gtgctggtgg g 171

<210> 117
 <211> 357
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Кодирующая последовательность варибельной тяжелой цепи hRSV

<400> 117
 caagtgaccs tgagagagtc tggacctgct ctggtcaagc ccacacagac cctgacactg 60
 acctgcacct tcagcggctt tagcctgagc acaagcggca tgagcgtcgg ctggattaga 120
 cagcctcctg gcaaagccct ggaatggctg gccgacattt ggtgggacga caagaaggac 180
 tacaaccccc gcctgaagtc ccggctgacc atcagcaagg acaccagcaa gaaccaggtg 240
 gtgctgaaag tgaccaacat ggaccctgcc gacaccgcca cctactactg tgccagatcc 300
 atgatcacca actggtactt cgacgtgtgg ggagccggca ccacaaccgt ctcttca 357

<210> 118
 <211> 26
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> аминокислотная последовательность сигнального пептида

<400> 118

Met Ala Thr Gly Ser Arg Thr Ser Leu Leu Leu Ala Phe Gly Leu Leu
 1 5 10 15

Cys Leu Pro Trp Leu Gln Glu Gly Ser Ala
 20 25

<210> 119

<211> 239

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Аминокислотная последовательность легкой цепи hRSV

<400> 119

Met Ala Thr Gly Ser Arg Thr Ser Leu Leu Leu Ala Phe Gly Leu Leu
 1 5 10 15

Cys Leu Pro Trp Leu Gln Glu Gly Ser Ala Asp Ile Gln Met Thr Gln
 20 25 30

Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr
 35 40 45

Cys Lys Cys Gln Leu Ser Val Gly Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys
 50 55 60

Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala
 65 70 75 80

Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe
 85 90 95

Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr
 100 105 110

Cys Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
 115 120 125

Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
 130 135 140

Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
 145 150 155 160

Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp
 165 170 175

Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp
 180 185 190

Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys
 195 200 205

Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln
 210 215 220

Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230 235

<210> 120

<211> 107

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Аминокислотная последовательность вариабельной легкой цепи hRSV

<400> 120

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Cys Gln Leu Ser Val Gly Tyr Met
 20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 35 40 45

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp
 65 70 75 80

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Phe Thr
 85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 121

<211> 106

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Аминокислотная последовательность константной легкой цепи каппа

<400> 121

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 1 5 10 15

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 20 25 30

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 35 40 45

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 50 55 60

046539

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
65 70 75 80

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
85 90 95

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 122

<211> 57

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Аминокислотная последовательность линкера GSSG-streptag

<400> 122

Gly Gly Ser Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Asn Trp Ser His Pro Gln
1 5 10 15

Phe Glu Lys Gly Gly Gly Gly Ser Asn Trp Ser His Pro Gln Phe Glu
20 25 30

Lys Gly Gly Gly Gly Ser Asn Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Gly
35 40 45

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Gly Gly
50 55

<210> 123

<211> 119

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Аминокислотная последовательность вариabельной тяжелой цепи hRSV

<400> 123

Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln
1 5 10 15

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
20 25 30

Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu
35 40 45

Trp Leu Ala Asp Ile Trp Trp Asp Asp Lys Lys Asp Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
65 70 75 80

Val Leu Lys Val Thr Asn Met Asp Pro Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Ser Met Ile Thr Asn Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala
 100 105 110

Gly Thr Thr Thr Val Ser Ser
 115

<210> 124
 <211> 67
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 < 223 Граница сплайсинга с фланкирующей последовательностью в конструкциях настоящего изобретения

<400> 124
 caggtaaagtc tgctgtctgg ggatagcggg gagccagggtg tactggggcca ggcaagggct 60
 ttggatc 67

<210> 125
 <211> 450
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 125
 gtaggactgc aagatcgctg cacagcagcg aatcgtgaaa tattttcttt agaattatga 60
 ggtgcgctgt gtgtcaacct gcatcttaaa ttctttattg gctggaaaga gaactgtcgg 120
 agtgggtgaa tccagccagg agggacgcgt agccccggtc ttgatgagag cagggttggg 180
 ggcaggggta gccagaaac ggtggctgcc gtcctgacag gggcttaggg aggctccagg 240
 acctcagtgc cttgaagctg gtttccatga gaaaaggatt gtttatctta ggaggcatgc 300
 ttactgttaa aagacaggat atgtttgaag tggcttctga gaaaaatggg taagaaaatt 360
 atgacttaaa aatgtgagag attttcaagt atattaattt ttttaactgt ccaagtattt 420
 gaaattctta tcatttgatt aacacccatg 450

<210> 126
 <211> 415
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 Аминокислотная последовательность сигнальный пептид-легкая цепь-линкер streptag-
 переменная тяжелая цепь
 в анти-RSV эмAb AAV человека

<400> 126

Met Ala Thr Gly Ser Arg Thr Ser Leu Leu Ala Phe Gly Leu Leu
 1 5 10 15

Cys Leu Pro Trp Leu Gln Glu Gly Ser Ala Asp Ile Gln Met Thr Gln
 20 25 30

Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr

046539

Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg
 325 330 335

Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu Ala Asp Ile Trp Trp Asp
 340 345 350

Asp Lys Lys Asp Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser
 355 360 365

Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Lys Val Thr Asn Met Asp
 370 375 380

Pro Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Met Ile Thr Asn
 385 390 395 400

Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Thr Val Ser Ser
 405 410 415

<210> 127
 <211> 502
 <212> ДНК
 <213> Mus musculus

<400> 127
 ccaggggtga ttctagtcag actctggggt tttgtcggg tatagaggaa aaatccacta 60
 ttgtgattac tatgctatgg actactgggg tcaaggaacc tcagtcaccg tctcctcagg 120
 taagaatggc ctctccaggt ctttattttt aacctttggt atggagtttt ctgagcattg 180
 cagactaatc ttggatattt gtccttgagg gagccggctg agagaagttg gaaataaac 240
 tgtctagggg tctcagagcc tttaggacag attatctcca catctttgaa aaactaagaa 300
 tctgtgtgat ggtgttggtg gagtccctgg atgatgggat agggactttg gaggctcatt 360
 tgaggagat gctaaaacaa tcctatggct ggagggatag ttggggctgt agttggagat 420
 tttcagtttt tagaataaaa gtattagttg tggaatatac ttcaggacca cctctgtgac 480
 agcatttata cagtatccga tg 502

<210> 128
 <211> 319
 <212> ДНК
 <213> Mus musculus

<400> 128
 gacaagtgag tgtctcaggt taggattcta ttttaagatt gagatattag gctttgatac 60
 tacatctaaa tggctgttac atgtctcgaa gaaagttctt cagacagagt taggacttgg 120
 atccaggagt taggacttgg actgactcag gaggactcta gtttcttctt ctccagctgg 180
 aatgtcctta tgtaagaaaa gccttgccctc atgagtatgc aatcatgtg cgactgtgat 240
 gattaatata gggatatcca caccaaacat catatgagcc ctatcttctc tacagacact 300
 gaatctcaag gtccttaca 319

<210> 129

<211> 60
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Кодированная последовательность сигнального пептида

<400> 129

atggaaacccg acacactgct gctgtgggtg ctgcttcttt gggtgcccgg aagcacaggg 60

<210> 130

<211> 696

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Кодированная последовательность легкой цепи каппа в mRSV

<400> 130

atggaaacccg acacactgct gctgtgggtg ctgcttcttt gggtgcccgg aagcacaggg 60

gacatccagc tgacacagag cctgccatc atgtctgcta gccctggcga gaaagtgaca 120

atgacctggt cggccagcag ctccgtgggc tacatgcact ggtatcagca gaagtctagc 180

acaagcccca agctgtggat ctacgacacc tccaagctgg cctctggcgt gccaggcaga 240

ttttctggaa gcggcagcgg caacagctac agcctgacta tcagctccat ccaggccgag 300

gatgtggcta cctactactg cttcagaggg agcggctacc ccttcacatt tggccagggc 360

accaagctgg aatcaaggc cgatgccgt cctaccgtgt ctatctttcc acctagcagc 420

gagcagctga catctggcgg agcctctgtc gtgtgcttcc tgaacaactt ctaccctaag 480

gacatcaacg tcaagtggaa gatcgacggc tccgagagac agaacggcgt gctgaactct 540

tggaccgacc aggacagcaa ggatagcacc tacagcatga gcagcactct gaccctgaca 600

aaggacgagt acgagaggca caactcctac acatgagagg ccacacacaa gaccagcaca 660

tccccaatcg tgaagtcctt caaccggaac gagtgc 696

<210> 131

<211> 318

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Кодированная последовательность варибельной легкой цепи мПаливизумаба

<400> 131

gacatccagc tgacacagag cctgccatc atgtctgcta gccctggcga gaaagtgaca 60

atgacctggt cggccagcag ctccgtgggc tacatgcact ggtatcagca gaagtctagc 120

acaagcccca agctgtggat ctacgacacc tccaagctgg cctctggcgt gccaggcaga 180

ttttctggaa gcggcagcgg caacagctac agcctgacta tcagctccat ccaggccgag 240

gatgtggcta cctactactg cttcagaggg agcggctacc ccttcacatt tggccagggc 300

accaagctgg aatcaag 318

<210> 132

<211> 318

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Кодированная последовательность константной легкой цепи каппа mIgL

<400> 132

```
gccgatgccg ctccctaccgt gtctatcttt ccacctagca gcgagcagct gacatctggc      60
ggagcctctg tcgtgtgctt cctgaacaac ttctacccta aggacatcaa cgtcaagtgg      120
aagatcgacg gctccgagag acagaacggc gtgctgaact cttggaccga ccaggacagc      180
aaggatagca cctacagcat gagcagcact ctgaccctga caaaggacga gtacgagagg      240
cacaactcct acacatgcga ggccacacac aagaccagca catccccaat cgtgaagtcc      300
ttcaaccgga acgagtgc                                     318
```

<210> 133

<211> 360

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Кодированная последовательность переменной тяжелой цепи мПаливизумаба

<400> 133

```
caggtggaac tgcaagaaag cggccctggc atcctgcagc cttctcagac actgagcctg      60
acctgtagct tcagcggctt cagcctgagc acaagcggca tgtctgtcgg ctggatcaga      120
cagccttctg gcgaaggact ggaatggctg gccgacattt ggtgggacga caagaaggac      180
tacaacccca gcctgaagtc cagactgacc atcagcaagg acaccagcag caaccagggtg      240
ttcctgaaga tcaccggcgt ggacacagcc gataccgcca cctattactg cgcagatcc      300
atgatcacca actggtactt cgacgtgtgg ggcgctggca ccacagtgac cgtctcctca      360
```

<210> 134

<211> 20

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> аминокислотная последовательность сигнального пептида

<400> 134

```
Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1           5           10           15
```

```
Gly Ser Thr Gly
                20
```

<210> 135

<211> 232

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Аминокислотная последовательность легкой цепи каппа mRSV

<400> 135

```
Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
```


046539

1 5 10 15
 Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Gly Tyr Met
 20 25 30
 His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Ser Thr Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr
 35 40 45
 Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Gly Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Asn Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Ile Gln Ala Glu
 65 70 75 80
 Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Arg Gly Ser Gly Tyr Pro Phe Thr
 85 90 95
 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 137

<211> 106

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Аминокислотная последовательность константной легкой цепи каппа mIgL

<400> 137

Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln
 1 5 10 15
 Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr
 20 25 30
 Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln
 35 40 45
 Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 50 55 60
 Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg
 65 70 75 80
 His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro
 85 90 95
 Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
 100 105

<210> 138

<211> 120

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

046539

<220>

<223> Аминокислотная последовательность вариабельной тяжелой цепи мПаливизумаба

<400> 138

Gln Val Glu Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln Pro Ser Gln
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
20 25 30

Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Glu Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Leu Ala Asp Ile Trp Trp Asp Asp Lys Lys Asp Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Ser Asn Gln Val
65 70 75 80

Phe Leu Lys Ile Thr Gly Val Asp Thr Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Ser Met Ile Thr Asn Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 139

<211> 64

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

< 223 Граница сплайсинга с фланкирующей последовательностью

<400> 139

caggtgagtc ctaacttctc ccattcctaaa tgcattgttg ggggattctg ggccttcagg 60

acca 64

<210> 140

<211> 968

<212> ДНК

<213> Mus musculus

<400> 140

catagggaca aagagtggag tggggcactt tcttttagatt tgtgaggaat gttccgcact 60

agattgttta aaacttcatt tgttgaagg agagctgtct tagtgattga gtcaaggagg 120

aaaggcatct agcctcggtc tcaaaagggt agttgctgct tagagaggct tggaggagcc 180

tgcaaaagtc cagctttcaa agaacacag aagtatgtgt atggaatatt agaagatgtt 240

gcttttactc ttaagttggt tcctaggaaa aatagttaaa tactgtgact ttaaaatgtg 300

agagggtttt caagtactca tttttttaa tgtccaaaat ttttgtcaat cagtttgagg 360

tcttgtttgt gtagaactga tattacttaa agtttaaccg aggaatggga gtgaggctct 420

ctcataacct attcagaact gacttttaac aataataaat taagtttaaa atatttttaa 480
atgaattgag caatgttgag ttggagtcaa gatggccgat cagaaccaga acacctgcag 540
cagctggcag gaagcaggtc atgtggcaag gctatgtggg gaagggaaaa taaaacct 600
aggtaaactt gtagctgtgg tttgaagaag tggttttgaa aactctgtc cagccccacc 660
aaaccgaaag tccaggctga gcaaacacc acctgggtaa tttgcatttc taaaataagt 720
tgaggattca gccgaaactg gagaggtcct cttttaactt attgagttca accttttaat 780
tttagcttga gtagttctag tttcccaaaa cttaagttta tcgacttcta aatgtatatt 840
agaattcatt ttcaaaaatta ggttatgtaa gaaattgaag gacttttagtg tctttaattt 900
ctaatatatt tagaaaactt cttaaaaatta ctctattatt cttccctctg attattggtc 960
tccattca 968

<210> 141
<211> 409
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
Аминокислотная последовательность сигнальный пептид-легкая цепь-линкер streptag-
вариабельная тяжелая цепь
в анти-RSV эмAb AAV мыши

<400> 141

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser
20 25 30

Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser
35 40 45

Val Gly Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Ser Thr Ser Pro Lys
50 55 60

Leu Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Gly Arg
65 70 75 80

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Asn Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser
85 90 95

Ile Gln Ala Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Arg Gly Ser Gly
100 105 110

Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Ala Asp
115 120 125

Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr
130 135 140

046539

Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys
 145 150 155 160

Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly
 165 170 175

Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser
 180 185 190

Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn
 195 200 205

Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val
 210 215 220

Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys Gly Gly Ser Ser Gly Ser Gly Ser
 225 230 235 240

Gly Ser Asn Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Gly Gly Gly Gly Ser
 245 250 255

Asn Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Gly Gly Gly Gly Ser Asn Trp
 260 265 270

Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Gly
 275 280 285

Gly Gln Val Glu Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln Pro Ser
 290 295 300

Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr
 305 310 315 320

Ser Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Glu Gly Leu
 325 330 335

Glu Trp Leu Ala Asp Ile Trp Trp Asp Asp Lys Lys Asp Tyr Asn Pro
 340 345 350

Ser Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Ser Asn Gln
 355 360 365

Val Phe Leu Lys Ile Thr Gly Val Asp Thr Ala Asp Thr Ala Thr Tyr
 370 375 380

Tyr Cys Ala Arg Ser Met Ile Thr Asn Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly
 385 390 395 400

Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 405

<210> 142

<211> 39

<212> ДНК
<213> Mus musculus

<400> 142
accacctctg tgacagcatt tatacagtat ccgatggat 39

<210> 143
<211> 39
<212> ДНК
<213> Mus musculus

<400> 143
atccataggg acaaagagtg gagtggggca ctttcttta 39

<210> 144
<211> 409
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
Аминокислотная последовательность сигнальный пептид-легкая цепь-линкер streptag-
вариабельная тяжелая цепь

Аминокислотная последовательность в ms-emAb-RSV-дцДНК

<400> 144

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser
20 25 30

Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser
35 40 45

Val Gly Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Ser Thr Ser Pro Lys
50 55 60

Leu Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Gly Arg
65 70 75 80

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Asn Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser
85 90 95

Ile Gln Ala Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Arg Gly Ser Gly
100 105 110

Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Ala Asp
115 120 125

Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr
130 135 140

Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys
145 150 155 160

Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly
165 170 175

046539

Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser
 180 185 190

Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn
 195 200 205

Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val
 210 215 220

Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys Gly Gly Ser Ser Gly Ser Gly Ser
 225 230 235 240

Gly Ser Asn Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Gly Gly Gly Gly Ser
 245 250 255

Asn Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Gly Gly Gly Gly Ser Asn Trp
 260 265 270

Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Gly
 275 280 285

Gly Gln Val Glu Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln Pro Ser
 290 295 300

Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr
 305 310 315 320

Ser Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Glu Gly Leu
 325 330 335

Glu Trp Leu Ala Asp Ile Trp Trp Asp Asp Lys Lys Asp Tyr Asn Pro
 340 345 350

Ser Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Ser Asn Gln
 355 360 365

Val Phe Leu Lys Ile Thr Gly Val Asp Thr Ala Asp Thr Ala Thr Tyr
 370 375 380

Tyr Cys Ala Arg Ser Met Ile Thr Asn Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly
 385 390 395 400

Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 405

<210> 145
 <211> 708
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Кодирующая последовательность легкой цепи VRC01

<400> 145
atggctaccg gcagcagaac aagcctgctg ctcgcttttg gactgctctg tctcccctgg 60
ttgcaagaag gcagcgcgga aattgtgttg acacagtctc caggcaccct gtctttgtct 120
ccaggggaaa cagccatcat ctcttgctgg accagtcagt atggttcctt agcctgggat 180
caacagaggc cgggccaggc cccagggctc gtcactctatt cgggctctac tcgggcccgt 240
ggcatcccag acaggttcag cggcagtcgg tgggggcccag actacaatct caccatcagc 300
aacctggagt cgggagattt tgggttttat tattgccagc agtatgaatt ttttggccag 360
gggaccaagg tccaggtcga cattaagcgc actgtggccg ctccctagcgt gttcatcttt 420
ccacctagcg acgagcagct gaagtctggc actgcctctg tcgtgtgcct gctgaacaac 480
ttctaccctc gagaggccaa ggtgcagtgg aaagtggaca atgccctgca gagcggcaac 540
agccaagagt ctgtgaccga gcaggactcc aaggattcca cctacagcct gtctagcacc 600
ctgactctga gcaaggccga ctacgagaag cacaaggtgt acgcctgcga agtgacacac 660
cagggactga gcagccctgt gaccaagagc ttcaatcggg gcgagtgc 708

<210> 146
<211> 312
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Кодирущая последовательность переменной легкой цепи VRC01

<400> 146
gaaattgtgt tgacacagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aacagccatc 60
atctcttgtc ggaccagtca gtatggttcc ttagcctggg atcaacagag gcccgccag 120
gccccaggc tcgtcatcta ttccggctct actcgggccc ctggcatccc agacaggttc 180
agcggcagtc ggtgggggccc agactacaat ctaccatca gcaacctgga gtcgggagat 240
tttgggtgtt attattgcca gcagtatgaa ttttttggcc aggggacca ggtccaggtc 300
gacattaagc gc 312

<210> 147
<211> 363
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Кодирущая последовательность переменной тяжелой цепи VRC01

<400> 147
caggtgcagc tgggtgcagtc tgggggtcag atgaagaagc ctggcgagtc gatgagaatt 60
tcttgctggg ctctctggata tgaatttatt gattgtacgc taaattggat tcgtctggcc 120
ccccgaaaaa ggcctgagtg gatgggatgg ctgaagcctc gaggtggcgc ggtcaactac 180
gcacgtccac ttcagggcag agtgaccatg actcgagacg tttattccga cacagccttt 240
ttggagctgc gctcgttgac agtagacgac acggccgtct acttttgtac taggggaaaa 300
aactgtgatt acaattggga cttcgaacac tggggcccgg gcaccccggg catcgtctca 360
tca 363

<210> 148
 <211> 236
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Аминокислотная последовательность легкой цепи VRC01

 <400> 148

 Met Ala Thr Gly Ser Arg Thr Ser Leu Leu Leu Ala Phe Gly Leu Leu
 1 5 10 15

 Cys Leu Pro Trp Leu Gln Glu Gly Ser Ala Glu Ile Val Leu Thr Gln
 20 25 30

 Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Thr Ala Ile Ile Ser
 35 40 45

 Cys Arg Thr Ser Gln Tyr Gly Ser Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Arg Pro
 50 55 60

 Gly Gln Ala Pro Arg Leu Val Ile Tyr Ser Gly Ser Thr Arg Ala Ala
 65 70 75 80

 Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Arg Trp Gly Pro Asp Tyr Asn
 85 90 95

 Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Ser Gly Asp Phe Gly Val Tyr Tyr Cys
 100 105 110

 Gln Gln Tyr Glu Phe Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Gln Val Asp Ile
 115 120 125

 Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
 130 135 140

 Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
 145 150 155 160

 Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
 165 170 175

 Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
 180 185 190

 Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
 195 200 205

 Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
 210 215 220

 Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230 235

046539

<210> 149
<211> 104
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Аминокислотная последовательность переменной легкой цепи VRC01

<400> 149

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Thr Ala Ile Ile Ser Cys Arg Thr Ser Gln Tyr Gly Ser Leu Ala
20 25 30

Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Val Ile Tyr Ser
35 40 45

Gly Ser Thr Arg Ala Ala Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Arg
50 55 60

Trp Gly Pro Asp Tyr Asn Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Ser Gly Asp
65 70 75 80

Phe Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Glu Phe Phe Gly Gln Gly Thr
85 90 95

Lys Val Gln Val Asp Ile Lys Arg
100

<210> 150
<211> 121
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Аминокислотная последовательность переменной тяжелой цепи VRC01

<400> 150

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gln Met Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15

Ser Met Arg Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gly Tyr Glu Phe Ile Asp Cys
20 25 30

Thr Leu Asn Trp Ile Arg Leu Ala Pro Gly Lys Arg Pro Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Leu Lys Pro Arg Gly Gly Ala Val Asn Tyr Ala Arg Pro Leu
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Val Tyr Ser Asp Thr Ala Phe
65 70 75 80

046539

Leu Glu Leu Arg Ser Leu Thr Val Asp Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Thr Arg Gly Lys Asn Cys Asp Tyr Asn Trp Asp Phe Glu His Trp Gly
100 105 110

Arg Gly Thr Pro Val Ile Val Ser Ser
115 120

<210> 151
<211> 87
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
< 223 Граница сплайсинга с фланкирующей последовательностью в конструкциях настоящего изобретения

<400> 151
caggtgagtt ggctttcctt ctgcctcctt tctctggggc cagcgtcctc tgacctggag 60
ctgggagata atgtccgggg gctcctt 87

<210> 152
<211> 414
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
Аминокислотная последовательность сигнальный пептид-легкая цепь-линкер streptag-
вариабельная тяжелая цепь
в Hu-emAb-VRC01-AAV

<400> 152

Met Ala Thr Gly Ser Arg Thr Ser Leu Leu Leu Ala Phe Gly Leu Leu
1 5 10 15

Cys Leu Pro Trp Leu Gln Glu Gly Ser Ala Glu Ile Val Leu Thr Gln
20 25 30

Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Thr Ala Ile Ile Ser
35 40 45

Cys Arg Thr Ser Gln Tyr Gly Ser Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Arg Pro
50 55 60

Gly Gln Ala Pro Arg Leu Val Ile Tyr Ser Gly Ser Thr Arg Ala Ala
65 70 75 80

Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Arg Trp Gly Pro Asp Tyr Asn
85 90 95

Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Ser Gly Asp Phe Gly Val Tyr Tyr Cys
100 105 110

Gln Gln Tyr Glu Phe Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Gln Val Asp Ile
115 120 125

046539

Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
 130 135 140

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
 145 150 155 160

Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
 165 170 175

Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
 180 185 190

Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
 195 200 205

Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
 210 215 220

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Gly Gly Ser Ser
 225 230 235 240

Gly Ser Gly Ser Gly Ser Asn Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Gly
 245 250 255

Gly Gly Gly Ser Asn Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Gly Gly Gly
 260 265 270

Gly Ser Asn Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Gly Ser Gly Gly Gly
 275 280 285

Gly Ser Ala Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gln Met
 290 295 300

Lys Lys Pro Gly Glu Ser Met Arg Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gly Tyr
 305 310 315 320

Glu Phe Ile Asp Cys Thr Leu Asn Trp Ile Arg Leu Ala Pro Gly Lys
 325 330 335

Arg Pro Glu Trp Met Gly Trp Leu Lys Pro Arg Gly Gly Ala Val Asn
 340 345 350

Tyr Ala Arg Pro Leu Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Val Tyr
 355 360 365

Ser Asp Thr Ala Phe Leu Glu Leu Arg Ser Leu Thr Val Asp Asp Thr
 370 375 380

Ala Val Tyr Phe Cys Thr Arg Gly Lys Asn Cys Asp Tyr Asn Trp Asp
 385 390 395 400

046539

Phe Glu His Trp Gly Arg Gly Thr Pro Val Ile Val Ser Ser
 405 410

<210> 153
 <211> 430
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 153
 tgtgacgccc ggagacagaa ggtctctggg tggctggggt tttgtggggt gaggatggac 60
 attctgccat tgtgattact actactacta ctacatggac gtctggggca aagggaccac 120
 ggtcaccgtc tcctcaggta agaatggcca ctctagggcc tttgttttct gctactgcct 180
 gtggggtttc ctgagggcat gttccgaggg gacctgggcg gactggccag gaggggatgg 240
 gcaactggggt gccttgagga tctgggagcc tctgtggatt ttccgatgcc tttggaaaat 300
 gggactcagg ttgggtgcgt ctgatggagt aactgagcct gggggcttgg ggagccacat 360
 ttggacgaga tgcctgaaca aaccaggggt cttagtgatg gctgaggaat gtgtctcagg 420
 agcggtgtct 430

<210> 154
 <211> 708
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Кодирущая последовательность легкой цепи Medi8852

<400> 154
 atggctaccg gcagcagaac aagcctgctg ctcgcttttg gactgctctg tctcccctgg 60
 ttgcaagaag gcagcgcoga tattcagatg acccagagcc cttccagcct gtccgcttca 120
 gtgggggatc gagtgaccat tacctgccoга accagccaga gcctgagctc ctacacgcac 180
 tggtatcagc agaagcccgg caaagcccct aagctgctga tctacgccgc ttctagtcgg 240
 gggtcgggag tgccaagccg gttctccgga tctgggagtg gaaccgactt tacctgaca 300
 atttcaagcc tgagcccoga ggatttcgct acatactact gtcagcagag cagaactttc 360
 gggcagggca ctaaggtgga gatcaaacgg actgtggccg ctccatagcgt gttcatcttt 420
 ccacctagcg acgagcagct gaagtctggc actgcctctg tcgtgtgcct gctgaacaac 480
 ttctaccctc gagaggccaa ggtgcagtgg aaagtggaca atgccctgca gagcggcaac 540
 agccaagagt ctgtgaccga gcaggactcc aaggattcca cctacagcct gtctagcacc 600
 ctgactctga gcaaggccoga ctacgagaag cacaagggtg acgcctgcga agtgacacac 660
 cagggactga gcagccctgt gaccaagagc ttcaatcggg gcgagtgc 708

<210> 155
 <211> 309
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Кодирущая последовательность вариательной легкой цепи MEDI8852-VK анти-
 ствол НА

046539

<400> 155
gatattcaga tgaccagag cccttcagc ctgtccgctt cagtggggga tcgagtgacc 60
attacctgcc gaaccagcca gagcctgagc tcctacacgc actggtatca gcagaagccc 120
ggcaaagccc ctaagctgct gatctacgcc gcttctagtc ggggggtccgg agtgccaagc 180
cggttctccg gatctgggag tggaaaccgac ttaccctga caatttcaag cctgcagccc 240
gaggatttcg ctacatacta ctgtcagcag agcagaactt tcgggcaggg cactaagggtg 300
gagatcaaaa 309

<210> 156
<211> 384
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Кодирующая последовательность варибельной тяжелой цепи анти-ствол НА

<400> 156
caggtccagc tgcaagcagc cggccccgga ctggtcaagc cttcacagac actgagcctg 60
acatgcgcca ttacgagaga tagcgtgagc tcctacaatg ccgtgtggaa ctggatcagg 120
cagtctccaa gtcgaggact ggagtggctg ggacgaacat actatagatc cgggtggtac 180
aatgactatg ctgaatcagt gaaaagccga attactatca accccgatac ctccaagaat 240
cagttctctc tgcagctgaa cagtgtgacc cctgaggaca cagccgtgta ctactgcgcc 300
agaagcggcc atatcacctg ctttggcgtc aatgtggatg ctttcgatat gtgggggagc 360
gggactatgg tcaccgtctc ttca 384

<210> 157
<211> 236
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Аминокислотная последовательность легкой цепи Medi8852

<400> 157
Met Ala Thr Gly Ser Arg Thr Ser Leu Leu Leu Ala Phe Gly Leu Leu
1 5 10 15
Cys Leu Pro Trp Leu Gln Glu Gly Ser Ala Asp Ile Gln Met Thr Gln
20 25 30
Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr
35 40 45
Cys Arg Thr Ser Gln Ser Leu Ser Ser Tyr Thr His Trp Tyr Gln Gln
50 55 60
Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Arg
65 70 75 80
Gly Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
85 90 95

046539

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr
 100 105 110

Tyr Cys Gln Gln Ser Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
 115 120 125

Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
 130 135 140

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
 145 150 155 160

Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
 165 170 175

Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
 180 185 190

Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
 195 200 205

Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
 210 215 220

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230 235

<210> 158

<211> 103

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Аминокислотная последовательность вариabельной легкой цепи MEDI8852-VK анти-
 ствол HA

<400> 158

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Gln Ser Leu Ser Ser Tyr
 20 25 30

Thr His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Arg Gly Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Arg Thr Phe Gly Gln

046539

85

90

95

Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100

<210> 159

<211> 128

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Аминокислотная последовательность вариабельной тяжелой цепи анти-ствол HA

<400> 159

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

Asn Ala Val Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Leu Gly Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Gly Trp Tyr Asn Asp Tyr Ala
50 55 60

Glu Ser Val Lys Ser Arg Ile Thr Ile Asn Pro Asp Thr Ser Lys Asn
65 70 75 80

Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val
85 90 95

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Gly His Ile Thr Val Phe Gly Val Asn Val
100 105 110

Asp Ala Phe Asp Met Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 160

<211> 421

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

Аминокислотная последовательность сигнальный пептид-легкая цепь-линкер streptag-
вариабельная тяжелая цепь
в hu-emAb-Medi8852-AAV

<400> 160

Met Ala Thr Gly Ser Arg Thr Ser Leu Leu Leu Ala Phe Gly Leu Leu
1 5 10 15

Cys Leu Pro Trp Leu Gln Glu Gly Ser Ala Asp Ile Gln Met Thr Gln
20 25 30

Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr

046539

Ser Val Ser Ser Tyr Asn Ala Val Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro
 325 330 335

Ser Arg Gly Leu Glu Trp Leu Gly Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Gly Trp
 340 345 350

Tyr Asn Asp Tyr Ala Glu Ser Val Lys Ser Arg Ile Thr Ile Asn Pro
 355 360 365

Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro
 370 375 380

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Gly His Ile Thr Val
 385 390 395 400

Phe Gly Val Asn Val Asp Ala Phe Asp Met Trp Gly Gln Gly Thr Met
 405 410 415

Val Thr Val Ser Ser
 420

<210> 161
 <211> 726
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Кодирующая последовательность легкой цепи AMM01

<400> 161
 atggctaccg gcagcagaac aagcctgctg ctgccttttg gactgctctg tctcccctgg 60
 ttgcaagaag gcagcgcctc ctatgagctg actcagccac cctcagtgtc agtggccccg 120
 gggcagaggg ccacaattac ctgtggggga cacaacatcg gagctaaaaa tgtccactgg 180
 taccagcaga agccaggcca ggcccctgtc ctggtcatcc aatatgatag cgaccggccc 240
 tcagggatcc ctgagcgatt ctctggctcc aactctggga gcacggccac cctgaccatc 300
 agcagggctg aagccgggga tgaggccgac tattactgtc aggtgtggga tagtggtcgt 360
 gggcatcccc tttatgtctt cggaggtggg accaaggcca cgcctctagg tcagcccaag 420
 gccaaaccca ctgtcactct gttcccacc ctagtgagg agcttcaagc caacaaggcc 480
 aactgggtgt gtctcataag tgacttctac cggggagccg tgacagtggc ctggaaggca 540
 gatagcagcc ccgtcaaggc gggagtggag accaccacac cctccaaaca aagcaacaac 600
 aagtacggg ccagcagcta cctgagcctg acgcctgagc agtggaaagtc ccacagaagc 660
 tacagctgcc aggtcacgca tgaagggagc accgtggaga agacagtggc ccctacagaa 720
 tgttca 726

<210> 162
 <211> 372
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Кодирующая последовательность варибельной легкой цепи лямбда АММ01

<400> 162

tcctatgagc tgactcagcc accctcagtg tcagtggccc cggggcagag ggccacaatt 60
acctgtgggg gacacaacat cggagctaaa aatgtccact ggtaccagca gaagccaggg 120
caggcccctg tcctggatcat ccaatatgat agcgaccggc cctcagggat cctgagcga 180
ttctctgggt ccaactctgg gagcacggcc accctgacca tcagcagggg cgaagccggg 240
gatgaggccg actattactg tcaggtgtgg gatagtggtc gtgggcatcc cctttatgtc 300
ttcggaggtg ggaccaaggt caccgtccta ggtcagccca aggccaaccs cactgtcact 360
ctgttcccac cc 372

<210> 163

<211> 276

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Кодирующая последовательность константной легкой цепи лямбда

<400> 163

tcgagtgagg agcttcaagc caacaaggcc aactgtgtgt gtctcataag tgacttctac 60
ccgggagccg tgacagtggc ctggaaggca gatagcagcc ccgtcaaggc gggagtggag 120
accaccasac cctccaaca aagcaacaac aagtacggcg ccagcagcta cctgagcctg 180
acgcctgagc agtggaaagtc ccacagaagc tacagctgcc aggtcacgca tgaagggagc 240
accgtggaga agacagtggc ccctacagaa tgttca 276

<210> 164

<211> 369

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Кодирующая последовательность варибельной тяжелой цепи АММ01

<400> 164

caggttcagc tgggtcagtc tggagctgat gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
tcctgcaagg cttctgggta cacctttatt cattttggta tcagttgggt gcggcagggc 120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcgacacta ataatggtaa cacaaactat 180
gcacagagtc tccagggcag agtcaccatg accacagata catccacggg cacagcctac 240
atggagctga ggagcctctc gactgacgac acggccgtgt atttctgtgc gcgagctctg 300
gaaatggggc atagaagtgg cttcccattt gactactggg gccagggagt cctggtcacc 360
gtctcccca 369

<210> 165

<211> 242

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Аминокислотная последовательность легкой цепи АММ01

046539

<400> 165

Met Ala Thr Gly Ser Arg Thr Ser Leu Leu Leu Ala Phe Gly Leu Leu
 1 5 10 15

Cys Leu Pro Trp Leu Gln Glu Gly Ser Ala Ser Tyr Glu Leu Thr Gln
 20 25 30

Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln Arg Ala Thr Ile Thr Cys
 35 40 45

Gly Gly His Asn Ile Gly Ala Lys Asn Val His Trp Tyr Gln Gln Lys
 50 55 60

Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Gln Tyr Asp Ser Asp Arg Pro
 65 70 75 80

Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Ser Thr Ala
 85 90 95

Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr
 100 105 110

Cys Gln Val Trp Asp Ser Gly Arg Gly His Pro Leu Tyr Val Phe Gly
 115 120 125

Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys Ala Asn Pro Thr
 130 135 140

Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala
 145 150 155 160

Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val
 165 170 175

Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr
 180 185 190

Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu
 195 200 205

Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln
 210 215 220

Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu
 225 230 235 240

Cys Ser

<210> 166

<211> 124

<212> Белок

046539

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Аминокислотная последовательность вариабельной легкой цепи AMM01

<400> 166

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln
1 5 10 15

Arg Ala Thr Ile Thr Cys Gly Gly His Asn Ile Gly Ala Lys Asn Val
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Gln
35 40 45

Tyr Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Asn Ser Gly Ser Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Gly Arg Gly His
85 90 95

Pro Leu Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly Gln
100 105 110

Pro Lys Ala Asn Pro Thr Val Thr Leu Phe Pro Pro
115 120

<210> 167

<211> 92

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Аминокислотная последовательность константной легкой цепи лямбда AMM01

<400> 167

Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile
1 5 10 15

Ser Asp Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser
20 25 30

Ser Pro Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser
35 40 45

Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln
50 55 60

Trp Lys Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser
65 70 75 80

Thr Val Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser

046539

85

90

<210> 168
 <211> 123
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Аминокислотная последовательность вариабельной тяжелой цепи AMM01

<400> 168

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Asp Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ile His Phe
 20 25 30

Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Trp Ile Asp Thr Asn Asn Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Ser Leu
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Gly Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Ser Thr Asp Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95

Ala Arg Ala Leu Glu Met Gly His Arg Ser Gly Phe Pro Phe Asp Tyr
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Val Leu Val Thr Val Ser Pro
 115 120

<210> 169
 <211> 422
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 Аминокислотная последовательность сигнальный пептид-легкая цепь-линкер streptag-
 вариабельная тяжелая цепь
 в hu-emAb-AMM01-AAV

<400> 169

Met Ala Thr Gly Ser Arg Thr Ser Leu Leu Leu Ala Phe Gly Leu Leu
 1 5 10 15

Cys Leu Pro Trp Leu Gln Glu Gly Ser Ala Ser Tyr Glu Leu Thr Gln
 20 25 30

Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln Arg Ala Thr Ile Thr Cys
 35 40 45

Gly Gly His Asn Ile Gly Ala Lys Asn Val His Trp Tyr Gln Gln Lys

046539

Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Trp Ile Asp Thr
 340 345 350

Asn Asn Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Ser Leu Gln Gly Arg Val Thr
 355 360 365

Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Gly Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser
 370 375 380

Leu Ser Thr Asp Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Ala Leu Glu
 385 390 395 400

Met Gly His Arg Ser Gly Phe Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Val
 405 410 415

Leu Val Thr Val Ser Pro
 420

<210> 170
 <211> 39
 <212> ДНК
 <213> Mus musculus

<400> 170
 aggaccacct ctgtgacagc atttatacag tatccgatg 39

<210> 171
 <211> 41
 <212> ДНК
 <213> Mus musculus

<400> 171
 catagggaca aagagtggag tggggcactt tctttagatt t 41

<210> 172
 <211> 409
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 Аминокислотная последовательность сигнальный пептид-легкая цепь-линкер streptag-
 переменная тяжелая цепь
 в Balb/C mRSV-сплайсинг интегрирование

<400> 172
 Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
 1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser
 20 25 30

Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser
 35 40 45

Val Gly Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Ser Thr Ser Pro Lys
 50 55 60

046539

Leu Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Gly Arg
 65 70 75 80

 Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Asn Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser
 85 90 95

 Ile Gln Ala Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Arg Gly Ser Gly
 100 105 110

 Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Ala Asp
 115 120 125

 Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr
 130 135 140

 Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys
 145 150 155 160

 Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly
 165 170 175

 Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser
 180 185 190

 Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn
 195 200 205

 Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val
 210 215 220

 Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys Gly Gly Ser Ser Gly Ser Gly Ser
 225 230 235 240

 Gly Ser Asn Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Gly Gly Gly Gly Ser
 245 250 255

 Asn Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Gly Gly Gly Gly Ser Asn Trp
 260 265 270

 Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Gly
 275 280 285

 Gly Gln Val Glu Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln Pro Ser
 290 295 300

 Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr
 305 310 315 320

 Ser Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Glu Gly Leu
 325 330 335

 Glu Trp Leu Ala Asp Ile Trp Trp Asp Asp Lys Lys Asp Tyr Asn Pro

046539

340 345 350

Ser Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Ser Asn Gln
 355 360 365

Val Phe Leu Lys Ile Thr Gly Val Asp Thr Ala Asp Thr Ala Thr Tyr
 370 375 380

Tyr Cys Ala Arg Ser Met Ile Thr Asn Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly
 385 390 395 400

Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 405

<210> 173
 <211> 41
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 173
 gtcttagtga tggctgagga atgtgtctca ggagcgggtg c 41

<210> 174
 <211> 41
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 174
 tgtaggactg caagatcgct gcacagcagc gaatcgtgaa a 41

<210> 175
 <211> 415
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 Аминокислотная последовательность сигнальный пептид-легкая цепь-линкер streptag-
 переменная тяжелая цепь
 в TT-hRSV-T7-интегрированный

<400> 175

Met Ala Thr Gly Ser Arg Thr Ser Leu Leu Leu Ala Phe Gly Leu Leu
 1 5 10 15

Cys Leu Pro Trp Leu Gln Glu Gly Ser Ala Asp Ile Gln Met Thr Gln
 20 25 30

Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr
 35 40 45

Cys Lys Cys Gln Leu Ser Val Gly Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys
 50 55 60

Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala
 65 70 75 80

Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe

046539

85 90 95

Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr
100 105 110

Cys Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
115 120 125

Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
130 135 140

Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
145 150 155 160

Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp
165 170 175

Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp
180 185 190

Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys
195 200 205

Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln
210 215 220

Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Gly
225 230 235 240

Gly Ser Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Asn Trp Ser His Pro Gln Phe
245 250 255

Glu Lys Gly Gly Gly Gly Ser Asn Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys
260 265 270

Gly Gly Gly Gly Ser Asn Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Gly Ser
275 280 285

Gly Gly Gly Gly Ser Ala Gly Gly Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly
290 295 300

Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe
305 310 315 320

Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg
325 330 335

Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu Ala Asp Ile Trp Trp Asp
340 345 350

Asp Lys Lys Asp Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser
355 360 365

046539

Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Lys Val Thr Asn Met Asp
 370 375 380

Pro Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Met Ile Thr Asn
 385 390 395 400

Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Thr Val Ser Ser
 405 410 415

<210> 176
 <211> 21
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> T2A саморасщепляющийся пептид

<400> 176

Gly Ser Gly Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp Val Glu
 1 5 10 15

Glu Asn Pro Gly Pro
 20

<210> 177
 <211> 22
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> P2A саморасщепляющийся пептид

<400> 177

Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val
 1 5 10 15

Glu Glu Asn Pro Gly Pro
 20

<210> 178
 <211> 24
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> E2A саморасщепляющийся пептид

<400> 178

Gly Ser Gly Gln Cys Thr Asn Tyr Ala Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp
 1 5 10 15

Val Glu Ser Asn Pro Gly Pro Pro
 20

<210> 179
 <211> 25
 <212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> F2A саморасщепляющийся пептид

<400> 179

Gly Ser Gly Val Lys Gln Thr Leu Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala
1 5 10 15

Gly Asp Val Glu Ser Asn Pro Gly Pro
20 25

<210> 180

<211> 3

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Gly-Ser линкер

<220>

<221> ПРОЧИЙ_ПРИЗНАК

<223> Gly-Ser линкер (GGG)n, где n= от 1 до 100

<400> 180

Gly Gly Ser
1

<210> 181

<211> 4

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Gly-Ser линкер

<220>

<221> ПРОЧИЙ_ПРИЗНАК

<223> Gly-Ser линкер (GGGS)n, где n= от 1 до 100

<400> 181

Gly Gly Gly Ser
1

<210> 182

<211> 5

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Gly-Ser линкер

<220>

<221> ПРОЧИЙ_ПРИЗНАК

<223> Gly-Ser линкер (GGGGS)n, где n= от 1 до 100

<400> 182

Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 183
 <211> 18
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> линкер

<220>
 <221> ПРОЧИЙ_ПРИЗНАК
 <223> линкер (KESGSVSSEQLAQFRSLD)n, где n= от 1 до 100

<400> 183

Lys Glu Ser Gly Ser Val Ser Ser Glu Gln Leu Ala Gln Phe Arg Ser
 1 5 10 15

Leu Asp

<210> 184
 <211> 14
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> линкер

<220>
 <221> ПРОЧИЙ_ПРИЗНАК
 <223> линкер (EGKSSGSGSESKST)n, где n= от 1 до 100

<400> 184

Glu Gly Lys Ser Ser Gly Ser Gly Ser Glu Ser Lys Ser Thr
 1 5 10

<210> 185
 <211> 19
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> примерный сигнальный пептид полученный из тяжелых цепей IgH человека

<400> 185

Met Glu Leu Gly Leu Ser Trp Ile Phe Leu Leu Ala Ile Leu Lys Gly
 1 5 10 15

Val Gln Cys

<210> 186
 <211> 19
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> примерный сигнальный пептид полученный из тяжелых цепей IgH человека

<400> 186

Met Glu Leu Gly Leu Arg Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Glu Gly
 1 5 10 15

Val Gln Cys

<210> 187

<211> 19

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> примерный сигнальный пептид полученный из тяжелых цепей IgH человека

<400> 187

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
 1 5 10 15

Val Leu Ser

<210> 188

<211> 19

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> примерный сигнальный пептид полученный из тяжелых цепей IgH человека

<400> 188

Met Asp Trp Thr Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Gly
 1 5 10 15

Ala His Ser

<210> 189

<211> 19

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> примерный сигнальный пептид полученный из тяжелых цепей IgH человека

<400> 189

Met Asp Trp Thr Trp Arg Phe Leu Phe Val Val Ala Ala Ala Thr Gly
 1 5 10 15

Val Gln Ser

<210> 190

<211> 19

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> примерный сигнальный пептид полученный из тяжелых цепей IgH человека

<400> 190

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Leu Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly
1 5 10 15

Val Gln Cys

<210> 191

<211> 19

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> примерный сигнальный пептид полученный из тяжелых цепей IgH человека

<400> 191

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Leu Phe Arg Gly
1 5 10 15

Val Gln Cys

<210> 192

<211> 26

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> примерный сигнальный пептид полученный из тяжелых цепей IgH человека

<400> 192

Met Asp Leu Leu His Lys Asn Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu
1 5 10 15

Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp Val Leu Ser
20 25

<210> 193

<211> 22

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> примерный сигнальный пептид полученный из легких цепей IgL человека

<400> 193

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Leu Ser Gly Ala Arg Cys
20

<210> 194

<211> 22

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> примерный сигнальный пептид полученный из легких цепей IgL человека

<400> 194

Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala
 1 5 10 15

Ala Gln Pro Ala Met Ala
 20

<210> 195
 <211> 8
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Strep тэг II

<400> 195

Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys
 1 5

<210> 196
 <211> 8
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Flag тэг

<400> 196

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
 1 5

<210> 197
 <211> 8
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Xpress тэг

<400> 197

Asp Leu Tyr Asp Asp Asp Asp Lys
 1 5

<210> 198
 <211> 15
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Avi тэг

<400> 198

Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Glu
 1 5 10 15

<210> 199
 <211> 26
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> кальмодулин тэг

<400> 199

Lys Arg Arg Trp Lys Lys Asn Phe Ile Ala Val Ser Ala Ala Asn Arg
 1 5 10 15

Phe Lys Lys Ile Ser Ser Ser Gly Ala Leu
 20 25

<210> 200
 <211> 9
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> HA тэг

<400> 200

Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala
 1 5

<210> 201
 <211> 10
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Мус тэг

<400> 201

Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu
 1 5 10

<210> 202
 <211> 13
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Softag 1

<400> 202

Ser Leu Ala Glu Leu Leu Asn Ala Gly Leu Gly Gly Ser
 1 5 10

<210> 203
 <211> 8
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Softag 3

<400> 203

Thr Gln Asp Pro Ser Arg Val Gly
1 5

<210> 204
<211> 14
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> V5 тэг

<400> 204

Gly Lys Pro Ile Pro Asn Pro Leu Leu Gly Leu Asp Ser Thr
1 5 10

<210> 205
<211> 106
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Аминокислотная последовательность вариабельной легкой цепи примерного
Паливизумаба мыши

<400> 205

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Gly Tyr Met
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Leu Ser Thr Ser Pro Lys Leu Gln Ile Tyr
35 40 45

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Gly Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Asn Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Ile Gln Ala Glu
65 70 75 80

Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Arg Gly Ser Gly Tyr Pro Phe Thr
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 206
<211> 106
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Аминокислотная последовательность вариабельной легкой цепи примерного
Антитела к RSV человека

<400> 206

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

046539

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Cys Gln Leu Ser Val Gly Tyr Met
 20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 35 40 45

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp
 65 70 75 80

Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Phe Thr Phe
 85 90 95

Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 207
 <211> 12
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> CDRH1 примерного антитела к RSV

<400> 207

Gly Ala Ser Ile Asn Ser Asp Asn Tyr Tyr Trp Thr
 1 5 10

<210> 208
 <211> 16
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> CDRH2 примерного антитела к RSV

<400> 208

His Ile Ser Tyr Thr Gly Asn Thr Tyr Tyr Thr Pro Ser Leu Lys Ser
 1 5 10 15

<210> 209
 <211> 15
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> CDRH3 примерного антитела к RSV

<400> 209

Cys Gly Ala Tyr Val Leu Ile Ser Asn Cys Gly Trp Phe Asp Ser
 1 5 10 15

<210> 210
 <211> 11

<212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> CDR11 примерного антитела к RSV

<400> 210

Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Thr Tyr Leu Asn
 1 5 10

<210> 211
 <211> 7
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> CDR12 примерного антитела к RSV

<400> 211

Gly Ala Ser Asn Leu Glu Thr
 1 5

<210> 212
 <211> 9
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> CDR13 примерного антитела к RSV

<400> 212

Gln Gln Tyr Gln Tyr Leu Pro Tyr Thr
 1 5

<210> 213
 <211> 8
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> CDRH1 примерного антитела 10E8 к ВИЧ

<400> 213

Gly Phe Asp Phe Asp Asn Ala Trp
 1 5

<210> 214
 <211> 10
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> CDRH2 примерного антитела 10E8 к ВИЧ

<400> 214

Ile Thr Gly Pro Gly Glu Gly Trp Ser Val
 1 5 10

<210> 215
 <211> 20

<212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> CDRH3 примерного антитела 10E8 к ВИЧ

<400> 215

Thr Gly Lys Tyr Tyr Asp Phe Trp Ser Gly Tyr Pro Pro Gly Glu Glu
 1 5 10 15

Tyr Phe Gln Asp
 20

<210> 216
 <211> 11
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> CDRL1 примерного антитела 10E8 к ВИЧ

<400> 216

Thr Gly Asp Ser Leu Arg Ser His Tyr Ala Ser
 1 5 10

<210> 217
 <211> 7
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> CDRL2 примерного антитела 10E8 к ВИЧ

<400> 217

Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser
 1 5

<210> 218
 <211> 12
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> CDRL3 примерного антитела 10E8 к ВИЧ

<400> 218

Ser Ser Arg Asp Lys Ser Gly Ser Arg Leu Ser Val
 1 5 10

<210> 219
 <211> 8
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> CDRH1 примерного антитела VRC01 к ВИЧ

<400> 219

Gly Tyr Glu Phe Ile Asp Cys Thr
 1 5

<210> 220
 <211> 8
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> CDRH2 примерного антитела VRC01 к ВИЧ

 <400> 220

Lys Pro Arg Gly Gly Ala Val Asn
 1 5

<210> 221
 <211> 14
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> CDRH3 примерного антитела VRC01 к ВИЧ

 <400> 221

Arg Gly Lys Asn Cys Asp Tyr Asn Trp Asp Phe Glu His Trp
 1 5 10

<210> 222
 <211> 5
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> CDRL3 примерного антитела VRC01 к ВИЧ

 <400> 222

Gln Gln Tyr Glu Phe
 1 5

<210> 223
 <211> 30
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> CDRH1 примерного антитела к вирусу Денге

 <400> 223

Glu Val Gln Leu His Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Val Ser Gly Phe Asn Ile Lys
 20 25 30

<210> 224
 <211> 13
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> CDRH2 примерного антитела к вирусу Денге

<400> 224

Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
1 5 10

<210> 225

<211> 31

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CDRH3 примерного антитела к вирусу Денге

<400> 225

Ala Thr Ile Lys Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Leu
1 5 10 15

Ile Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Phe
20 25 30

<210> 226

<211> 23

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CDRL1 примерного антитела к вирусу Денге

<400> 226

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Val Ser Val Gly
1 5 10 15

Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys
20

<210> 227

<211> 15

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CDRL2 примерного антитела к вирусу Денге

<400> 227

Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val Tyr
1 5 10 15

<210> 228

<211> 32

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CDRL3 примерного антитела к вирусу Денге

<400> 228

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser
1 5 10 15

046539

Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Ser Glu Asp Phe Gly Thr Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 229
<211> 9
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> CDRH1 примерного антитела к вирусу Денге

<400> 229

Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Ala Ile Thr
1 5

<210> 230
<211> 18
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> CDRH2 примерного антитела к вирусу Денге

<400> 230

Gly Leu Ile Ser Thr Tyr Tyr Gly Asp Ser Phe Tyr Asn Gln Lys Phe
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 231
<211> 10
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> CDRH3 примерного антитела к вирусу Денге

<400> 231

Thr Ile Arg Asp Gly Lys Ala Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 232
<211> 16
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> CDRL1 примерного антитела к вирусу Денге

<400> 232

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His
1 5 10 15

<210> 233
<211> 7
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CDRL2 примерного антитела к вирусу Денге

<400> 233

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
1 5

<210> 234

<211> 9

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CDRL3 примерного антитела к вирусу Денге

<400> 234

Ser Gln Ser Thr His Val Pro Tyr Thr
1 5

<210> 235

<211> 118

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Вариабельная тяжелая цепь примерного антитела к коклюшу

<400> 235

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ser Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Lys Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Asn Ile Phe Pro Gly Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asp Glu Lys Phe
50 55 60

Asn Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Thr Arg Trp Leu Ser Gly Ala Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 236

<211> 106

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

046539

<223> variable light chain of exemplary pertussis antibody

<400> 236

Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Leu Met Ser Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Phe Met
20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Arg Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr
35 40 45

Leu Thr Ser Asn Leu Pro Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser His Pro Pro Thr
85 90 95

Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 237

<211> 6

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CDRH1 примерного антитела к гепатиту С

<400> 237

Ser Tyr Gly Met His Trp
1 5

<210> 238

<211> 18

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CDRH2 примерного антитела к гепатиту С

<400> 238

Val Ile Trp Leu Asp Gly Ser Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly Arg

<210> 239

<211> 17

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CDRH3 примерного антитела к гепатиту С

<400> 239

Ala Arg Asp Ile Phe Thr Val Ala Arg Gly Val Ile Ile Tyr Phe Asp
 1 5 10 15

Tyr

<210> 240

<211> 11

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CDRL1 примерного антитела к гепатиту С

<400> 240

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
 1 5 10

<210> 241

<211> 7

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CDRL2 примерного антитела к гепатиту С

<400> 241

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
 1 5

<210> 242

<211> 8

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CDRL3 примерного антитела к гепатиту С

<400> 242

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Val Thr
 1 5

<210> 243

<211> 8

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CDRH1 примерного антитела к гриппу

<400> 243

Gly Met Thr Ser Asn Ser Leu Ala
 1 5

<210> 244

<211> 8

<212> Белок
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> CDRH2 примерного антитела к гриппу
 <400> 244

Ile Ile Pro Val Phe Glu Thr Pro
 1 5

<210> 245
 <211> 16
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> CDRH3 примерного антитела к гриппу
 <400> 245

Ala Thr Ser Ala Gly Gly Ile Val Asn Tyr Tyr Leu Ser Phe Asn Ile
 1 5 10 15

<210> 246
 <211> 6
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> CDRL1 примерного антитела к гриппу
 <400> 246

Gln Thr Ile Thr Thr Trp
 1 5

<210> 247
 <211> 9
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> CDRL3 примерного антитела к гриппу
 <400> 247

Gln Gln Tyr Ser Thr Tyr Ser Gly Thr
 1 5

<210> 248
 <211> 10
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> CDRH1 примерного антитела к EBV AMM01
 <400> 248

Tyr Thr Phe Ile His Phe Gly Ile Ser Trp
 1 5 10

<210> 249
 <211> 16

<212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> CDRH2 примерного антитела к EBV AMM01

<400> 249

Ile Asp Thr Asn Asn Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Ser Leu Gln Gly
 1 5 10 15

<210> 250
 <211> 15
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> CDRH3 примерного антитела к EBV AMM01

<400> 250

Arg Ala Leu Glu Met Gly His Arg Ser Gly Phe Pro Phe Asp Tyr
 1 5 10 15

<210> 251
 <211> 11
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> CDRL1 примерного антитела к EBV AMM01

<400> 251

Gly Gly His Asn Ile Gly Ala Lys Asn Val His
 1 5 10

<210> 252
 <211> 7
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> CDRL2 примерного антитела к EBV AMM01

<400> 252

Tyr Asp Ser Asp Arg Pro Ser
 1 5

<210> 253
 <211> 14
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> CDRL3 примерного антитела к EBV AMM01

<400> 253

Cys Gln Val Trp Asp Ser Gly Arg Gly His Pro Leu Tyr Val
 1 5 10

<210> 254
 <211> 19

<212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> начало тяжелой цепи инфликсимаба

<400> 254

Glu Val Lys Leu Glu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Met Lys

<210> 255
 <211> 18
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> начало легкой цепи инфликсимаба

<400> 255

Asp Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Val Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg

<210> 256
 <211> 6
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> CDRH1 примерного инфликсимаба

<400> 256

Ile Phe Ser Asn His Trp
 1 5

<210> 257
 <211> 10
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> CDRH2 примерного инфликсимаба

<400> 257

Arg Ser Lys Ser Ile Asn Ser Ala Thr His
 1 5 10

<210> 258
 <211> 7
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> CDRH3 примерного инфликсимаба

<400> 258

Asn Tyr Tyr Gly Ser Thr Tyr
1 5

<210> 259

<211> 7

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CDR11 примерного инфликсимаба

<400> 259

Phe Val Gly Ser Ser Ile His
1 5

<210> 260

<211> 7

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CDR12 примерного инфликсимаба

<400> 260

Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Met
1 5

<210> 261

<211> 5

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CDR13 примерного инфликсимаба

<400> 261

Gln Ser His Ser Trp
1 5

<210> 262

<211> 6

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CDRH1 примерного адалимумаба

<400> 262

Thr Phe Asp Asp Tyr Ala
1 5

<210> 263

<211> 8

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CDRH2 примерного адалимумаба

<400> 263

Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp
1 5

<210> 264

<211> 10

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CDRH3 примерного адалимумаба

<400> 264

Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu
1 5 10

<210> 265

<211> 7

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CDRL1 примерного адалимумаба

<400> 265

Gly Ile Arg Asn Tyr Leu Ala
1 5

<210> 266

<211> 7

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CDRL2 примерного адалимумаба

<400> 266

Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln
1 5

<210> 267

<211> 5

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CDRL3 примерного адалимумаба

<400> 267

Arg Tyr Asn Arg Ala
1 5

<210> 268

<211> 6

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CDRH1 примерного цертолизумаба

<400> 268

Val Phe Thr Asp Tyr Gly
1 5

<210> 269

<211> 8

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CDRH2 примерного цертолизумаба

<400> 269

Asn Thr Tyr Ile Gly Glu Pro Ile
1 5

<210> 270

<211> 7

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CDRH3 примерного цертолизумаба

<400> 270

Gly Tyr Arg Ser Tyr Ala Met
1 5

<210> 271

<211> 7

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CDRL1 примерного цертолизумаба

<400> 271

Asn Val Gly Thr Asn Val Ala
1 5

<210> 272

<211> 7

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CDRL2 примерного цертолизумаба

<400> 272

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr
1 5

<210> 273

<211> 5

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CDRL3 примерного цертолизумаба

<400> 273

Gln Tyr Asn Ile Tyr
1 5

<210> 274

<211> 20

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> прямой олигонуклеотид мыши для амплификации региона фланкирующего сайт раз-
реза

<400> 274

ggctccacca gacctctcta 20

<210> 275

<211> 20

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> обратный олигонуклеотид мыши для амплификации региона фланкирующего сайт
разреза

<400> 275

aacctcagtc accgtctcct 20

<210> 276

<211> 21

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> прямой олигонуклеотид человека для амплификации региона фланкирующего сайт
разреза

<400> 276

acagtaagca tgcctcctaa g 21

<210> 277

<211> 20

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> обратный олигонуклеотид человека для амплификации региона фланкирующего сайт
разреза

<400> 277

gccactctag ggcctttggt 20

<210> 278

<211> 65

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> прямой праймер мыши для амплификации шаблона анти-RSV-emAb

<400> 278

accacctctg tgacagcatt tatacagtat ccgatggaca agtgagtgtc tcaggtagg 60

attct 65

accaagctgg aatcaaggc cgatgccgct cctaccgtgt ctatctttcc acctagcagc 360
 gagcagctga catctggcgg agcctctgtc gtgtgcttcc tgaacaactt ctaccctaag 420
 gacatcaacg tcaagtggaa gatcgacggc tccgagagac agaacggcgt gctgaactct 480
 tggaccgacc aggacagcaa ggatagcacc tacagcatga gcagcactct gaccctgaca 540
 aaggacgagt acgagaggca caactcctac acatgcgagg ccacacacaa gaccagcaca 600
 tccccaatcg tgaagtcctt caaccggaac gagtgc 636

<210> 282
 <211> 630
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 < 223 Кодирующая последовательность легкой цепи VRC01 без сигнальной последовательности в
 Hu-emAb-VRC01-AAV

<400> 282
 gaaattgtgt tgacacagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aacagccatc 60
 atctcttgtc ggaccagtca gtatggttcc ttagcctggg atcaacagag gcccgccag 120
 gccccaggc tcgtcatcta ttcgggctct actcgggccg ctggcatccc agacaggttc 180
 agcggcagtc ggtgggggcc agactacaat ctccatca gcaacctgga gtcgggagat 240
 tttggtgttt attattgcca gcagtatgaa tttttggcc aggggaccaa ggtccaggtc 300
 gacattaagc gcaactgtggc cgctcctagc gtgttcatct ttccacctag cgacgagcag 360
 ctgaagtctg gcaactgcctc tgtcgtgtgc ctgctgaaca acttctacce tcgagaggcc 420
 aaggtgcagt ggaaagtgga caatgccctg cagagcggca acagccaaga gtctgtgacc 480
 gagcaggact ccaaggattc cacctacagc ctgtctagca cctgactct gagcaaggcc 540
 gactacgaga agcacaaggt gtacgcctgc gaagtgacac accagggact gagcagccct 600
 gtgaccaaga gcttcaatcg gggcgagtgc 630

<210> 283
 <211> 630
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 < 223 Кодирующая последовательность легкой цепи Medi8852 без сигнальной последовательности в
 hu-emAb-Medi8852-AAV

<400> 283
 gatattcaga tgaccagag cccttccagc ctgtccgctt cagtggggga tcgagtgacc 60
 attacctgcc gaaccagcca gagcctgagc tcctacacgc actggtatca gcagaagccc 120
 ggcaaagccc ctaagctgct gatctacgcc gcttctagtc gggggtccgg agtgccaagc 180
 cggttctccg gatctgggag tggaaccgac tttacctga caatttcaag cctgcagccc 240
 gaggatttcg ctacatacta ctgtcagcag agcagaactt tcgggcaggg cactaagggtg 300
 gagatcaaac ggactgtggc cgctcctagc gtgttcatct ttccacctag cgacgagcag 360

ctgaagtctg gcaactgcctc tgtcgtgtgc ctgctgaaca acttctaccc tcgagaggcc 420
aaggtgcagt ggaaagtgga caatgcctg cagagcggca acagccaaga gtctgtgacc 480
gagcaggact ccaaggattc cacctacagc ctgtctagca cctgactct gagcaaggcc 540
gactacgaga agcacaaggt gtacgcctgc gaagtgacac accagggact gagcagcct 600
gtgaccaaga gcttcaatcg gggcgagtgc 630

<210> 284
<211> 648
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
< 223 Кодирующая последовательность легкой цепи AMM01 без сигнальной последовательности в
hu-emAb-AMM01-AAV

<400> 284
tcctatgagc tgactcagcc accctcagtg tcagtggccc cggggcagag ggccacaatt 60
acctgtgggg gacacaacat cggagctaaa aatgtccact ggtaccagca gaagccaggc 120
caggcccctg tcctggatcat ccaatatgat agcgaccggc cctcagggat cctgagcga 180
ttctctggct ccaactctgg gagcacggcc accctgacca tcagcagggt cgaagccggg 240
gatgaggccg actattactg tcaggtgtgg gatagtggtc gtgggcatcc cttttatgtc 300
ttcggaggtg ggaccaaggt caccgtccta ggtcagccca aggccaacc cactgtcact 360
ctgttcccac cctcgagtga ggagcttcaa gccaacaagg ccacactggg gtgtctcata 420
agtgacttct acccgggagc cgtgacagtg gcttgggaagg cagatagcag ccccgtaag 480
gcgggagtgg agaccaccac accctccaaa caaagcaaca acaagtacgc ggccagcagc 540
tacctgagcc tgacgcctga gcagtggaag tcccacagaa gctacagctg ccaggtcacg 600
catgaagggg gcaccgtgga gaagacagtg gccctacag aatgttca 648

<210> 285
<211> 213
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Аминокислотная последовательность легкой цепи hRSV без сигнальной последовательности в
анти-RSV emAb AAV человека

<400> 285
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Cys Gln Leu Ser Val Gly Tyr Met
20 25 30
His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
35 40 45

046539

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp
65 70 75 80

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Phe Thr
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
100 105 110

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
130 135 140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
145 150 155 160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
165 170 175

Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
180 185 190

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
195 200 205

Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 286

<211> 212

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Аминокислотная последовательность легкой цепи каппа mRSV без сигнальной по-
следовательности в
анти-RSV emAb AAV МЫШИ

<400> 286

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Gly Tyr Met
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Ser Thr Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr
35 40 45

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Gly Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Asn Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Ile Gln Ala Glu
65 70 75 80

Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Arg Gly Ser Gly Tyr Pro Phe Thr
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Ala Asp Ala Ala Pro Thr
100 105 110

Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala
115 120 125

Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val
130 135 140

Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser
145 150 155 160

Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr
165 170 175

Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys
180 185 190

Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn
195 200 205

Arg Asn Glu Cys
210

<210> 287

<211> 210

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Аминокислотная последовательность легкой цепи VRC01 без сигнальной последовательности в
Hu-emAb-VRC01-AAV

<400> 287

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Thr Ala Ile Ile Ser Cys Arg Thr Ser Gln Tyr Gly Ser Leu Ala
20 25 30

Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Val Ile Tyr Ser
35 40 45

Gly Ser Thr Arg Ala Ala Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Arg
50 55 60

046539

Trp Gly Pro Asp Tyr Asn Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Ser Gly Asp
65 70 75 80

Phe Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Glu Phe Phe Gly Gln Gly Thr
85 90 95

Lys Val Gln Val Asp Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe
100 105 110

Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val
115 120 125

Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp
130 135 140

Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr
145 150 155 160

Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr
165 170 175

Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val
180 185 190

Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly
195 200 205

Glu Cys
210

<210> 288

<211> 210

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Аминокислотная последовательность легкой цепи Medi8852 без сигнальной последовательности в

hu-emAb-Medi8852-AAV

<400> 288

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Gln Ser Leu Ser Ser Tyr
20 25 30

Thr His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Arg Gly Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

046539

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Arg Thr Phe Gly Gln
85 90 95

Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe
100 105 110

Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val
115 120 125

Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp
130 135 140

Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr
145 150 155 160

Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr
165 170 175

Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val
180 185 190

Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly
195 200 205

Glu Cys
210

<210> 289

<211> 216

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Аминокислотная последовательность легкой цепи AMM01 без сигнальной последовательности в

hu-emAb-AMM01-AAV

<400> 289

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln
1 5 10 15

Arg Ala Thr Ile Thr Cys Gly Gly His Asn Ile Gly Ala Lys Asn Val
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Gln
35 40 45

Tyr Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Asn Ser Gly Ser Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly
65 70 75 80

046539

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Gly Arg Gly His
85 90 95

Pro Leu Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly Gln
100 105 110

Pro Lys Ala Asn Pro Thr Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu
115 120 125

Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr
130 135 140

Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys
145 150 155 160

Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr
165 170 175

Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His
180 185 190

Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys
195 200 205

Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
210 215

<210> 290
<211> 20
<212> РНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Человек_1_нРНК_1 с Фиг. 11В

<400> 290
ggussucggg gcaugucssg 20

<210> 291
<211> 20
<212> РНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Человек_1_нРНК_2 с Фиг. 11В

<400> 291
gggcauguc cgaugggacc 20

<210> 292
<211> 20
<212> РНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Человек_1_нРНК_4 с Фиг. 11В

<400> 292
ucssucgggc augucssgag 20

<210> 293
 <211> 20
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Человек_1_нРНК_5 с Фиг. 11В

 <400> 293
 ggsaiguiss gaggggassu 20

<210> 294
 <211> 20
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Человек_1_нРНК_7 с Фиг. 11В

 <400> 294
 agsaugsgag guugguissu 20

<210> 295
 <211> 20
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Человек_1_нРНК_8 с Фиг. 11В

 <400> 295
 ssgggsgga sigdssagga 20

<210> 296
 <211> 20
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Человек_1_нРНК_9 с Фиг. 11В

 <400> 296
 asugggguigc suigaggauc 20

<210> 297
 <211> 20
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Человек_1_нРНК_10 с Фиг. 11В

 <400> 297
 ssssaugss saucsssu 20

<210> 298
 <211> 20
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Человек_1_нРНК_11 с Фиг. 11В

<400> 298
 сиаагасссс ugguuuguis 20

<210> 299
 <211> 20
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Человек_1_нРНК_12 с Фиг. 11В

<400> 299
 ugugauuuu ссаугссии 20

<210> 300
 <211> 20
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Человек_1_нРНК_13 с Фиг. 11В

<400> 300
 агдассаасс угсааугсис 20

<210> 301
 <211> 20
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Человек_1_нРНК_14 с Фиг. 11В

<400> 301
 сисаггуиугг гугсгисига 20

<210> 302
 <211> 20
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Человек_1_нРНК_15

<400> 302
 сссиссиггс сагиссгссс 20

<210> 303
 <211> 20
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Человек_1_нРНК_16 с Фиг. 11В

<400> 303
 гдссаггагг ггауцггсас 20

<210> 304
 <211> 20
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Человек_1_нРНК_17

<400> 304
 гагаугссиг аасааассаг 20

<210> 305
 <211> 20
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Человек_1_нРНК_18 с Фиг. 11В

<400> 305
 агггггисииа гигауггсиг 20

<210> 306
 <211> 20
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Человек_1_нРНК_19 с Фиг. 11В

<400> 306
 аугггсасиг гдгигссииг 20

<210> 307
 <211> 20
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Человек_1_нРНК_20 с Фиг. 11В

<400> 307
 ииссгаугсс ииуггаааи 20

<210> 308
 <211> 20
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Человек_2_нРНК_1 с Фиг. 12В

<400> 308
 сигасгссгс аусггигаии 20

<210> 309
 <211> 20
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Человек_2_нРНК_2 с Фиг. 12В

<400> 309
 иагасаагг гсгаугссаг 20

<210> 310
 <211> 20
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Человек_2_нРНК_3 с Фиг. 12В

 <400> 310
 сgucсgасси сиссиусааа 20

<210> 311
 <211> 20
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Человек_2_нРНК_4 с Фиг. 12В

 <400> 311
 агсаиаусии сгсассааг 20

<210> 312
 <211> 20
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Человек_2_нРНК_5 с Фиг. 12В

 <400> 312
 аиаишссасс саgиаgиgг 20

<210> 313
 <211> 20
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Человек_2_нРНК_6 с Фиг. 12В

 <400> 313
 gиgсgассис иссиусаааи 20

<210> 314
 <211> 20
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Человек_2_нРНК_7 с Фиг. 12В

 <400> 314
 аггисссии гсисиагааг 20

<210> 315
 <211> 20
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Человек_2_нРНК_8 с Фиг. 12В

 <400> 315
 сисиагааа саgисаусаи 20

<210> 316
 <211> 20

<212> РНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Человек_2_нРНК_9 с Фиг. 12В

 <400> 316
 uugucuaagu caucgасиги 20

<210> 317
 <211> 20
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Человек_2_нРНК_10 с Фиг. 12В

 <400> 317
 ссааагсгаи uiaucguaaa 20

<210> 318
 <211> 20
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Человек_2_нРНК_11 с Фиг. 12В

 <400> 318
 ucuuuцгаи гассaucигс 20

<210> 319
 <211> 20
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Человек_2_нРНК_12 с Фиг. 12В

 <400> 319
 ссаицасса uаааисгси 20

<210> 320
 <211> 20
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Человек_2_нРНК_13 с Фиг. 12В

 <400> 320
 agggсгаигс саиugggгси 20

<210> 321
 <211> 20
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Человек_2_нРНК_14 с Фиг. 12В

 <400> 321
 агсuaаагсс аиссacаигс 20

<210> 322
 <211> 20
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Человек_2_нРНК_15 с Фиг. 12В

 <400> 322
 ссасаассис uгааицgggга 20

<210> 323
 <211> 20
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Человек_2_нРНК_16 с Фиг. 12В

 <400> 323
 ииааицгси гаицаагагс 20

<210> 324
 <211> 20
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Человек_2_нРНК_17 с Фиг. 12В

 <400> 324
 иагасааggg сгаицссаги 20

<210> 325
 <211> 20
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Человек_2_нРНК_18 с Фиг. 12В

 <400> 325
 аагсигасси агасиаааса 20

<210> 326
 <211> 20
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Человек_2_нРНК_19 с Фиг. 12В

 <400> 326
 гсаггаассс ггсааицага 20

<210> 327
 <211> 20
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Человек_2_нРНК_20 с Фиг. 12В

 <400> 327
 исигииссга аисассгаиц 20

<210> 328
 <211> 20
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Мышь_1_нРНК_1 с Фиг. 13В

 <400> 328
 саасиассси иицагаассг 20

<210> 329
 <211> 20
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Мышь_1_нРНК_3 с Фиг. 13В

 <400> 329
 иаиасагаиа ссгаиусаиа 20

<210> 330
 <211> 20
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Мышь_1_нРНК_4 с Фиг. 13В

 <400> 330
 саусиагссси сгдисусааа 20

<210> 331
 <211> 20
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Мышь_1_нРНК_5 с Фиг. 13В

 <400> 331
 сасисиииги сссиаигсаи 20

<210> 332
 <211> 20
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Мышь_1_нРНК_6 с Фиг. 13В

 <400> 332
 аусиагссси сгдисусаааа 20

<210> 333
 <211> 20
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Мышь_1_нРНК_7 с Фиг. 13В

<400> 333
 аагуишцааа сааусиагу 20

<210> 334
 <211> 20
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Мышь_1_нРНК_8 с Фиг. 13В

<400> 334
 аагаугсиаа аасаауссиа 20

<210> 335
 <211> 20
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Мышь_1_нРНК_9 с Фиг. 13В

<400> 335
 угсиааааса ауссиауггс 20

<210> 336
 <211> 20
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Мышь_1_нРНК_10 с Фиг. 13В

<400> 336
 аагисссиаи сссаусаисс 20

<210> 337
 <211> 20
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Мышь_1_нРНК_11 с Фиг. 13В

<400> 337
 гдгагаааагг саусиагсси 20

<210> 338
 <211> 20
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Мышь_1_нРНК_12 с Фиг. 13В

<400> 338
 угагсауигс агасиаауси 20

<210> 339
 <211> 20
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Мышь_1_нРНК_13 с Фиг. 13В
 <400> 339
 uuaquququg aaauuasiuc 20

<210> 340
 <211> 20
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Мышь_1_нРНК_14 с Фиг. 13В
 <400> 340
 ugquququguc cuquququau 20

<210> 341
 <211> 20
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Мышь_1_нРНК_15 с Фиг. 13В
 <400> 341
 ququququauaa ucquququaa 20

<210> 342
 <211> 20
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Мышь_1_нРНК_16 с Фиг. 13В
 <400> 342
 ququququauuc cuquququaa 20

<210> 343
 <211> 20
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Мышь_1_нРНК_17 с Фиг. 13В
 <400> 343
 auquququaua uuququququ 20

<210> 344
 <211> 20
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Мышь_1_нРНК_18 с Фиг. 13В
 <400> 344
 ququququququ quququququ 20

<210> 345
 <211> 20
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Мышь_1_нРНК_19 с Фиг. 13В

 <400> 345
 саgгуааgаа ugсссисссс 20

 <210> 346
 <211> 20
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Мышь_1_нРНК_20 с Фиг. 13В

 <400> 346
 иссиссаgсс gссссссиса 20

 <210> 347
 <211> 20
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Мышь_2_нРНК_1 с Фиг. 14В

 <400> 347
 ссgааассаg гсассгсааа 20

 <210> 348
 <211> 20
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Мышь_2_нРНК_2 с Фиг. 14В

 <400> 348
 сассгсаааи gгуааgссаg 20

 <210> 349
 <211> 20
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Мышь_2_нРНК_3 с Фиг. 14В

 <400> 349
 gгссиаассаи иигсггигсс 20

 <210> 350
 <211> 20
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Мышь_2_нРНК_4 с Фиг. 14В

 <400> 350
 игсггигссси gгуишсггаg 20

 <210> 351
 <211> 20

<212> РНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Мышь_2_нРНК_5 с Фиг. 14В
 <400> 351
 сагсааугси асгсиуигиу 20

<210> 352
 <211> 20
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Мышь_2_нРНК_6 с Фиг. 14В
 <400> 352
 аагдасагиг сииагауиссг 20

<210> 353
 <211> 20
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Мышь_2_нРНК_7 с Фиг. 14В
 <400> 353
 усагисагис агигасгига 20

<210> 354
 <211> 20
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Мышь_2_нРНК_8 с Фиг. 14В
 <400> 354
 саугсиггиу гдиггиуаг 20

<210> 355
 <211> 20
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Мышь_2_нРНК_9 с Фиг. 14В
 <400> 355
 усиииагаи асггиуигиу 20

<210> 356
 <211> 20
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Мышь_2_нРНК_10 с Фиг. 14В
 <400> 356
 уггсссаиис аасааиаагс 20

<210> 357
 <211> 20
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Мышь_2_нРНК_11 с Фиг. 14В

 <400> 357
 sigggccgcu aagcuaaaacu 20

<210> 358
 <211> 20
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Мышь_2_нРНК_12 с Фиг. 14В

 <400> 358
 gssagccuag uuuaгcuuag 20

<210> 359
 <211> 20
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Мышь_2_нРНК_13 с Фиг. 14В

 <400> 359
 ugaauagac uгуааугаас 20

<210> 360
 <211> 20
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Мышь_2_нРНК_14 с Фиг. 14В

 <400> 360
 gaccggaa uгуаугуиug 20

<210> 361
 <211> 20
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Мышь_2_нРНК_15 с Фиг. 14В

 <400> 361
 gгуауггаиa ccгaгаagga 20

<210> 362
 <211> 20
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Мышь_2_нРНК_16 с Фиг. 14В

 <400> 362
 гуагагсс cuагуагсg 20

<210> 363
 <211> 20
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Мышь_2_нРНК_17 с Фиг. 14В

<400> 363
 gssgcuaaagc uaaacuaggc 20

<210> 364
 <211> 20
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Мышь_2_нРНК_18 с Фиг. 14В

<400> 364
 ucaucsuaugc uacgcuugcu 20

<210> 365
 <211> 20
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Мышь_2_нРНК_19 с Фиг. 14В

<400> 365
 uuuuaagagcc ucgcuuacua 20

<210> 366
 <211> 20
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Мышь_2_нРНК_20 с Фиг. 14В

<400> 366
 cucsuaugaau auugguuaac 20

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения методом генетической инженерии В-клеток для экспрессии выбранного анти-тела, включающий доставку в В-клетки агента для редактирования генов, который разрезает геномную область в В-клетках, предназначенную для вставки генетической конструкции; и генетической конструкции, содержащей от 5' к 3':
- (i) нуклеотидную последовательность промотора тяжелой цепи;
 - (ii) нуклеотидную последовательность, кодирующую сигнальный пептид;
 - (iii) нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь выбранного антигена;
 - (iv) нуклеотидную последовательность, кодирующую гибкий линкер или саморасщепляющийся пептид, или нуклеотидную последовательность саморасщепляющегося пептида или внутреннего участка посадки рибосомы (IRES);
 - (v) нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область тяжелой цепи выбранного антигена; и
 - (vi) нуклеотидную последовательность, содержащую границу сплайсинга, где геномная область содержит последовательность, представленную в:

- (A) SEQ ID NO: 1;
- (B) SEQ ID NO: 2;
- (C) SEQ ID NO: 3; или
- (D) SEQ ID NO: 4,

и где генетическую конструкцию вставляют в геномную область (A), (B), (C) или (D) после разрезания агентом для редактирования генов, тем самым генетически модифицируя В-клетки для экспрессии выбранного антитела.

2. Способ по п.1, в котором эндогенный геном В-клеток, кодирующий вариабельную область тяжелой цепи, не вырезается во время генетической модификации.

3. Способ по п.1, в котором агент для редактирования генов содержит нуклеазу, ассоциированную с направляющей РНК (нРНК), имеющей последовательность, представленную в

SEQ ID NO: 88, 89, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 305, 306, или 307, когда геномная область представляет собой (A);

SEQ ID NO: 308, 309, 310, 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325, 326, или 327, когда геномная область представляет собой (B);

SEQ ID NO: 87, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 336, 337, 338, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, или 346, когда геномная область представляет собой (C); или

SEQ ID NO: 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364, 365, или 366, когда геномная область представляет собой (D).

4. Способ по п.1, в котором доставка осуществляется посредством электропорирования, наночастицы или вирус-опосредованной доставки.

5. Способ по п.3, в котором нРНК и нуклеаза доставляются посредством электропорирования, а генетическая конструкция доставляется как часть вирусного вектора на основе аденоассоциированного вируса.

6. Способ по п.3, в котором нуклеаза представляет собой Cas9 или Cpf1.7.

7. Способ по п.1, в котором промотор тяжелой цепи имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 111, когда геномная область представляет собой (A) или (B); или

имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 128, когда геномная область представляет собой (C) или (D).

8. Способ по п.1, в котором сигнальный пептид

получен из тяжелой цепи человеческого IgH и имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191 или 192;

получен из легкой цепи человеческого IgL и имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 193 или 194;

имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 118, когда геномная область представляет собой (A) или (B); или

имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 134, когда геномная область представляет собой (C) или (D).

9. Способ по п.1, в котором гибкий линкер

кодируется нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 116;

имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 122, 180, 181, 182, 183 или 184; и/или

представляет собой линкер Gly-Ser, содержащий 50-80 аминокислот.

10. Способ по п.1, в котором саморасщепляющийся пептид имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 176, 177, 178 или 179.

11. Способ по п.1, в котором нуклеотидная последовательность, содержащая границу сплайсинга, представлена в SEQ ID NO: 124 или 151, когда геномная область представляет собой (A) или (B); или представлена в SEQ ID NO: 139, когда геномная область представляет собой (C) или (D).

12. Способ по п.1, в котором генетическая конструкция кодирует тэг, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO: 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203 или 204.

13. Способ по п.1, в котором генетическая конструкция является частью вирусного вектора на основе аденоассоциированного вируса.

14. Способ по п.13, в котором

геномная область (A) содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 109; или

геномная область (C) содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 108

после вставки генетической конструкции.

15. Способ по п.1, в котором выбранное антитело содержит

антитело к респираторно-синцитиальному вирусу (РСВ), содержащее

(а) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 138, и вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 136;

(b) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 138, и вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 205;

(c) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 123, и вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 120; или

(d) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 123, и вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 206;

антитело к вирусу иммунодефицита человека (ВИЧ), содержащее вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 150, и вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 149;

антитело к вирусу коклюша, содержащее вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 235, и вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 236;

антитело против вируса гриппа, содержащее вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 159, и вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 158;

антитело против вируса Эпштейна-Барра (ВЭБ), содержащее вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 168, и вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 166; или

антитело против фактора некроза опухоли (ФНО), содержащее вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 254, и вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 255.

16. Способ по п.1, в котором выбранное антитело содержит

CDRH1, содержащую SEQ ID NO: 207, CDRH2, содержащую SEQ ID NO: 208, CDRH3, содержащую SEQ ID NO: 209; CDRL1, содержащую SEQ ID NO: 210, CDRL2, содержащую SEQ ID NO: 211, и CDRL3, содержащую SEQ ID NO: 212;

CDRH1, содержащую SEQ ID NO: 213, CDRH2, содержащую SEQ ID NO: 214, CDRH3, содержащую SEQ ID NO: 215, CDRL1, содержащую SEQ ID NO: 216, CDRL2, содержащую SEQ ID NO: 217, и CDRL3, содержащую SEQ ID NO: 218;

CDRH1, содержащую SEQ ID NO: 219, CDRH2, содержащую SEQ ID NO: 220, CDRH3, содержащую SEQ ID NO: 221, CDRL1, содержащую QYGS, CDRL2, содержащую SGS, и CDRL3, содержащую SEQ ID NO: 222;

CDRH1, содержащую SEQ ID NO: 223, CDRH2, содержащую SEQ ID NO: 224, CDRH3, содержащую SEQ ID NO: 225; CDRL1, содержащую SEQ ID NO: 226, CDRL2, содержащую SEQ ID NO: 227, и CDRL3, содержащую SEQ ID NO: 228;

CDRH1, содержащую SEQ ID NO: 229, CDRH2, содержащую SEQ ID NO: 230, CDRH3, содержащую SEQ ID NO: 231, CDRL1, содержащую SEQ ID NO: 232, CDRL2, содержащую SEQ ID NO: 233, и CDRL3, содержащую SEQ ID NO: 234;

CDRH1, содержащую SEQ ID NO: 237, CDRH2, содержащую SEQ ID NO: 238, CDRH3, содержащую SEQ ID NO: 239, CDRL1, содержащую SEQ ID NO: 240, CDRL2, содержащую SEQ ID NO: 241, и CDRL3, содержащую SEQ ID NO: 242;

CDRH1, содержащую SEQ ID NO: 243, CDRH2, содержащую SEQ ID NO: 244, CDRH3, содержащую SEQ ID NO: 245, CDRL1, содержащую SEQ ID NO: 246, CDRL2, содержащую KTS, и CDRL3, содержащую SEQ ID NO: 247,

CDRH1, содержащую SEQ ID NO: 248, CDRH2, содержащую SEQ ID NO: 249, CDRH3, содержащую SEQ ID NO: 250, CDRL1, содержащую SEQ ID NO: 251, CDRL2, содержащую SEQ ID NO: 252, и CDRL3, содержащую SEQ ID NO: 253.

CDRH1, содержащую SEQ ID NO: 256, CDRH2, содержащую SEQ ID NO: 257, и CDRH3, содержащую SEQ ID NO: 258; CDRL1, содержащую SEQ ID NO: 259, CDRL2, содержащую SEQ ID NO: 260, и CDRL3, содержащую SEQ ID NO: 261;

CDRH1, содержащую SEQ ID NO: 262, CDRH2, содержащую SEQ ID NO: 263, и CDRH3, содержащую SEQ ID NO: 264; CDRL1, содержащую SEQ ID NO: 265, CDRL2, содержащую SEQ ID NO: 266, и CDRL3, содержащую SEQ ID NO: 267; или

CDRH1, содержащую SEQ ID NO: 268, CDRH2, содержащую SEQ ID NO: 269, и CDRH3, содержащую SEQ ID NO: 270; или CDRL1, содержащую SEQ ID NO: 271, CDRL2, содержащую SEQ ID NO: 272, и CDRL3, содержащую SEQ ID NO: 273.

17. Способ по п.1, в котором выбранное антитело представляет собой антитело к респираторно-

синцитиальному вирусу (PCB), антитело к вирусу иммунодефицита человека (ВИЧ), антитело к вирусу Денге, антитело к Bordetella pertussis, антитело к вирусу гепатита С, антитело к вирусу гриппа, антитело к вирусу парагриппа, антитело к метапневмовирусу (МПВ), антитело к цитомегаловирусу, антитело к вирусу Эпштейна-Барра; антитело к вирусу простого герпеса, антитело к бактериальному токсину Clostridium difficile или антитело к фактору некроза опухоли (ФНО).

18. Способ по п.1, в котором выбранное антитело содержит антитело к PCB, выбранное из паливизумаба, AB1128 и ab20745; антитело к ВИЧ, выбранное из 10E8, VRC01, ab18633 и 39/5.4A; антитело к вирусу Денге, выбранное из антитела 55 с CDRH1 (SEQ ID NO: 223), CDRH2 (SEQ ID NO: 224) и CDRH3 (SEQ ID NO: 225) и CDRL1 (SEQ ID NO: 226), CDRL2 (SEQ ID NO: 227) и CDRL3 (SEQ ID NO: 228); DB2-3 с CDRH1 (SEQ ID NO: 229), CDRH2 (SEQ ID NO: 230) и CDRH3 (SEQ ID NO: 231) и CDRL1 (SEQ ID NO: 232), CDRL2 (SEQ ID NO: 233) и CDRL3 (SEQ ID NO: 234); ab155042; и ab80914;

антитело к вирусу гепатита С, выбранное из MAB8694 и C7-50;

антитело к вирусу гриппа, содержащее C102;

антитело к МПВ, включающее MPE8;

антитело к ЦМВ, выбранное из MCMV5322A, MCMV3068A, LJP538 и LJP539;

антитело к ВПГ, включающее HSV8-N;

антитело к Clostridium difficile, выбранное из актоксумаба и безлотоксумаба; или

антитело к ФНО, выбранное из инфликсимаба, адалимумаба, этанерцепта и цертолизумаба.

19. Способ по п.1, в котором генетическая конструкция содержит 5'-гомологичное плечо промотора тяжелой цепи и 3'-гомологичное плечо границы сплайсинга.

20. Способ по п.19, в котором генетическая конструкция содержит нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 102, содержащую кодирующую последовательность, кодирующую антитело к PCB, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 126;

нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 103, содержащую кодирующую последовательность, кодирующую антитело к PCB, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 141;

нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 104, содержащую кодирующую последовательность, кодирующую антитело к PCB, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 141;

нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 105, содержащую кодирующую последовательность, кодирующую антитело к ВИЧ, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 152;

нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 106, содержащую кодирующую последовательность, кодирующую антитело к вирусу гриппа, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 160;

нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 107, содержащую кодирующую последовательность, кодирующую антитело к ВЭБ, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 169.

21. Способ по п.19, в котором

когда геномная область представляет собой (A),

5'-гомологичное плечо представлено в SEQ ID NO: 110 или 153, а 3'-гомологичное плечо представлено в SEQ ID NO: 125;

5'-гомологичное плечо представлено в SEQ ID NO: 92, а 3'-гомологичное плечо представлено в SEQ ID NO: 93; или

5'-гомологичное плечо представлено в SEQ ID NO: 94, а 3'-гомологичное плечо представлено в SEQ ID NO: 95 или

когда геномная область представляет собой (C),

5'-гомологичное плечо представлено в SEQ ID NO: 127, а 3'-гомологичное плечо представлено в SEQ ID NO: 140;

5'-гомологичное плечо представлено в SEQ ID NO: 90, а 3'-гомологичное плечо представлено в SEQ ID NO: 91; или

5'-гомологичное плечо представлено в SEQ ID NO: 142, а 3'-гомологичное плечо представлено в SEQ ID NO: 143.

22. Способ по п.19, в котором

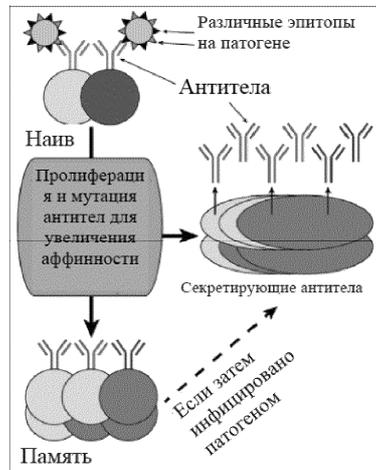
когда геномная область содержит (A), генетическая конструкция содержит:

(i) 5'-последовательность гомологичного плеча, представленную в SEQ ID NO: 110;

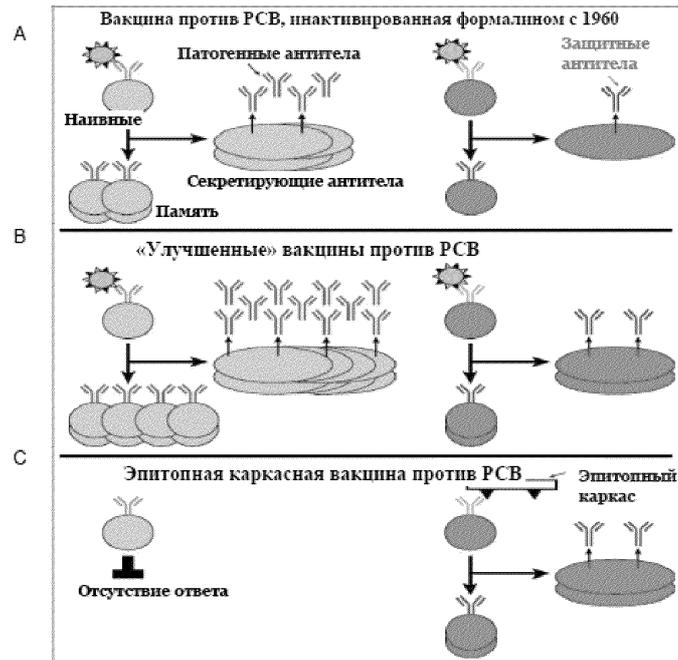
(ii) промотор тяжелой цепи, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO: 111;

(iii) кодирующую последовательность, кодирующую сигнальный пептид, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 118;

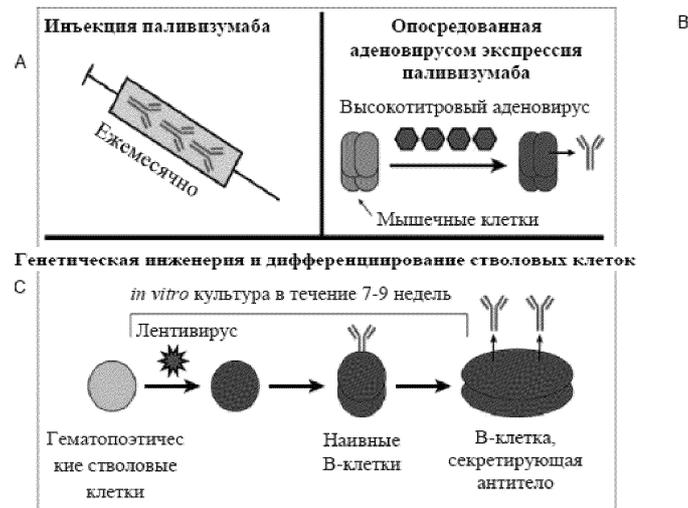
- (ii) промотор тяжелой цепи, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO: 128;
- (iii) кодирующую последовательность, кодирующую сигнальный пептид, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 134;
- (iv) кодирующую последовательность, кодирующую легкую цепь выбранного антитела, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 286;
- (v) кодирующую последовательность, кодирующую гибкий линкер, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 122;
- (vi) кодирующую последовательность, кодирующую вариабельную область тяжелой цепи выбранного антитела, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 138;
- (vii) границу сплайсинга, имеющую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 139; и
- (viii) 3'-последовательность гомологичного плеча, представленную в SEQ ID NO: 143.
23. Способ по п.1, в котором В-клетка представляет собой В-клетку, вырабатывающую антитело, В-клетку памяти, наивную В-клетку, В1 В-клетку или В-клетку маргинальной зоны.
24. В-клетка, модифицированная по способу по любому из пп.1-23.
25. В-клетка по п.24, где В-клетка представляет собой В-клетку, секретирующую антитело, В-клетку памяти, наивную В-клетку, В1 В-клетку или В-клетку маргинальной зоны.
26. Способ обеспечения противоинфекционного эффекта у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества В-клетки по п.24, обеспечивая тем самым противоинфекционный эффект.
27. Способ по п.26, в котором предоставленная возможность устраняет необходимость в вакцинации.
28. Способ по п.26, в котором введение заменяет протокол вакцинации.
29. Способ по п.26, в котором субъект представляет собой иммуносупрессированный субъект.
30. Способ по п.26, в котором иммуносупрессия у субъекта является частью схемы лечения, включающей трансплантацию костного мозга, трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток или введение генетически модифицированных гемопоэтических стволовых клеток.
31. Способ обеспечения противовоспалительного эффекта у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества В-клеток по п.24, обеспечивая тем самым противовоспалительный эффект.



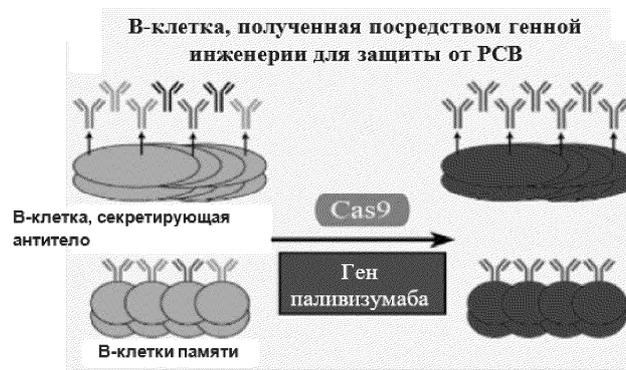
Фиг. 1



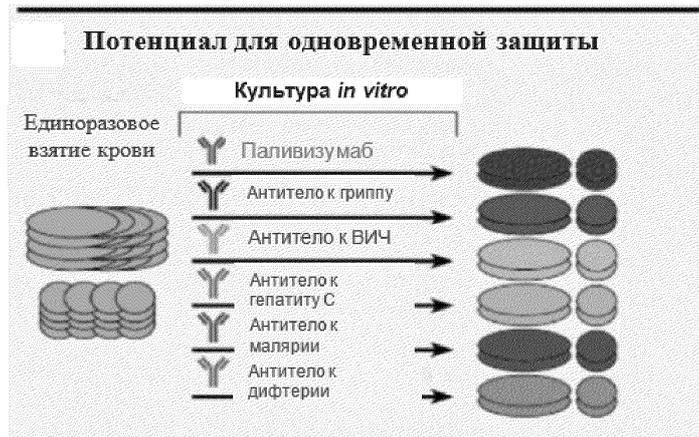
Фиг. 2А-С



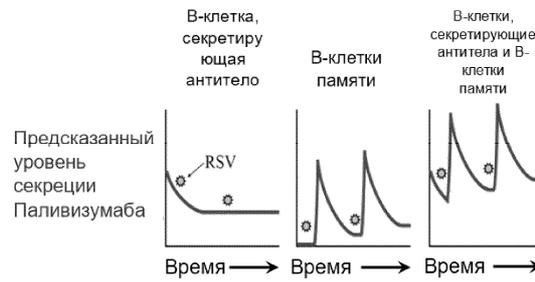
Фиг. 3А-С



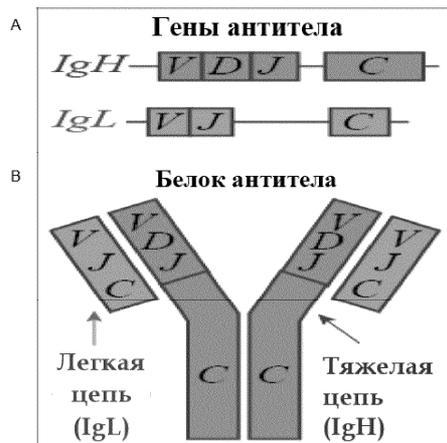
Фиг. 4А



Фиг. 4В



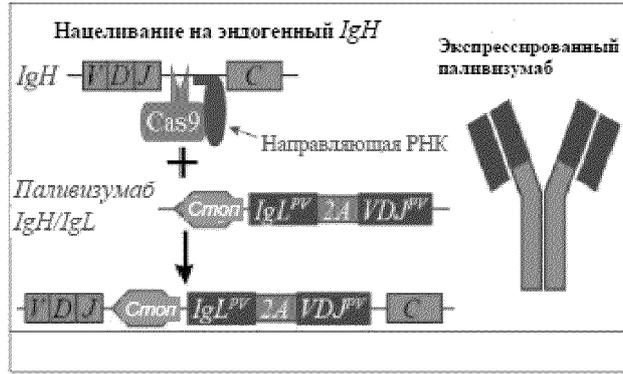
Фиг. 5



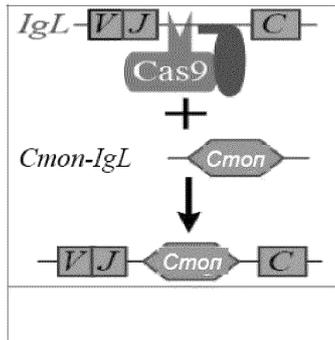
Фиг. 6А,В



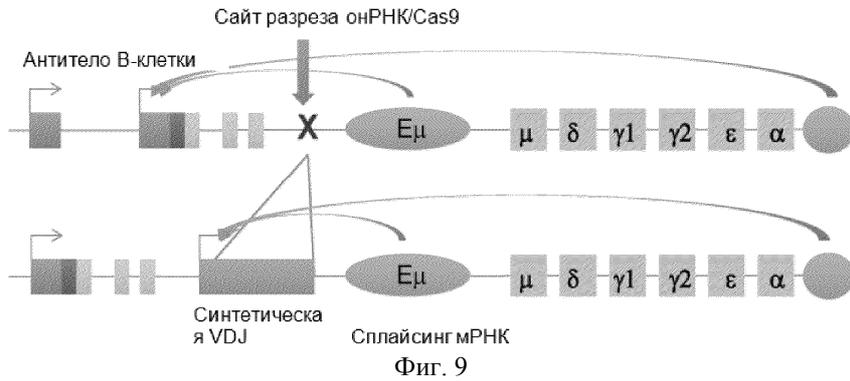
Фиг. 7



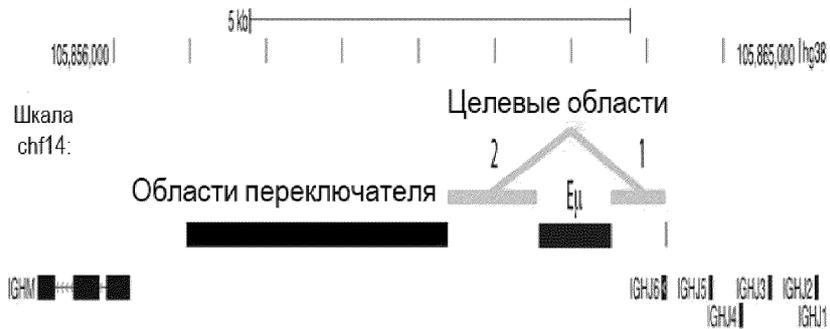
Фиг. 8А



Фиг. 8В



Фиг. 9



Фиг. 10

Последовательность интронного энхансера Е μ человека:

GTAGTTGAAAAGTGGTCTTGAAAAATACTAAAAATGAAGGCCACTCTATCAGAATATCAAAGT
 GTTTCTCCTTAATCACAAAGAGAAAAACGAGTTAACCTAAAAAGATTGTGAACACAGTCATTA
 TGAATAAATGCTCTGAGGTATCGAAAAAGTATTTGAGATTAATTAACATGAAGGGATAA
 CAAGCTAATTTAAAAAATTTTTGAATACAGTCATAAACTCTCCCTAAGACTGTTTAAATTTCT
 TAAACATCTTACTTTAAAAATGAATGCAGTTTAGAAGTTGATATGCTGTTTGCACAAACTAGC
 AGTTGATAAGCTAAGATTGGAATGAAATTCAGATAGTTAAAAAAGCCTTTTCAGTTTCGG
 TCAGCCTCGCCTTATTTAGAAACGCAAATTTGCCAGGTGTTGTTTTGCTCAGTAGAGCACT
 TTCAGATCTGGGCTGGGCAAAACCACCTCTTCACAACCAGAAGTGATAAAATTTACCAATT
 GTGTTTTTTGCTTCTAAAAATAGACTCTCGCGGTGACCTGCTTCTGCCACCTGCTGTGG
 GTGCCGGAGACCCCATGCAGCCATTTGACTCTAATTCATCATCTGCTTCCAGTTCGCT
 CAATTAATTTAAAAAATAAACTTGATTTATGATGGTCAAAACGCAGTCCCGCATCGGGGCC
 ACAGCACTGTGCTAGTATTTCTTAGCTGAGCTTGTCTTGGCCTCAATTCAGACACATATCA
 CTCATGGGTGTTAATCAAATGATAAGAATTTCAAATACTTGGACAGTTAAAAAATTAATATA
 CTTGAAAATCTCTCACATTTTAAAGTCA (SEQ ID NO: 85)

Область интрона человека 1 для нацеливания для вставки генетической конструкции:

CTACATGGACGTCTGGGGCAAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGGTAAGAATGGCCA
 CTCTAGGGCCTTTGTTTTCTGCTACTGCCTGTGGGGTTTCTGAGCATTGCAGTTGGTCC
 CTGGGGCATGTTCCGAGGGGACCTGGGCGGACTGGCCAGGAGGGGATGGGCACTGGG
 TGCCTTGAGGATCTGGGAGCCTCTGTGGATTTCCGATGCCTTTGGAAAATGGGACTCG
 GTTGGGTGCGTCTGATGGAGTAACTGAGCCTGGGGCTTGGGGAGCCACATTTGGACGA
 GATGCTGAACAAACCAGGGGTCTTAGTGATGGCTGAGGAATGTGTCTCAGGAGCGGTGT
 CTGTAGGACTGCAAGATCGCTGCACAGCAGCGAATCGTGAATATTTCTTTAGAATTAATGA
 GGTGCGCTGTGTCAACCTGCATCTTAAATCTTTATTGGCTGGAAAGAGAAGTGTCCGA
 GTGGGTGAATCCAGCCAGGAGGGACGCGTAGCCCCGGTCTTGATGAGAGCAGGGTTGGG
 GGCAGGGGTAGCCCAGAAACGGTGGCTGCCGCTCTGACAGGGGCTTAGGGAGGCTCCAG
 GACCTCAGTGCCTTGAAGCTGTTTTCCATGAGAAAAGGATTGTTTATCTTAGGAGGCATGC
 TTAGTGTAAAAGACAGGATATGTTGAAGTGGCTTCTGA GAAAAATGGTTAAGAAAATTAAT
 (SEQ ID NO: 1)

Фиг. 11А

- Область человека_1_нРНК_1 GGTCTCGGGGCATGTTCCGAGG (SEQ ID NO: 5)
 Область человека_1_нРНК_2 GGGCATGTTCCGAGGGGACCTGG (SEQ ID NO: 6)
 Область человека_1_нРНК_3 GCATTGCAGGTTGGTCCCTCGGGG (SEQ ID NO: 7)
 Область человека_1_нРНК_4 TCCTCGGGGCATGTTCCGAGGGG (SEQ ID NO: 8)
 Область человека_1_нРНК_5 GGCATGTTCCGAGGGGACCTGGG (SEQ ID NO: 9)
 Область человека_1_нРНК_6 GTCTCAGGAGCGGTGTCTGTAGG (SEQ ID NO: 10)
 Область человека_1_нРНК_7 AGCATTGCAGGTTGGTCCCTCGGGG (SEQ ID NO: 11)
 Область человека_1_нРНК_8 CCTGGGCGGACTGGCCAGGAGGGG (SEQ ID NO: 12)
 Область человека_1_нРНК_9 ACTGGGGTGCCTTGAGGATCTTGG (SEQ ID NO: 13)
 Область человека_1_нРНК_10 CCCAGTGCCCATCCCCTCCTTGG (SEQ ID NO: 14)
 Область человека_1_нРНК_11 СТАAGACCCCTGGTTTGTTCAGG (SEQ ID NO: 15)
 Область человека_1_нРНК_12 TGTGGATTTTCCGATGCCTTTGG (SEQ ID NO: 16)
 Область человека_1_нРНК_13 AGGACCAACCTGCAATGCTCAGG (SEQ ID NO: 17)
 Область человека_1_нРНК_14 CTCAGTTGGGTGCGTCTGATTGG (SEQ ID NO: 18)
 Область человека_1_нРНК_15 CCCTCCTGGCCAGTCCGCCAGG (SEQ ID NO: 19)
 Область человека_1_нРНК_16 GGCCAGGAGGGGATGGGCACTTGG (SEQ ID NO: 20)
 Область человека_1_нРНК_17 GAGATGCCTGAACAAACCAGGGG (SEQ ID NO: 21)
 Область человека_1_нРНК_18 AGGGGTCTTAGTGATGGCTGAGG (SEQ ID NO: 22)
 Область человека_1_нРНК_19 ATGGGCACTGGGGTGCCTTGAGG (SEQ ID NO: 23)
 Область человека_1_нРНК_20 TTCCGATGCCTTTGAAAATGGG (SEQ ID NO: 24)

Человек_1_нРНК1	GGUCCUCGGGGCAUGUCCG (SEQ ID NO: 290)
Человек_1_нРНК2	GGGCAUGUCCGAGGGGACC (SEQ ID NO: 291)
Человек_1_нРНК3	GCAUUGCAGGUUGGUCCUCG (SEQ ID NO: 88)
Человек_1_нРНК4	UCCUCGGGGCAUGUCCGAG (SEQ ID NO: 292)
Человек_1_нРНК5	GGCAUGUCCGAGGGGACCU (SEQ ID NO: 293)
Человек_1_нРНК6	GUCUCAGGAGCGGUGUCUGU (SEQ ID NO: 89)
Человек_1_нРНК7	AGCAUUGCAGGUUGGUCCUC (SEQ ID NO: 294)
Человек_1_нРНК8	CCUGGGCGGACUGGCCAGGA (SEQ ID NO: 295)
Человек_1_нРНК9	ACUGGGGUGCCUUGAGGAUC (SEQ ID NO: 296)
Человек_1_нРНК10	CCCCAGUGCCCAUCCCCUCC (SEQ ID NO: 297)
Человек_1_нРНК11	CUAAGACCCUUGUUUGUUC (SEQ ID NO: 298)
Человек_1_нРНК12	UGUGGAUUUCCGAUGCCUU (SEQ ID NO: 299)
Человек_1_нРНК13	AGGACCAACCUGCAAUGCUC (SEQ ID NO: 300)
Человек_1_нРНК14	CUCAGGUUGGGUGCGUCUGA (SEQ ID NO: 301)
Человек_1_нРНК15	CCCUCCUGGCCAGUCCGCC (SEQ ID NO: 302)
Человек_1_нРНК16	GGCCAGGAGGGGAUGGGCAC (SEQ ID NO: 303)
Человек_1_нРНК17	GAGAUGCCUGAACAAACCAG (SEQ ID NO: 304)
Человек_1_нРНК18	AGGGGUCUUAGUGAUGGCU (SEQ ID NO: 305)
Человек_1_нРНК19	AUGGGCACUGGGGUGCCUUG (SEQ ID NO: 306)
Человек_1_нРНК20	UUCCGAUGCCUUUGGAAAAU (SEQ ID NO: 307)

Фиг. 11В

Область интрона человека 2 для нацеливания для вставки генетической конструкции

CTCACCTT TAGGATAAGTTTTAGGTA AATGTGCATCATTATCCTGAATTATTTAGTTAAGCA
 TGTTAGTTGGTGGCATAAGAGAAAAC TCAATCAGATAGTGCTGAAGACAGGACTGTGGAGA
 CACCTTAGAAGGACAGATTCTGTTCCGAATCACCGATGCGGCGTCAGCAGGACTGGCCTA
 GCGGAGGCTCTGGGAGGGTGGCTGCCAGGCCCGCCTGGGCTTTGGTCTCCCCGGAC
 TACCCAGA GCTGGGATGCGTGGCTTCTGCTGCCGGGCCGACTGGCTGCTCAGGCCCA
 GCCCTTGTTAATGGACTTGGAGGAATGATTCCATGCCAAAGCTTTGCAAGGCTCGCAGTGA
 CCAGGCGCCCGACATGGTAAGAGACAGGCAGCCGCCGCTGCTGCATTTGCTTCTCTTAAA
 ACTTTGTATTTGACGCTTATTTCCACTAGAAGGGGAAC TGGTCTTAATTGCTTGATGAAGA
 GCAGGAGACTCATTTATGTGAGTCTTTTGAGTGACCATTGTCTGGGTCACTCCCATTTAACT
 TTCCCTAAAGCCCATTTGAAGGAGAGGTGCGACGAGCTGCTCCACAACCTCTGAATGGGG
 ATGGCATGGGTAATGATGCTTGAGAACATACCAAGCCCACTGGCATCGCCCTTGCTAAG
 TCATTGACTGTAGGTCAATCGCACCCCTTGAAGTAGCCCATGCCTTCCAAAGCGATTTAT
 GGTAATGGCAGAAATTTAAGTGGCAAATTCAGATAAAATGCATTTCTTGTTGTTTCCAAT
 GATGACTGTT ATCTAGAGGGAATTTAAAGGCAGGGGTTACTGCAGACTCAGAAGGGAGG
 GGATGCTCCGGGAAGGTGGAGGCTCTGAGCATCTCAATACCCTCCTCTTGGTGCAGAAGA
 TATGCTGCCACTTCTAGAGCAAGGGGACCTGCTCATTTTTATCACAGCACAGGCTCCTAAA
 TTCTTGGTCTCATTCTCAAGATGTTTAAATGACTTTAAAGCAGCAAAGAAATATCCACCCA
 GGTAGTGGAGGGTGGTAATGATTGGTAATGCTTTGGAACCAAAACCCAGGTGGCGCTGGG
 GCAGGAC TGCAGGGAAC TGGGTATCAAGTAGAGGGGAGACAAAAGATGGAAGCCAGC
 CTGGCTGTGCAGGAACCCGCAATGAGATGGCTTTAGCTGAGACAAGCAGGTCTGGTGG
 GCTGACCATTTCTGGCCATGACAACCTCATCCAGCTTTTCAAGAAATGGACTCAGATGGGCAA
 AACTGACCTAAGCTGACCTAGACTAAACAAGGCTGAAC (SEQ ID NO: 2)

Фиг. 12А

Область человека_2_нРНК1 CTGACGCCGCATCGGTGATTCGG (SEQ ID NO: 25)
Область человека_2_нРНК2 TTAGACAAGGGCGATGCCAGTGG (SEQ ID NO: 26)
Область человека_2_нРНК3 CGTGCGACCTCTCCTTCAAATTGG (SEQ ID NO: 27)
Область человека_2_нРНК4 AGCATATCTTCTGCACCAAGAGG (SEQ ID NO: 28)
Область человека_2_нРНК5 ATATTCCACCCAGGTAGTGGAGG (SEQ ID NO: 29)
Область человека_2_нРНК6 GTGCGACCTCTCCTTCAAATGGG (SEQ ID NO: 30)
Область человека_2_нРНК7 AGGTCCCCTTGCTCTAGAAGTGG (SEQ ID NO: 31)
Область человека_2_нРНК8 CTCTAGATAACAGTCATCATTGG (SEQ ID NO: 32)
Область человека_2_нРНК9 TTGTCTAAGTCATTGACTGTAGG (SEQ ID NO: 33)
Область человека_2_нРНК10 CCAAAGCGATTTATGGTAAATTGG (SEQ ID NO: 34)
Область человека_2_нРНК11 TCTTTTGAGTGACCATTGTCTGG (SEQ ID NO: 35)
Область человека_2_нРНК12 CCATTTACCATAAATCGCTTTGG (SEQ ID NO: 36)
Область человека_2_нРНК13 AGGGCGATGCCAGTGGGGCTTGG (SEQ ID NO: 37)
Область человека_2_нРНК14 AGCTAAAGCCATCTCATTGCCGG (SEQ ID NO: 38)
Область человека_2_нРНК15 CCACAACCTCTGAATGGGGATGG (SEQ ID NO: 39)
Область человека_2_нРНК16 TTAATTGCTTGATGAAGAGCAGG (SEQ ID NO: 40)
Область человека_2_нРНК17 TAGACAAGGGCGATGCCAGTGGG (SEQ ID NO: 41)
Область человека_2_нРНК18 AAGCTGACCTAGACTAAACAAGG (SEQ ID NO: 42)
Область человека_2_нРНК19 GCAGGAACCCGGCAATGAGATGG (SEQ ID NO: 43)
Область человека_2_нРНК20 TCTGTTCCGAATCACCGATGCGG (SEQ ID NO: 44)

Человек_2_нРНК_1	CUGACGCCGCAUCGGUGAUU (SEQ ID NO: 308)
Человек_2_нРНК_2	UUAGACAAGGGCGAUGCCAG (SEQ ID NO: 309)
Человек_2_нРНК_3	CGUGCGACCUCUCCUUCAAA (SEQ ID NO: 310)
Человек_2_нРНК_4	AGCAUAUCUUCUGCACCAAG (SEQ ID NO: 311)
Человек_2_нРНК_5	AUAUCCACCCAGGUAGUGG (SEQ ID NO: 312)
Человек_2_нРНК_6	GUGCGACCUCUCCUUCAAA (SEQ ID NO: 313)
Человек_2_нРНК_7	AGGUCCCCUUGCUCUAGAAG (SEQ ID NO: 314)
Человек_2_нРНК_8	CUCUAGAUACAGUCAUCAU (SEQ ID NO: 315)
Человек_2_нРНК_9	UUGUCUAAGUCAUUGACUGU (SEQ ID NO: 316)
Человек_2_нРНК_10	CCAAAGCGAUUUUUGGUAUU (SEQ ID NO: 317)
Человек_2_нРНК_11	UCUUUUUGAGUGACCAUUGUC (SEQ ID NO: 318)
Человек_2_нРНК_12	CCAUUUACCAUAAAUCGCUU (SEQ ID NO: 319)
Человек_2_нРНК_13	AGGGCGAUGCCAGUGGGGCU (SEQ ID NO: 320)
Человек_2_нРНК_14	AGCUAAAGCCAUCUCAUUGC (SEQ ID NO: 321)
Человек_2_нРНК_15	CCACAACCUCUGAAUGGGGA (SEQ ID NO: 322)
Человек_2_нРНК_16	UUAAUUGCUUGAUGAAGAGC (SEQ ID NO: 323)
Человек_2_нРНК_17	UAGACAAGGGCGAUGCCAGU (SEQ ID NO: 324)
Человек_2_нРНК_18	AAGCUGACCUAGACUAAACA (SEQ ID NO: 325)
Человек_2_нРНК_19	GCAGGAACCCGGCAAUGAGA (SEQ ID NO: 326)
Человек_2_нРНК_20	UCUGUCCGAAUCACCGAUG (SEQ ID NO: 327)

Фиг. 12В

Последовательность интронного энхансера Еμ мыши:

AGTCTAGATAATTGCATTCATTTAAAAAAGTCTTTCTCCTAAAAATGAATACTCAGAAAGT
GGTCTTGA AAAAGATTTGTGAAGCCGTTTTGACCAGAATGTCAAAGTCTTAATAGTAAGGCA
AAACAAACAACTAAAAAGATCATGAACAAAGTCACTGTAAATGCTTCGGGTATTGGAAAAAG
AATTGAATGGAGACCAATAATCAGAGGGGAAGATAATAGAGTAATTTAAGAAGTTTTCTAA
ATATATTAGAAATTAAGACACTAAAGTCTTCAATTTCTACATAACCTAATTTTGAAAAATGA
ATTCTAAATACATTTTAGAAGTCGATAAACTTAAGTTTGGGGAACTAGAACTACTCAAGCT
AAAATTAAGGTTGAACCAATAAGTTAAAGAGGACCTCTCCAGTTTCGGCTGAATCCTC
AACTTATTTAGAAATGCAAATACCCAGGTGGTGTTTTGCTCAGCCTGGACTTTTCGGTTTG
GTGGGCTGGACAGAGTGTTCAAAACCACTTCTTCAAACACAGCTACAAGTTTACCTAG
TGGTTTTATTTCCCTTCCCAAATAGCCTTGCCACATGACCTGCTTCTCCTGCCAGCTGCTGC
AGGTGTTCTGGTCTGATCGGCCATCTTGACTCCAACCTCAACATTGCTCAATTCATTTAAAA
ATATTTGAAACTTAATTTATTATTGTTAAAGTCAAGTCTGAAATAGGTTATGAGAGAGCCTCA
CTCCCATTCCTCGGTAAACTTTAAGTAATATCAGTTCTACACAAACAAGACCTCAAACCTGA
TTGACAAGAAATTTGGACATTTAAAAAATGAGTACTTGAACCCCTCTCACATTTTAAAGTC
ACAGTATTTAACTATTTTCTAGGAACCACTTAAGAGTAAAAGCAACATCTTCTAATATTC
CATACACATACTTCTGTGTTCTTTGAAAGCTGGACTTTTGACAGGCTCCACCAGACCTCTCT
AGACA (SEQ ID NO: 86)

Область интрона мыши 1 для нацеливания для вставки генетической конструкции:

GGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCAGGTAAGAATGGCCTCTCCAG
GTCTTTATTTTAACTTTGTTATGGAGTTTTCTGAGCATTGCAGACTAATCTTGGATATTTG
TCCCTGAGGGAGCCGGCTGAGAGAAGTTGGGAAATAAAGTCTAGGGATCTCAGAGCCT
TTAGGACAGATTATCTCCACATCTTTGAAAACTAAGAATCTGTGTGATGGTGTGGTGGG
TCCCTGGATGATGGGATAGGGACTTTGGAGGCTCATTTGAAGAAGATGCTAAAAACAATCCT
ATGGCTGGAGGGATAGTTGGGGCTGTAGTTGGAGATTTTCAGTTTTTGAATAAAAAGTATTA
GTTGTGGAATAACTTCAGGACCACCTCTGTGACAGCATTATACAGTATCCGATGCATAG
GGACAAAGAGTGGAGTGGGGCACCTTTCTTTAGATTTGTGAGGAATGTTCCGCACTAGATTG
TTTAAACTT CATTTGTTGGAAGGAGAGCTGTCTTAGTGATTGAGTCAAGGGAGAAAAGGC
ATCTAGCCTCGGTCTCAAAGGGTAGTTGCTG (SEQ ID NO: 3)

Фиг. 13А

Мышь_область_1_нРНК_1 CAACTACCCTTTTGAGACCGAGG (SEQ ID NO: 45)
Мышь_область_1_нРНК_2 TTATACAGTATCCGATGCATAGG (SEQ ID NO: 46)
Мышь_область_1_нРНК_3 TATACAGTATCCGATGCATAGGG (SEQ ID NO: 47)
Мышь_область_1_нРНК_4 CATCTAGCCTCGGTCTCAAAAGG (SEQ ID NO: 48)
Мышь_область_1_нРНК_5 CACTCTTTGTCCCTATGCATCGG (SEQ ID NO: 49)
Мышь_область_1_нРНК_6 ATCTAGCCTCGGTCTCAAAAGG (SEQ ID NO: 50)
Мышь_область_1_нРНК_7 AAGTTTTAAACAATCTAGTGCGG (SEQ ID NO: 51)
Мышь_область_1_нРНК_8 AAGATGCTAAAACAATCCTATGG (SEQ ID NO: 52)
Мышь_область_1_нРНК_9 TGCTAAAACAATCCTATGGCTGG (SEQ ID NO: 53)
Мышь_область_1_нРНК_10 AAGTCCCTATCCCATCATCCAGG (SEQ ID NO: 54)
Мышь_область_1_нРНК_11 GGGAGAAAGGCATCTAGCCTCGG (SEQ ID NO: 55)
Мышь_область_1_нРНК_12 TGAGCATTGCAGACTAATCTTGG (SEQ ID NO: 56)
Мышь_область_1_нРНК_13 TTAGTTGTGGAATATACTTCAGG (SEQ ID NO: 57)
Мышь_область_1_нРНК_14 TGGTGGAGTCCCTGGATGATGGG (SEQ ID NO: 58)
Мышь_область_1_нРНК_15 GTGGAGATAATCTGTCCATAAGG (SEQ ID NO: 59)
Мышь_область_1_нРНК_16 AGTCCCTATCCCATCATCCAGGG (SEQ ID NO: 60)
Мышь_область_1_нРНК_17 ATCTTGGATATTTGTCCCTGAGG (SEQ ID NO: 61)
Мышь_область_1_нРНК_18 GGGATAGTTGGGGCTGTAGTTGG (SEQ ID NO: 62)
Мышь_область_1_нРНК_19 CAGGTAAGAATGGCCTCTCCAGG (SEQ ID NO: 63)
Мышь_область_1_нРНК_20 TCTCTCAGCCGGCTCCCTCAGG (SEQ ID NO: 64)

Мышь_1_нРНК_1	CAACUACCCUUUUGAGACCG (SEQ ID NO: 328)
Мышь_1_нРНК_2	UUUAUACAGUAUCCGAUGCAU (SEQ ID NO: 87)
Мышь_1_нРНК_3	UAUACAGUAUCCGAUGCAUA (SEQ ID NO: 329)
Мышь_1_нРНК_4	CAUCUAGCCUCGGUCUCAAA (SEQ ID NO: 330)
Мышь_1_нРНК_5	CACUCUUUGUCCCUAUGCAU (SEQ ID NO: 331)
Мышь_1_нРНК_6	AUCUAGCCUCGGUCUCAAAA (SEQ ID NO: 332)
Мышь_1_нРНК_7	AAGUUUUAAAACAAUCUAGUG (SEQ ID NO: 333)
Мышь_1_нРНК_8	AAGAUGCIAAAAACAAUCCUA (SEQ ID NO: 334)
Мышь_1_нРНК_9	UGCIAAAAACAAUCCUAUGGC (SEQ ID NO: 335)
Мышь_1_нРНК_10	AAGUCCCUAUCCCAUCAUCC (SEQ ID NO: 336)
Мышь_1_нРНК_11	GGGAGAAAGGCAUCUAGCCU (SEQ ID NO: 337)
Мышь_1_нРНК_12	UGAGCAUUGCAGACUAAUCU (SEQ ID NO: 338)
Мышь_1_нРНК_13	UUAGUUGUGGAAUUAUCUUC (SEQ ID NO: 339)
Мышь_1_нРНК_14	UGGUGGAGUCCUGGAUGAU (SEQ ID NO: 340)
Мышь_1_нРНК_15	GUGGAGAUAAUCUGUCCUAA (SEQ ID NO: 341)
Мышь_1_нРНК_16	AGUCCCUAUCCCAUCAUCCA (SEQ ID NO: 342)
Мышь_1_нРНК_17	AUCUUGGAUUAUUGUCCUG (SEQ ID NO: 343)
Мышь_1_нРНК_18	GGGAUAGUUGGGGCUGUAGU (SEQ ID NO: 344)
Мышь_1_нРНК_19	CAGGUAAGAAUGGCCUCUCC (SEQ ID NO: 345)
Мышь_1_нРНК_20	UCUCUCAGCCGGCUCCUCA (SEQ ID NO: 346)

Фиг. 13В

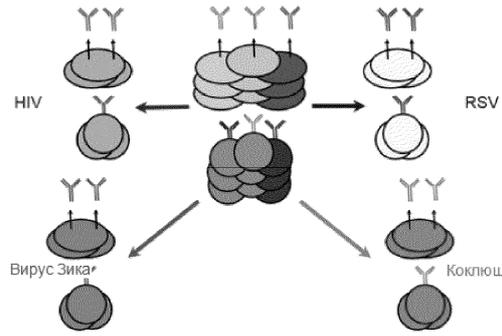
Область интрона мыши 2 для нацеливания для вставки генетической конструкции

TTATTTAGTTGAACATGCTGGTTGGTGGTTGAGAGGACACTCAGTCAGTCAGTGACGTGA
 AGGGCTTCTAAGCCAGTCCACATGCTCTGTGTAACCTCCCTCGGCCCTGCTTATTGTTGA
 ATGGGCCAAAGGTCTGAGACCAGGCTGCTGCTGGGTAGGCTGGACTTTGGGTCTCCCAC
 CCAGACCTGGGAATGTATGGTTGTGGCTTCTGCCACCCATCCACCTGGCTGCTCATGGAC
 CAGCCAGCCTCGGTGGCTTTGAAGGAACAATTCCACACAAAAGACTCTGGACCTCTCCGAA
 ACCAGGCACCGCAAAATGGTAAGCCAGAGGCAGCCACAGCTGTGGCTGCTGCTCTTAAAGC
 TTGTAAACTGTTTCTGCTTAAAGAGGGACTGAGTCTTCAGTCATTGCTTTAGGGGGAGAAAG
 AGACATTTGTGTCTTTTGTAGTACCGTTGTCTGGGTCACATTTAACTTTCCCTTGAAA
 AACTAGTAAAAGAAAAATGTTGCCTGTAAACCAATAATCATAGAGCTCATGGTACTTTGAGG
 AAATCTTAGAAAAGCGTGTATACAATTGTCTGGAATTATTTAGTTAAGTGTATTAGTTGAGGT
 ACTGATGCTGTCTCTACTTCAGTTATACATGTGGGTTTGAATTTTGAATCTATTCTGGCTCTT
 CTTAAGCAGAAAATTTAGATAAAATGGATACCTCAGTGGTTTTTAAATGGTGGGTTTAAATATA
 GAAGGAATTTAAATTTGAAGCTAATTTAGAATCAGTAAGGAGGGACCCAGGCTAAGAAGGC
 AATCCTGGGATTCTGGAAGAAAAGATGTTTTTATAGAAAACACTACTACATTCTTG
 ATCTACAACCTCAATGTGGTTTAAATGAATTTGAAGTTGCCAGTAAATGTAATCTCCTGGTTGTTA
 AAGAATGGTATCAAAGGACAGTGTAGATCCGAGGTGAGTGTGAGAGGACAGGGGCTGG
 GGTATGGATACGAGAAGGAAGGCCACAGCTGTACAGAATTGAGAAAGAATAGAGACCTG
 CAGTTGAGGCCAGCAGGTCTGGCTGGACTAATCTCCAGCCACAGTAATGACCCAGACAGA
 GAAAGCCAGACTCATAAAGCTTGTGAGCAAAATTAAGGGAACAAGGTTGAGAGCCCTAGT
 AAGCAGGGCTCTAAAAGGCACAGCTGAGCTGAGATGGGTGGGCTTCTCTGAGTGTCTTA
 AAATGCGCTAAACTGAGGTGATTACTCTGAGGTAAGCAAAGCTGGGCTTGAACAAAATGA
 AGTAGACTGTAATGAACTGGAATGAGCTGGGCCGCTAAGCTAAACTAGGCTGGCTTAACC
 GAGATGAGCCAAACTGGAATGAACTTCATTAATCTAGGTTGAATAGAGCTAAACTCTACTGC
 CTACACTGGACTGTTCTGAGCTGAGATGAGCTGGGGTGAGCTCAGCTATGCTACGCTGTG
 TTGGGGTGAGCTGATCTGAAATGAGATACTCTGGAGTAGCTGAGATGGGGTGAGATGGGG
 TG (SEQ ID NO: 4)

Фиг. 14А

Мышь_область_2_нРНК__1	CCGAAACCAGGCACCGCAAATGG (SEQ ID NO: 65)
Мышь_область_2_нРНК__2	CACCGCAAATGGTAAGCCAGAGG (SEQ ID NO: 66)
Мышь_область_2_нРНК__3	GGCTTACCATTTGCGGTGCCTGG (SEQ ID NO: 67)
Мышь_область_2_нРНК__4	TGCGGTGCCTGGTTTCGGAGAGG (SEQ ID NO: 68)
Мышь_область_2_нРНК__5	CAGCTATGCTACGCTGTGTTGGG (SEQ ID NO: 69)
Мышь_область_2_нРНК__6	AAGGACAGTGCTTAGATCCGAGG (SEQ ID NO: 70)
Мышь_область_2_нРНК__7	TCAGTCAGTCAGTGACGTGAAGG (SEQ ID NO: 71)
Мышь_область_2_нРНК__8	CATGCTGGTTGGTGGTTGAGAGG (SEQ ID NO: 72)
Мышь_область_2_нРНК__9	TCTTTTGAGTACCGTTGTCTGGG (SEQ ID NO: 73)
Мышь_область_2_нРНК__10	TGGCCCATTCAACAATAAGCAGG (SEQ ID NO: 74)
Мышь_область_2_нРНК__11	CTGGGCCGCTAAGCTAAACTAGG (SEQ ID NO: 75)
Мышь_область_2_нРНК__12	GCCAGCCTAGTTTAGCTTAGCGG (SEQ ID NO: 76)
Мышь_область_2_нРНК__13	TGAAGTAGACTGTAATGAACTGG (SEQ ID NO: 77)
Мышь_область_2_нРНК__14	GACCTGGGAATGTATGGTTGTGG (SEQ ID NO: 78)
Мышь_область_2_нРНК__15	GGTATGGATACGCAGAAGGAAGG (SEQ ID NO: 79)
Мышь_область_2_нРНК__16	GTTGAGAGCCCTAGTAAGCGAGG (SEQ ID NO: 80)
Мышь_область_2_нРНК__17	GCCGCTAAGCTAAACTAGGCTGG (SEQ ID NO: 81)
Мышь_область_2_нРНК__18	TCAGCTATGCTACGCTGTGTTGG (SEQ ID NO: 82)
Мышь_область_2_нРНК__19	TTTTAGAGCCTCGCTTACTAGGG (SEQ ID NO: 83)
Мышь_область_2_нРНК__20	CTCTATGATTATTGGTTAACAGG (SEQ ID NO: 84)
Мышь_2_нРНК__1	CCGAAACCAGGCACCGCAA (SEQ ID NO: 347)
Мышь_2_нРНК__2	CACCGCAAUUGGUAAGCCAG (SEQ ID NO: 348)
Мышь_2_нРНК__3	GGCUUACCAUUUGCGGUGCC (SEQ ID NO: 349)
Мышь_2_нРНК__4	UGCGGUGCCUGGUUUCGGAG (SEQ ID NO: 350)
Мышь_2_нРНК__5	CAGCUAUGCUACGCUGUGUU (SEQ ID NO: 351)
Мышь_2_нРНК__6	AAGGACAGUGCUUAGAUCCG (SEQ ID NO: 352)
Мышь_2_нРНК__7	UCAGUCAGUCAGUGACGUGA (SEQ ID NO: 353)
Мышь_2_нРНК__8	CAUGCUGGUUGGUGGUUGAG (SEQ ID NO: 354)
Мышь_2_нРНК__9	UCUUUUGAGUACCGUUGUCU (SEQ ID NO: 355)
Мышь_2_нРНК__10	UGGCCCAUUCAACAUAAGC (SEQ ID NO: 356)
Мышь_2_нРНК__11	CUGGGCCGCUAAGCUAAACU (SEQ ID NO: 357)
Мышь_2_нРНК__12	GCCAGCCUAGUUUAGCUUAG (SEQ ID NO: 358)
Мышь_2_нРНК__13	UGAAGUAGACUGUAAUGAAC (SEQ ID NO: 359)
Мышь_2_нРНК__14	GACCUGGGAAUGUAUGGUUG (SEQ ID NO: 360)
Мышь_2_нРНК__15	GGUAUGGAUACGCAGAAGGA (SEQ ID NO: 361)
Мышь_2_нРНК__16	GUUGAGAGCCCUAGUAAGCG (SEQ ID NO: 362)
Мышь_2_нРНК__17	GCCGCUAAGCUAAACUAGGC (SEQ ID NO: 363)
Мышь_2_нРНК__18	UCAGCUAUGCUACGCUGUGU (SEQ ID NO: 364)
Мышь_2_нРНК__19	UUUUAGAGCCUCGCUUACUA (SEQ ID NO: 365)
Мышь_2_нРНК__20	CUCUAUGAUUUAUUGGUUAAC (SEQ ID NO: 366)

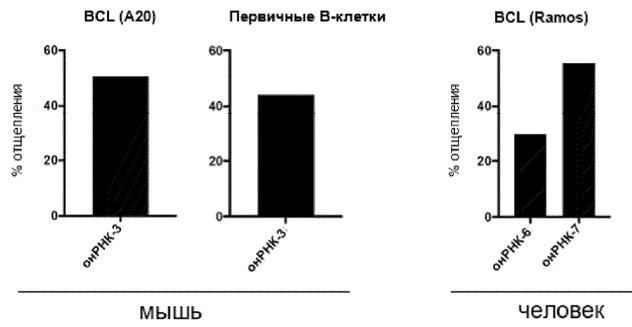
Фиг. 14B



Фиг. 17

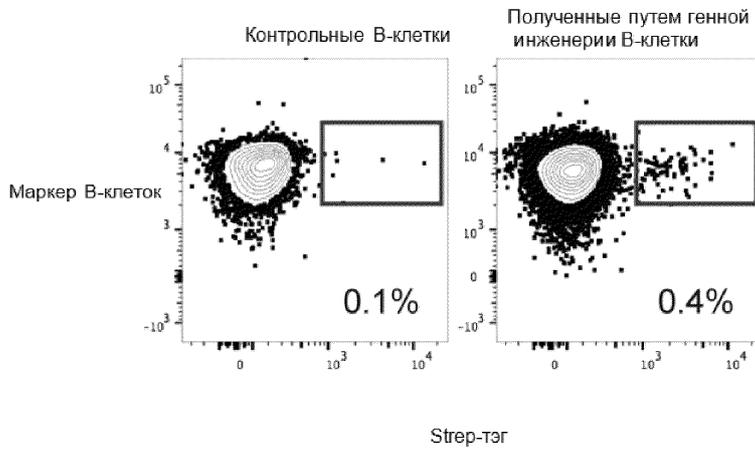
A B C

Клетки подвергшиеся электропорированию с помощью комплекса Cas9-онРНК

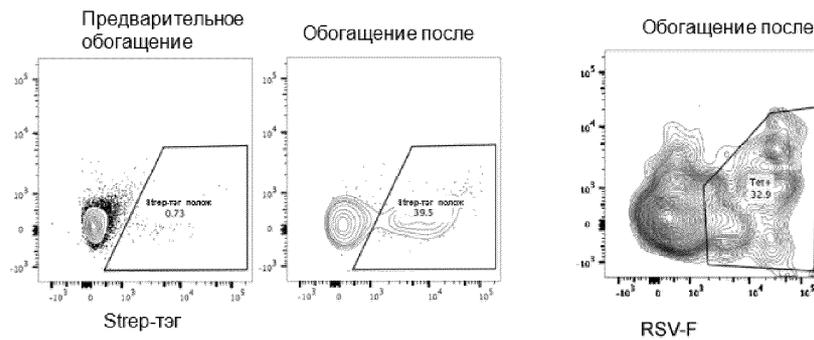


Фиг. 18А-С

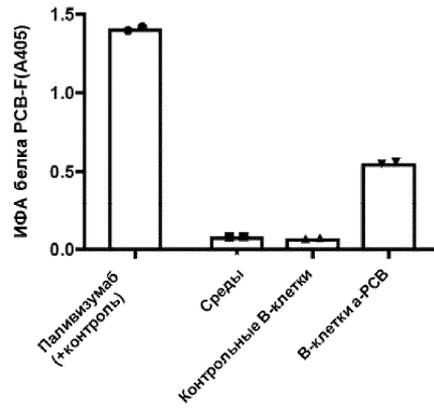
Цель: 1-10 %



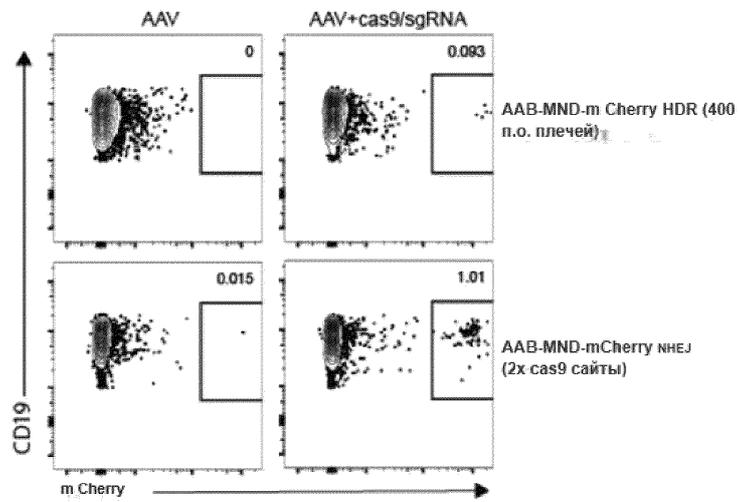
Фиг. 19



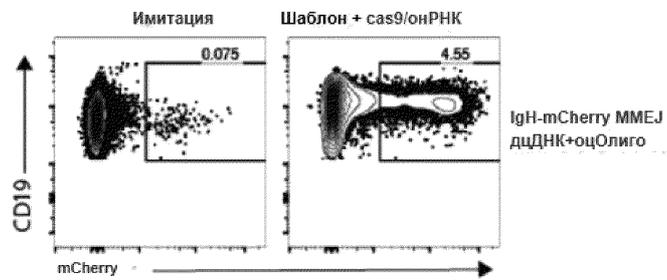
Фиг. 20



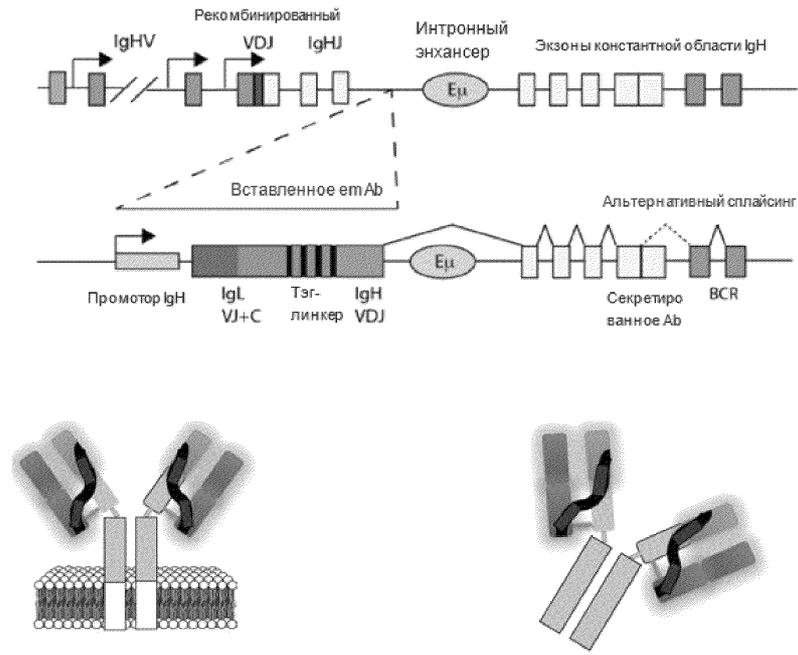
Фиг. 21



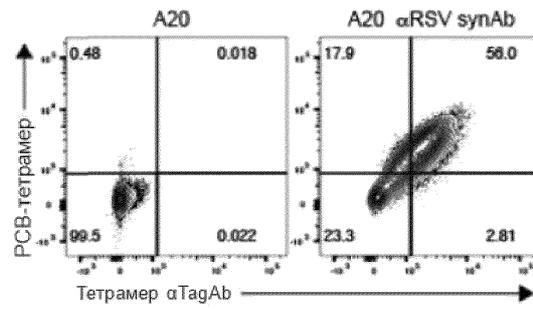
Фиг. 22А



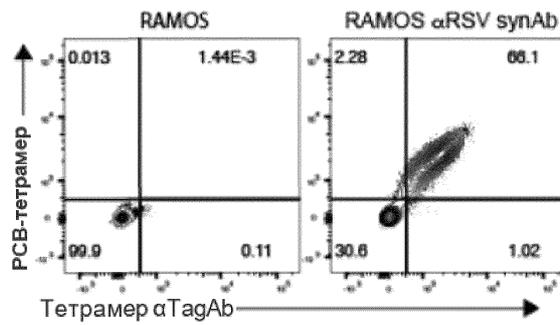
Фиг. 22В



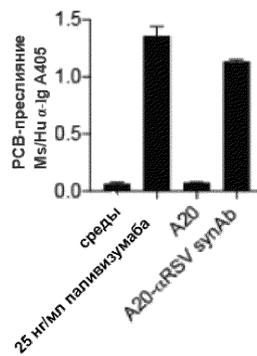
Фиг. 23А



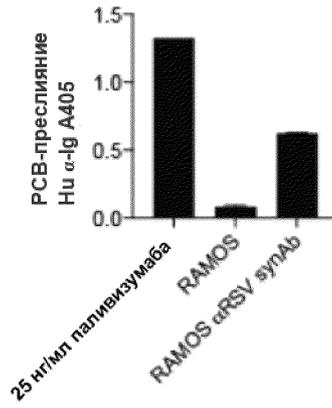
Фиг. 23В



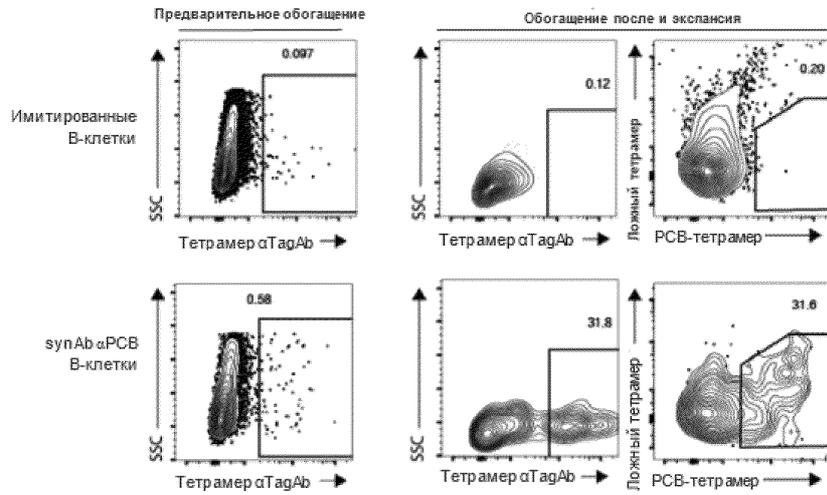
Фиг. 23С



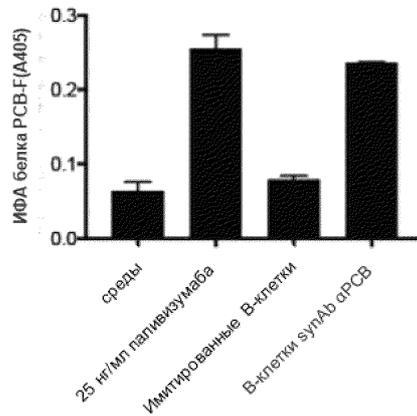
Фиг. 23D



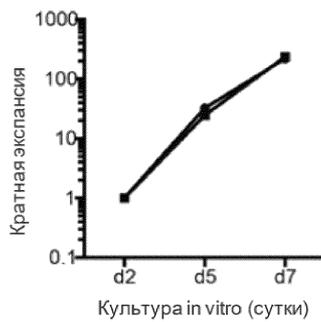
Фиг. 23Е



Фиг. 24А



Фиг. 24В



Фиг. 24С

Последовательности онРНК:

Мышь: онРНК-mIgh_3: UUAUACAGUAUCCGAUGCAU (SEQ ID NO: 87)
 Человек: онРНК-hIgh-6: GCAUUGCAGGUUGUCCUCG (SEQ ID NO: 88)
 онРНК-hIgh-7: GUCUCAGGAGCGGUGUCUGU (SEQ ID NO: 89)

Области гомологии генома мыши (для онРНК-mIgh_3):

Выше: CATCGGATACTGTATAAATGCTGTACAGAGGTGGT (SEQ ID NO: 90)
 Ниже: CATAGGGACAAGAGTGGAGTGGGGCACTTTCTTTA (SEQ ID NO: 91)

Области гомологии генома человека (для онРНК-hIgh-7):

GACACCGCTCCTGAGACACATTCCTCAGCCATCACT (SEQ ID NO: 92)
 TGTAGGACTGCAAGATCGCTGCACAGCAGCGAATCG (SEQ ID NO: 93)

Области гомологии генома человека (для онРНК-hIgh-6):

GGGACCAACCTGCAATGCTCAGGAAACCCACAGGCA (SEQ ID NO: 94)
 TTCGGGGCATGTTCCGAGGGGACCTGGGCGGACTGGC (SEQ ID NO: 95)

Сплайсинг-олигонуклеотиды (гомология геному обозначена жирным шрифтом):

Мышь(для онРНК-mIgh_3):

Выше: **CTTCGAGACATGTACAGACCATTTAGATGTAGTATCAAAGCCTAATATCTCAATCTTAA**
AATAGAATCCTAACCTGAGACACTCACTTGTCCATCGGATACTGTATAAATGCTGTCA
CAGAGGTGGT (SEQ ID NO: 96)
 Ниже: **CTTCTCCCATTTCTAAATGCATGTTGGGGGATTCTGGGCCTTCAGGACCACATAGGG**
ACAAGAGTGGAGTGGGGCACTTTCTTTA (SEQ ID NO: 97)

Человек (для онРНК-hIgh-7):

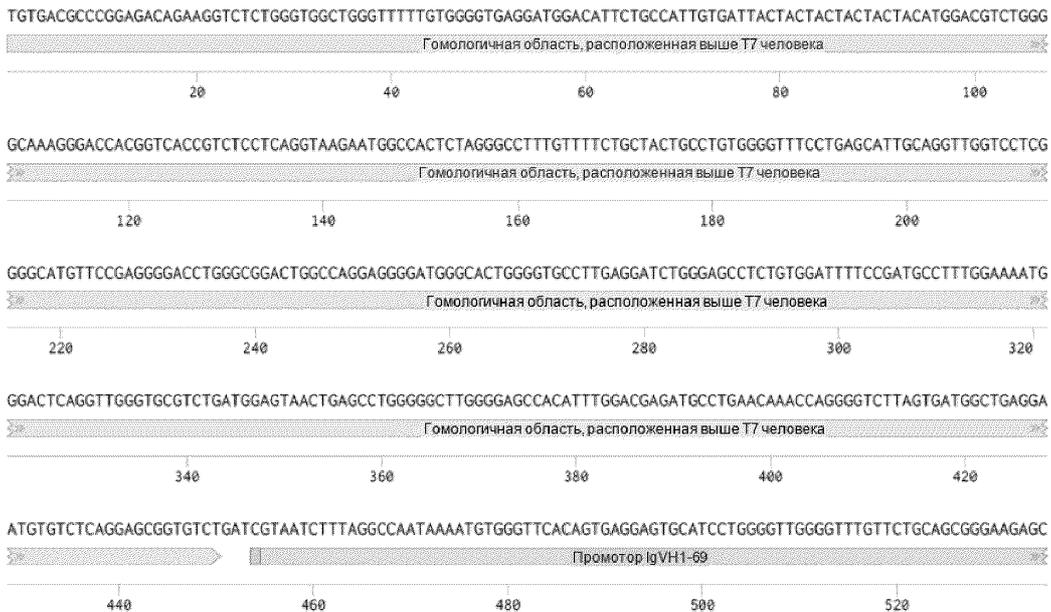
Выше: **GTGCACAGCGCTTCCCCTGTCAGAACAAACCCCAACCCAGGATGCACTCCTCAC**
TGTGAACCCACATTTTATTGGCCTAAAGATTACGGACACCGCTCTGAGACACATTC
CTCAGCCATCACT (SEQ ID NO: 98)
 Ниже: **GTCTGGGGATAGCGGGGAGCCAGGTGACTGGGCCAGGCAAGGGCTTTGGTGTAG**
GACTGCAAGATCGCTGCACAGCAGCGAATCG (SEQ ID NO: 99)

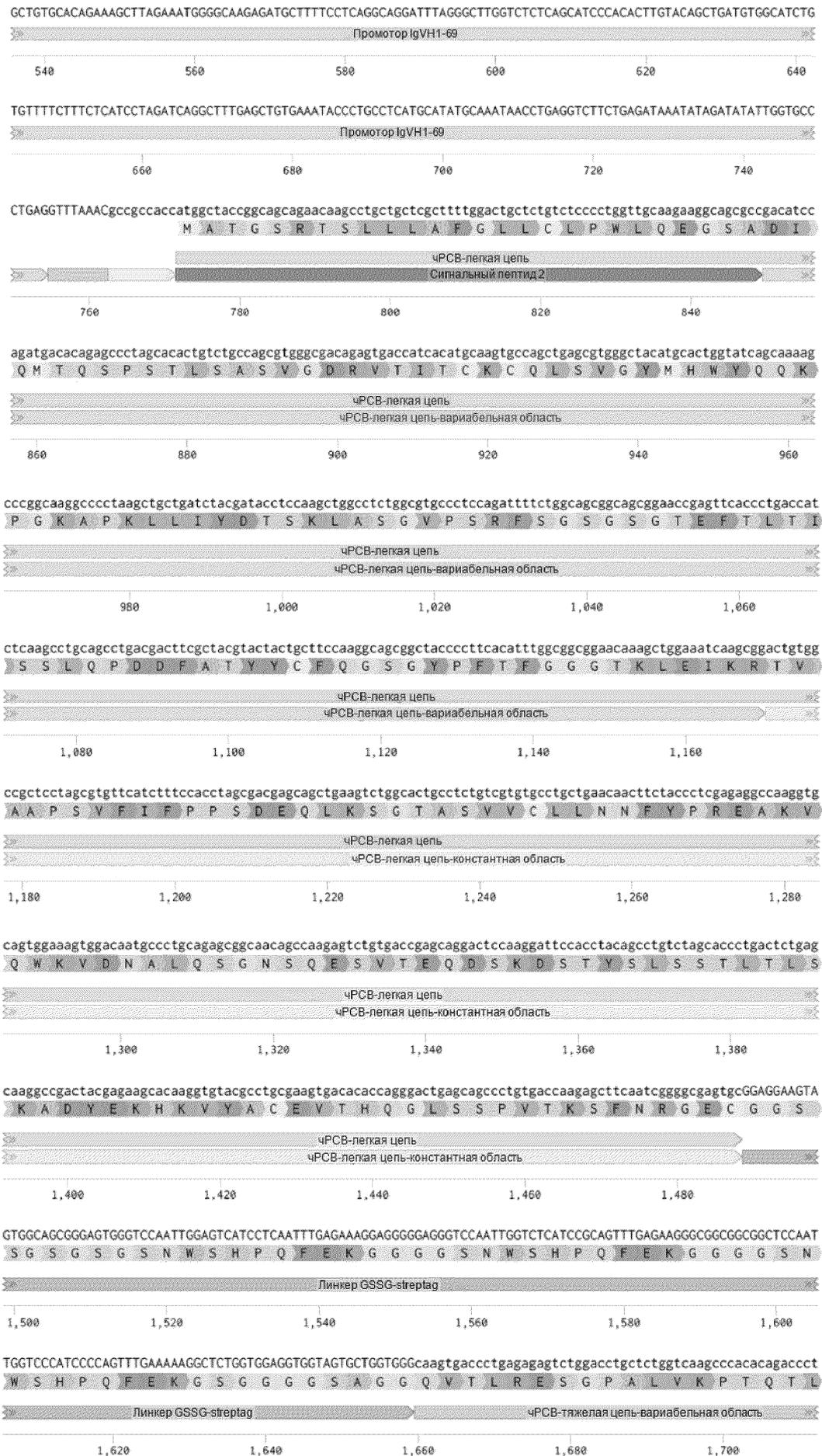
Человек (для онРНК-hIgh-6):

Выше: **GTGCACAGCGCTTCCCCTGTCAGAACAAACCCCAACCCAGGATGCACTCCTCAC**
TGTGAACCCACATTTTATTGGCCTAAAGATTACGGGGACCAACCTGCAATGCTCAGG
AAACCCACAGGCA (SEQ ID NO: 100)
 Ниже: **GTCTGGGGATAGCGGGGAGCCAGGTGACTGGGCCAGGCAAGGGCTTTGGTTCGG**
GGCATGTTCCGAGGGGACCTGGGCGGACTGGC (SEQ ID NO: 101)

Фиг. 25А

анти-PCB-emAb ААВ человека (2531 п.о)





gacactgacctgcaccttcagcggctttagcctgagcacaagcggcatgagcgtcggtggattagacagcctcctggcaaagcctggaatggctggccgacattt
 T L T C T F S G F S L S T S G M S V G W I R Q P P G K A L E W L A D I

чРСВ-тяжелая цепь-варибельная область

1,720 1,740 1,760 1,780 1,800

ggtagggacgacaagaaggactacaacccagcctgaagtccccggctgaccatcagcaaggacaccagcaagaaccaggtaggtgctgaaagtgaccaacatggaccct
 W W D D K K D Y N P S L K S R L T I S K D T S K N Q V V L K V T N M D P

чРСВ-тяжелая цепь-варибельная область

1,820 1,840 1,860 1,880 1,900 1,920

gccgacaccgccactactactgtgccagatccatgatcacaactggactctgacgtgtggggagccggcaccacaACCGTCTCTTCAGGTAAGTCTGCTGCTG
 A D T A T Y Y C A R S M I T N W Y F D V W G A G T T T V S S (SEQ ID NO: 126)

Сплайсинг

чРСВ-тяжелая цепь-варибельная область

1,940 1,960 1,980 2,000 2,020

GGGATAGCGGGAGCCAGGTGTACTGGGCCAGGCAAGGGCTTTGGATCGTAGGACTGCAAGATCGCTGCACAGCAGCGAATCGTAAATATTTCTTTAGAAATTATG

Гомологичная область, расположенная ниже T7 человека

2,040 2,060 2,080 2,100 2,120 2,140

AGGTGCGCTGTGTGCAACCTGCATCTTAAATCTTTATTGGCTGAAAGAGAACTGTCGGAGTGGTGAATCCAGCCAGGAGGGACCGGTAGCCCCGGTCTTGATG

Гомологичная область, расположенная ниже T7 человека

2,160 2,180 2,200 2,220 2,240

AGAGCAGGTTGGGGCAGGGGTAGCCAGAAACGGTGGCTGCCGTCTGACAGGGGCTTAGGGAGGCTCCAGGACCTCAGTGCCTTGAAGCTGTTCCATGAGAA

Гомологичная область, расположенная ниже T7 человека

2,260 2,280 2,300 2,320 2,340

AAGGATTGTTTATCTTAGGAGGCATGCTTACTGTTAAAAGACAGGATATGTTTGAAGTGGCTTCTGAGAAAAATGTTAAGAAAAATTATGACTTAAAAATGTGAGAG

Гомологичная область, расположенная ниже T7 человека

2,360 2,380 2,400 2,420 2,440 2,460

ATTTTCAAGTATATTAATTTTTTAACTGTCCAAGTATTTGAAATCTTATCATTTGATTAACACCCATG (SEQ ID NO: 102)

Гомологичная область, расположенная ниже T7 человека

2,470 2,480 2,490 2,500 2,510 2,520 2,530

>Гомологичная область, расположенная выше T7 человека, в анти-PCB emAb AAB человека

TGTGACGCCCGGAGACAGAAGGTTCTGGGTGGCTGGGTTTTGTGGGGTGAGGATGGACATTTCTGCCATTGTGATTACTACTA
 СТАСТАТАСАТGGACGCTCTGGGGCAAAGGGACACCGGTCAACGCTCTCTCAGGTAAGAATGGCCACTTAGGGGCTTTGTTTT
 CTGCTACTGCCTGTGGGGTTTCCTGAGCATTGCAGGTTGGTCTCTGGGGCATGTTCCGAGGGACCTGGGGGACTGGCCAG
 GAGGGGATGGGCACTGGGGTGCCTTGAGGATCTGGGAGCCTCTGTGGATTTTCCGATGCCTTTGGAAAAATGGGACTCAGGTTG
 GGTGGCTGTGATGGAGTAACTGAGCCTGGGGGCTTGGGGAGCCACATTTGGACGAGATGCCTGAACAAACAGGGGCTTAGT
 GATGCTGAGGAATGTGTCTCAGGAGCGGTGTCT (SEQ ID NO: 110)

>Промотор IgVH1-69 в анти-PCB emAb ABB человека

GTAATCTTTAGGCCAATAAAATGTGGGTTACAGTGAAGGATGATCCTGGGGTTGGGTTTTGTTCTGCAGCGGGAAGAGCGCT
 GTGCACAGAAAGCTTAGAAATGGGGCAAGAGATGCTTTCTCAGGCAGGATTTAGGGCTTGGTCTCTCAGCATCCACACTTG
 TACAGCTGATGTGGCATCTGTGTTTTCTTTCTCATCTAGATCAGGCTTTGAGCTGTGAAATACCCTGCCTCATGCATATGCAAA
 AACCTGAGGTCTCTGAGATAAATATAGATATATTGGTGCCTGAG (SEQ ID NO: 111)

>Последовательность, кодирующая сигнальный пептид в анти-PCB emAb AAB человека

ATGGCTACCGGCAGCAGAAACAAGCCTGCTGCTCGCTTTGGACTGCTGTCTCCCTGGTTGCAAGAAGGCAGCGCC (SEQ ID
 NO: 112)

>Последовательность, кодирующая легкую цепь чРСВ в анти-PCB emAb AAB человека

ATGGCTACCGGCAGCAGAAACAAGCCTGCTGCTCGCTTTGGACTGCTGTCTCCCTGGTTGCAAGAAGGCAGCGCCGACAT
 CCAGATGACACAGAGCCCTAGCACACTGTCTGCCAGGCTGGGGACAGAGTGACCATCACATGCAAGTGCAGCTGAGCGTGG
 GCTACATGCACCTGTATCAGCAAAAGCCCGGCAAGGCCCTAAGCTGTGATCTACGATACCTCAAGCTGGCCTCTGGCGTG
 CCTCCAGATTTTCTGGCAGCGGCAGCGGAACCGAGTTCACCTGACCATCTCAAGCCTGCAGCCTGACGACTTGCCTACGTAC
 TACTGCTTCCAAAGGCAGCGGCTACCCCTTACATTTGGCGCGGGAACAAGCTGGAAATCAAGCGGACTGTGGCCGCTCCTAG
 CGTGTTCATCTTTCCACCTAGCGACGAGCAGCTGAACTGGCACTGCCCTGTGCTGTGCTGCTGAACAACCTTACCCCTCG
 AGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAAGTGACAATGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAAGAGTCTGTGACCGAGCAGGACTCCAAG
 GATTCACCTACAGCCTGTCTAGCACCTGACTCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCCTGCGAAGTGC
 ACACCAGGGACTGACGAGCCCTGTGACCAAGAGCTTCAATCGGGCGAGTGC (SEQ ID NO: 113)

>Последовательность, кодирующая вариабельную область легкой цепи чPCB в анти-PCB emAb AAB человека
 GACATCCAGATGACACAGAGCCCTAGCACACTGTCTGCCAGCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACATGCAAGTGCCAGCTGAG
 CGTGGGCTACATGCACTGGTATCAGCAAAAAGCCCGGCAAGGCCCTAAGCTGCTGATCTACGATACCTCCAAGCTGGCCTCTG
 GCGTGCCCTCCAGATTTCTGGCAGCGGCAGCGGAACCGAGTTACCCCTGACCATCTCAAGCCTGCAGCCTGACGACTTCGCT
 ACGTACTACTGCTTCCAAGGCAGCGGCTACCCCTTACATTTGGCGGCGGAACAAAGCTGGAATCAAGCGG (SEQ ID NO: 114)

>Последовательность, кодирующая константную область легкой цепи каппа в анти-PCB emAb AAB человека
 AACAACCTTACCCCTCGAGAGGCCAAGGTGCAAGTGAAGTGGACAATGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCAAGAGTCTGTGAC
 CGAGCAGGACTCCAAGGATTCACCTACAGCCTGTCTAGCACCCTGACTCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAAGGTG
 ACGCCTGCCAAGTGACACACCAGGGACTGAGCAGCCCTGTGACCAAGACTTCAATCGGGGCGAGTGC (SEQ ID NO: 115)

>Последовательность, кодирующая линкер GSSG-streptag в анти-PCB emAb AAB человека
 GGAGGAAGTAGTGGCAGCGGAGTGGGTCCAATTGGAGTCATCCTCAATTTGAGAAAGGAGGGGGAGGGTCCAATTGGTCTCA
 TCCGAGTTTGAGAAGGCGGCGGCGGCTCCAATTGGTCCCATCCCAAGTTTGAAGGCTCTGGTGGAGGTGGTAGTGCTG
 GTGGG (SEQ ID NO: 116)

>Последовательность, кодирующая вариабельную область тяжелой цепи чPCB в анти-PCB emAb AAB человека
 SAAGTGACCCCTGAGAGAGTCTGGACCTGCTCTGGTCAAGCCACACAGACCCCTGACACTGACCTGCAGCTTCAAGCGGCTTTAG
 CCTGAGCACAAGCGGCATGAGCGTCCGGTGGATTAGACAGCCTCCTGGCAAAGCCCTGGAATGGCTGGCCGACATTTGGTGG
 GACGACAAGAAGGACTACAACCCAGCCTGAAGTCCCGGCTGACCATCAGCAAGGACACCAAGCAAGAACAGGTGGTGTGAA
 AGTGACCAACATGGACCTGCCGACACCGCCACTACTGTGCCAGATCCATGATCACCAACTGGTACTTTCAGCTGTGGGG
 ACGCGGCACCACAACCTCTCTTCA (SEQ ID NO: 117)

>Аминокислотная последовательность сигнального пептида в анти-PCB emAb AAB человека
 MATGSRITLLAFGLLCLPWLQEGSA (SEQ ID NO: 118)

>Аминокислотная последовательность легкой цепи чPCB в анти-PCB emAb AAB человека
 MATGSRITLLAFGLLCLPWLQEGSADIQMTQSPSTLSASVGDRTVITCKQLSVGYMHWYQQKPKGKAPKLLIYDTSKLAGVPSRFS
 GSGSGTEFTLTISLQPDFATYYCFQSGGYPTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD
 NALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 119)

>Аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи чPCB в анти-PCB emAb AAB человека
 DIQMTQSPSTLSASVGDRTVITCKQLSVGYMHWYQQKPKGKAPKLLIYDTSKLAGVPSRFSGSGTEFTLTISLQPDFATYYCF
 QGSGYPTFGGGTKLEIKR (SEQ ID NO: 120)

>Аминокислотная последовательность константной области легкой цепи каппа чPCB в анти-PCB emAb AAB человека
 TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLKADYEKHKVYACEV
 THQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 121)

>Аминокислотная последовательность линкера GSSG-streptag в анти-PCB emAb AAB человека
 GSSSGSGSNWHPQFEKGGGSGSNWHPQFEKGGGSGSNWHPQFEKGGGSGGAGG (SEQ ID NO: 122)

>Аминокислотная последовательность вариабельной тяжелой цепи чPCB в анти-PCB emAb AAB человека
 QVTLRESGPAIVKPTQTLTLCTFSGFSLSTSGMSVGVIRQPPGKALEWLADIWDDKKD
 YNPSLKSRLTKSNQVVLKVTNMPADTATYYCARSMITNWWYFDVWVAGTITVSS (SEQ ID NO: 123)

>Граница сплайсинга с фланкирующей последовательностью в анти-PCB emAb AAB человека
 CAGGTAAGTCTGCTGTCTGGGGATAGCGGGAGCCAGGTGACTGGGCCAGGCAAGGGCTTTGGATC (SEQ ID NO: 124)

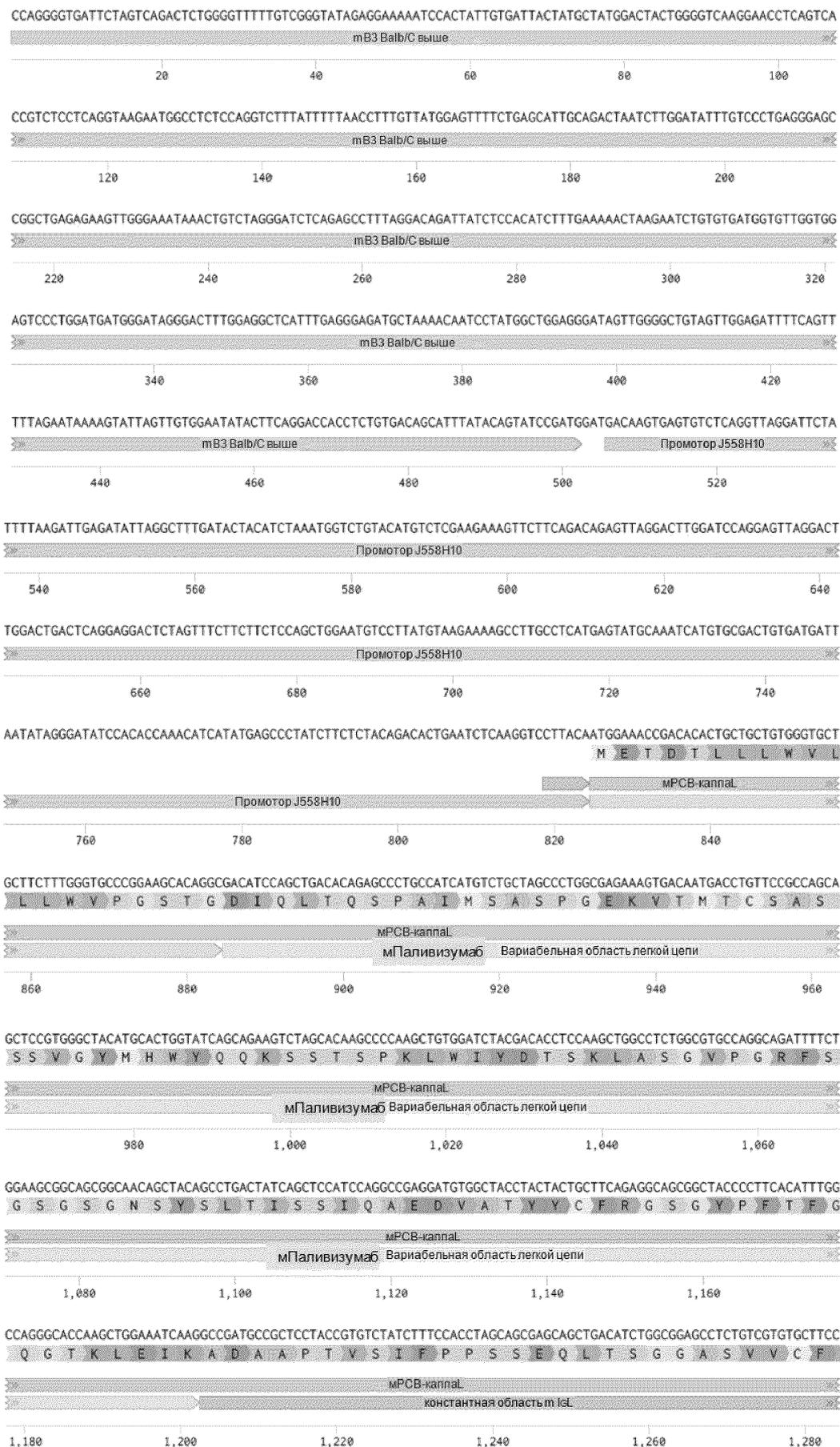
>Гомологичная область, расположенная ниже T7 человека в анти-PCB emAb AAB человека
 GTAGGACTGCAAGATCGCTGCACAGCAGCGAATCGTGAATATTTCTTTAGAATTATGAGGTGCGCTGTGTGTCAACCTGCATC
 TTAATTCCTTTATTGGCTGGAAAGAGAACTGTCGGAGTGGGTGAATCCAGCCAGGAGGGACGCGTACGCCCGGCTTTGATGAGA
 GCAGGTTGGGGCAGGGGTAGCCAGAAACCGTGGCTGCCGCTGACAGGGGCTTAGGGAGGCTCCAGGACCTCAGTGC
 CTTGAAGCTGTTTTCCATGAGAAAAGGATTGTTTACTTAGGAGGCATGCTTACTGTTAAAAGACAGGATATGTTTGAAGTGGCTT
 CTGAGAAAATGGTTAAGAAAATTATGACTTAAAATGTGAGAGATTTCAAGTATATTAATTTTTTAACTGTCCAAGTATTTGAAA
 TTCTTATCATTTGATTAACCCCATG (SEQ ID NO: 125)

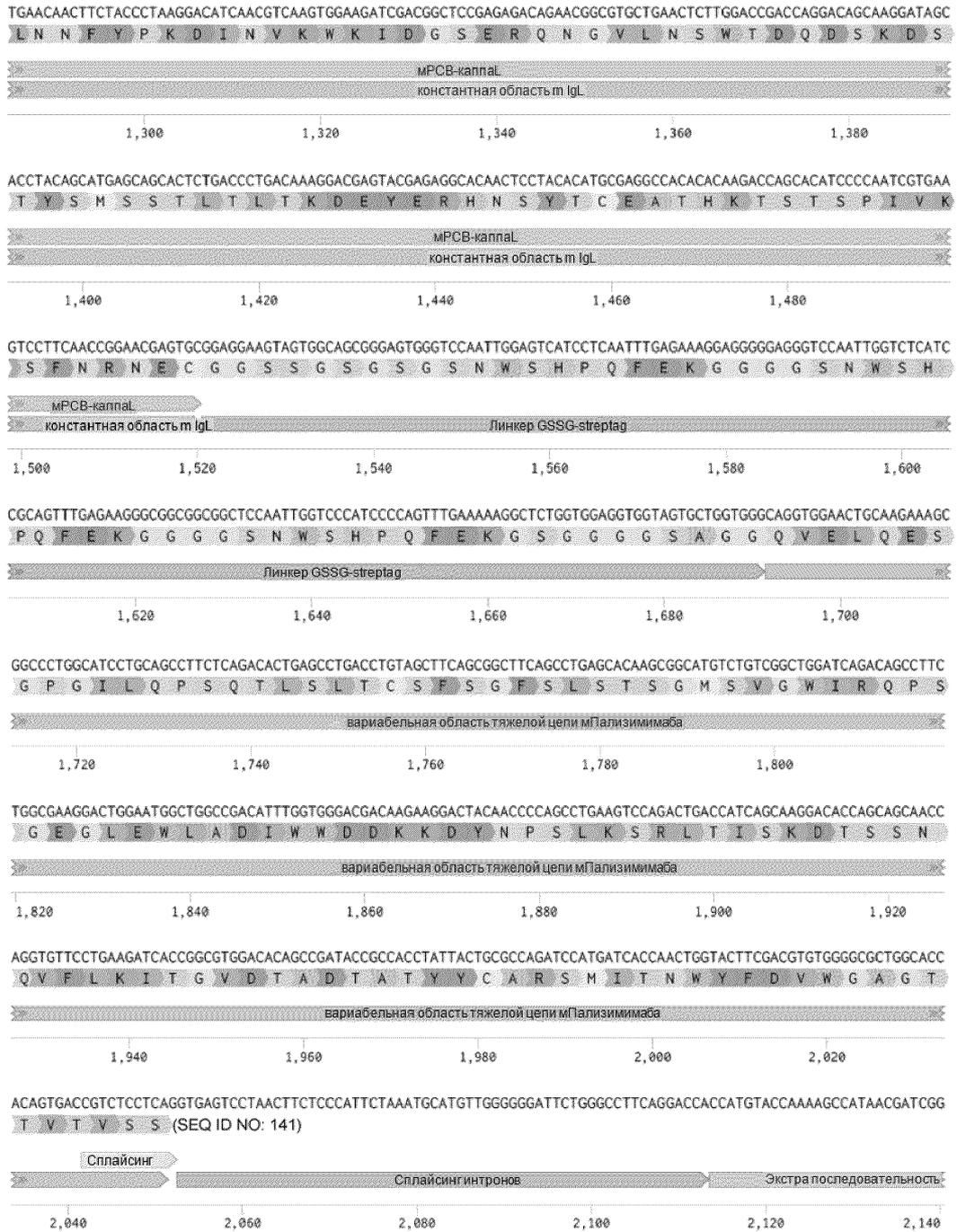
>Последовательность, кодирующая легкую цепь чPCB без сигнальной последовательности в анти-PCB emAb AAB человека
 GACATCCAGATGACACAGAGCCCTAGCACACTGTCTGCCAGCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACATGCAAGTGCCAGCTGAG
 CGTGGGCTACATGCACTGGTATCAGCAAAAAGCCCGGCAAGGCCCTAAGCTGCTGATCTACGATACCTCCAAGCTGGCCTCTG
 GCGTGCCCTCCAGATTTCTGGCAGCGGCAGCGGAACCGAGTTACCCCTGACCATCTCAAGCCTGCAGCCTGACGACTTCGCT
 ACGTACTACTGCTTCCAAGGCAGCGGCTACCCCTTACATTTGGCGGCGGAACAAAGCTGGAATCAAGCGGACTGTGGCCGC
 TCCTAGCGTGTTCATCTTTCCACCTAGCAGCAGCAGCTGAAGTCTGGCACTGCCTCTGTCTGTGCTGTGAAACAATTCTA
 CCTCGAGAGGCCAAGGTGCAAGTGAAGTGGACAATGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAAGAGTCTGTGACCGAGCAGGAC
 TCCAAGGATTCACCTACAGCCTGTCTAGCACCCTGACTCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAAGGTGTACGCCTGCGA
 AGTGACACACCAGGGACTGAGCAGCCCTGTGACCAAGAGCTTCAATCGGGGCGAGTGC (SEQ ID NO: 280)

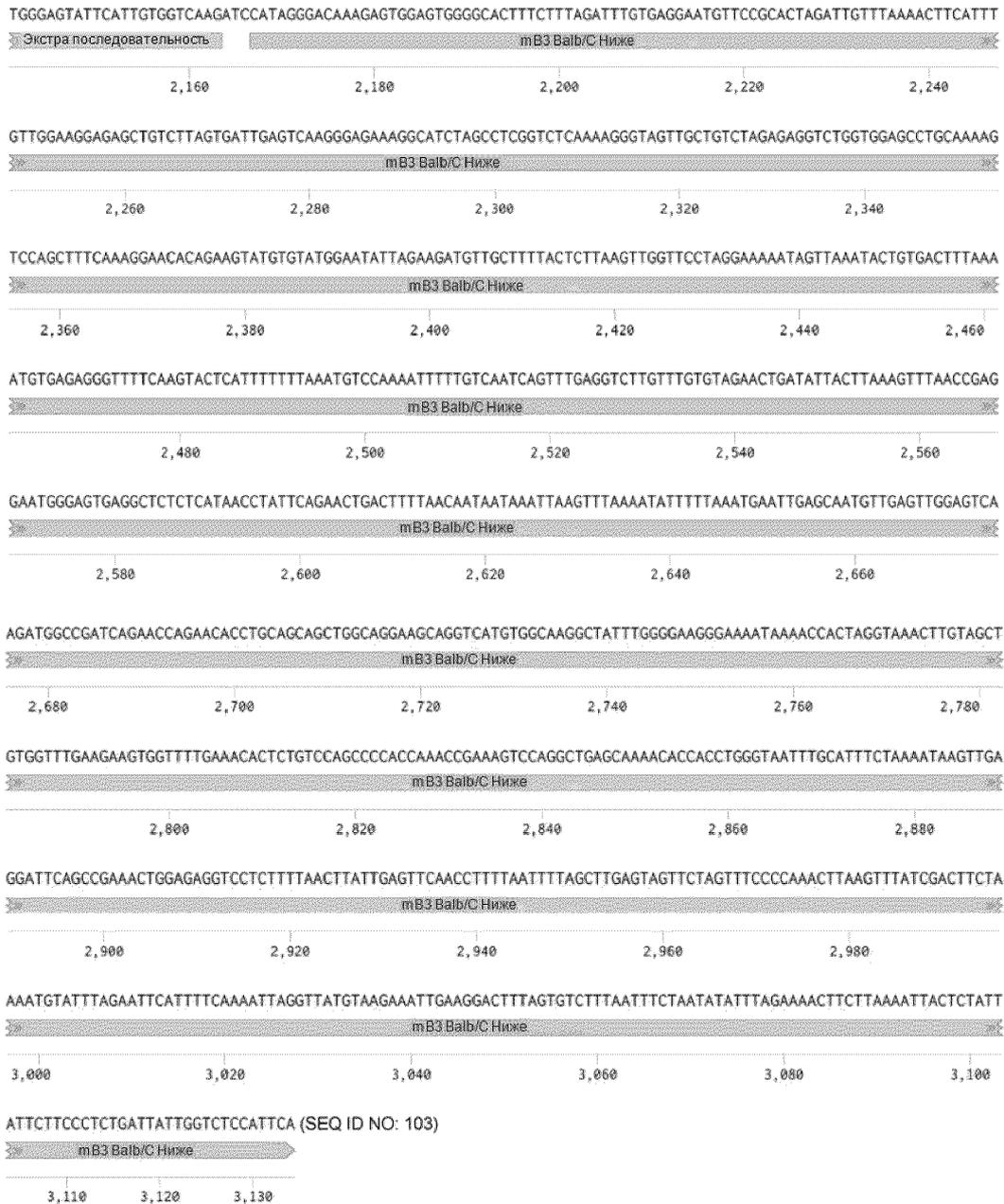
>Аминокислотная последовательность легкой цепи чPCB без сигнального пептида в анти-PCB emAb AAB человека
 DIQMTQSPSTLSASVGDRTVITCKQLSVGYMHWYQQKPKGKAPKLLIYDTSKLAGVPSRFSGSGTEFTLTISLQPDFATYYCF
 QGSGYPTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSL
 STLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 285)

Фиг. 25В

анти-PCB-emAb AAB мыши (3134 п.о)







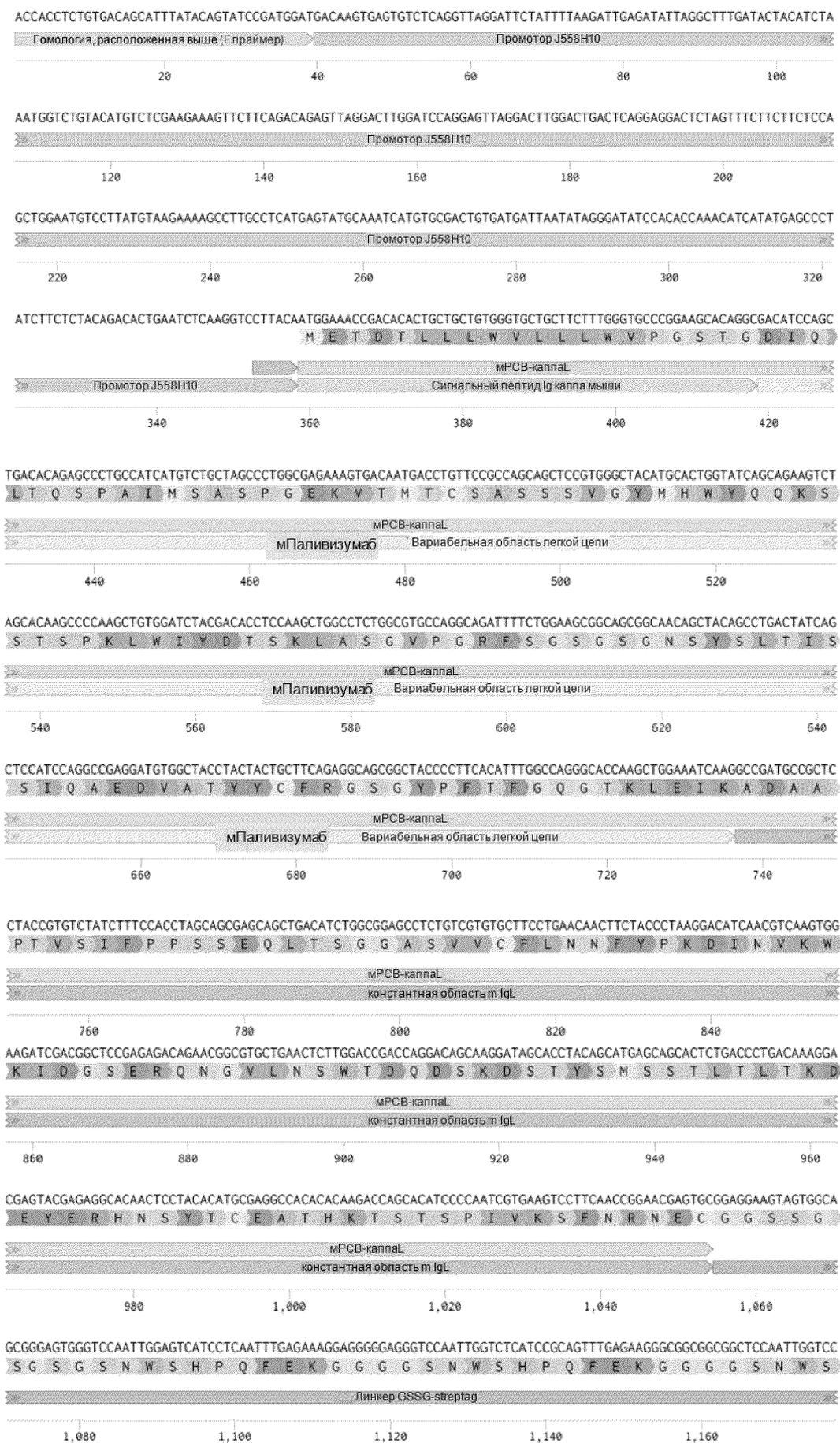
>Область, расположенная выше mB3 Balb/C мыши в анти-PCB emAb AAB мыши
 CCAGGGGTGATTCTAGTCAGACTCTGGGGTTTTGTCCGGTATAGAGGAAAAATCCACTATTGTGATTACTATGCTATGGACTAC
 TGGGGTCAAGGAACCTCAGTCAACCTCTCCAGGTAAGAATGGCCTCTCCAGGTCTTTATTTTAACTTTGTTATGGAGTTTTCT
 TGAGCATTGCAGACTAATCTTGGATATTTGTCCCTGAGGGAGCCGGCTGAGAGAAAGTTGGGAAATAAACTGTCTAGGGATCTCA
 GAGCCTTTAGGACAGATTATCTCCACATCTTTGAAAAAATAAGAAATCTGTGTGATGGTGTGGTGGAGTCCCTGGATGGGAT
 AGGGACTTTGGAGGCTCATTGAGGGAGATGCTAAAACAATCCATGCTGAGGGGATAGTTGGGGCTGTAGTTGGAGATTTCT
 AGTTTTAGAAATAAAGTATTAGTTGTGGAATATACTTCAGGACCACCTCTGTGACAGCATTTATACAGTATCCGATG (SEQ ID
 NO: 127)

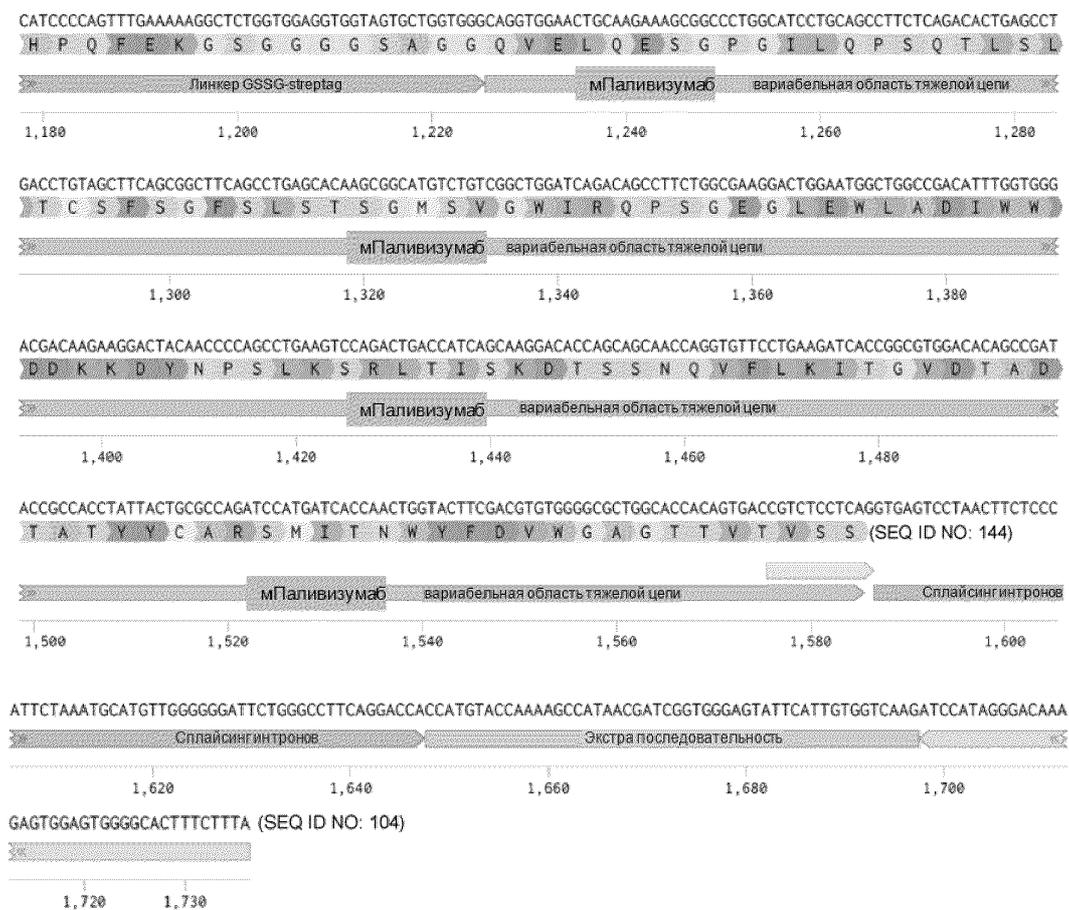
>Промотор J558H10 в анти-PCB emAb AAB мыши
 GACAAGTGAAGTCTCAGGTTAGGATTTCTATTTAAGATTGAGATATTAGGCTTTGATACTACATCTAAATGGTCTGTACATGTCT
 CGAAGAAAGTCTTCCAGACAGAGTTAGGACTTGGATCCAGGAGTTAGGACTTGGACTGACTCAGGAGGACTTAGTTTCTTCTTCT
 TCCAGCTGGAAATGTCCCTTATGTAAGAAAAGCCTTGCCTCATGAGTATGCAAAATCATGTGCGACTGTGATGATTAATATAGGGATAT
 CCACACCAAAACATCATATGAGCCCTATCTTCTACAGACTGAATCTCAAGTCTTACA (SEQ ID NO: 128)

>Последовательность, кодирующая сигнальный пептид в анти-PCB emAb AAB мыши
 ATGGAACCGACACACTGCTGCTGTGGGTGCTGCTTCTTTGGGTGCCCGAAGCACAGGC (SEQ ID NO: 129)

>Последовательность, кодирующая легкую цепь kappa мРСВ в анти-PCB emAb AAB мыши
 ATGGAACCGACACACTGCTGCTGTGGGTGCTGCTTCTTTGGGTGCCCGAAGCACAGGC
 GACATCCAGCTGACACAGAGCCCTGCCATCATGTCTGCTAGCCCTGGCGAGAAAAGTACAATGACCTGTTCCGCCAGCAGCTC
 CGTGGGCTACATGCACTGGTATCAGCAGAAGTCTAGCACAAGCCCAAGCTGTGGATCTACGACACCTCCAAGCTGGCCTCTG
 GCCTGCCAGGCAGATTTTCTGGAAGCGGCAGCGGCAACAGCTACAGCCTGACTATCAGCTCCATCCAGGCCGAGGATGTGGCT
 ACCTACTACTGCTTCCAGAGGCAAGCGGCTACCCCTTCAATTTGGCCAGGGCACCAAGCTGGAATCAAGGCCGATGCCGCTCC
 TACCGTGTCTATCTTTCCACCTAGCAGCGAGCAGCTGACATCTGGCGGAGCCTCTGTCGTGTGCTTCTGAAACACTTCTACCT
 AAGGACATCAACGCTCAAGTGAAGATGACAGCGCTCCGAGAGACAGAACGGCTGTGCTGAACCTTTGGACCGACACAGGACAGCAA
 GGATAGCACTACAGCATGAGCAGCACTCTGACCTTGACAAAGGACGAGTACGAGAGGCAACACTCTACACATGCGAGGCCA
 CACACAAGACCAGCACATCCCAATCGTGAAGTCTTCAACCGAAGCAGTGC (SEQ ID NO: 130)

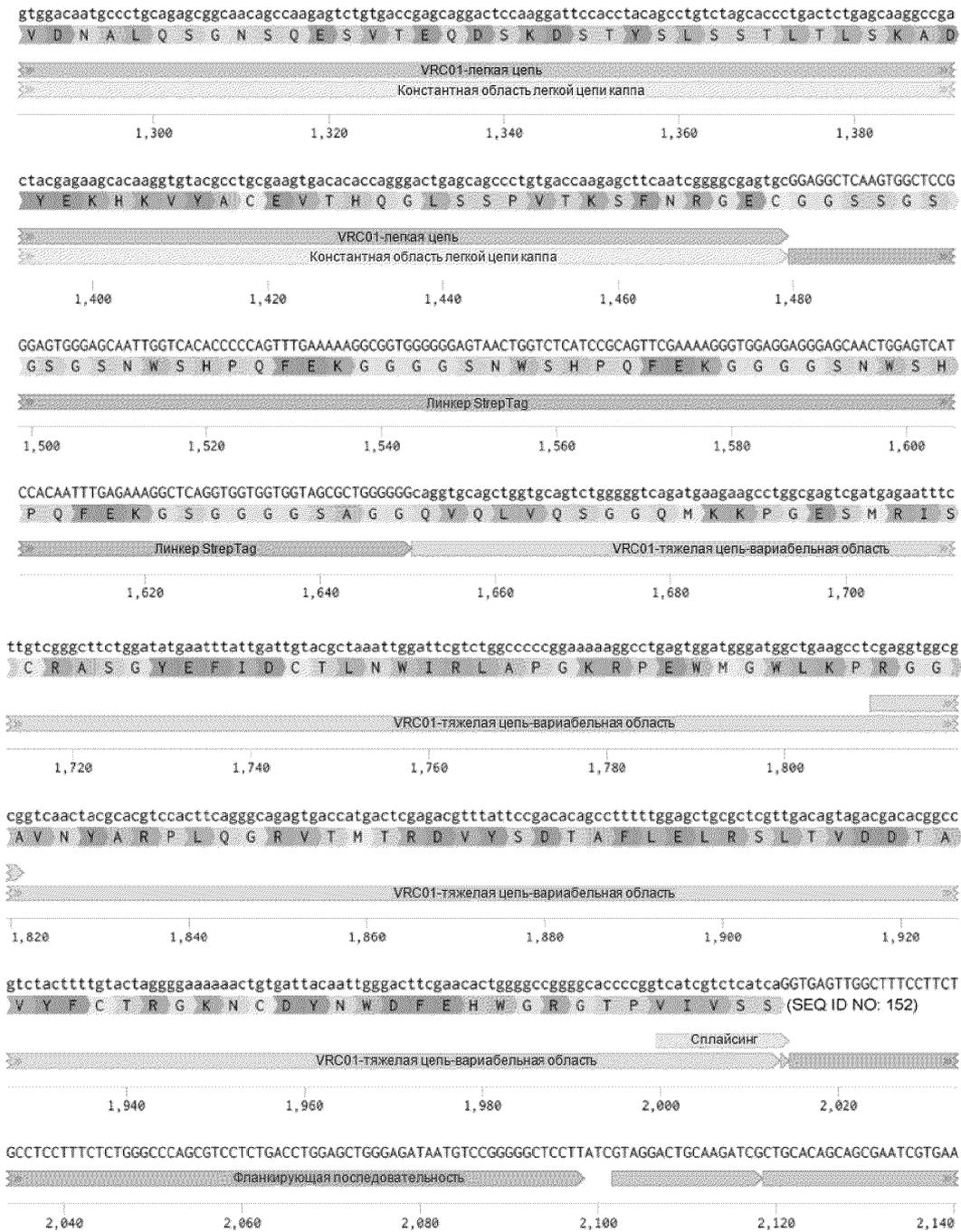
ms-emAb-RSV-дцДНК (1736 п.о.)





- >Последовательность гомологичной области, расположенной выше (F праймер) в ms-emAb-RSV-дцДНК ACCACCTCTGTGACAGCATTATACAGTATCCGATGGAT (SEQ ID NO: 142)
- >Промотор J558H10 в ms-emAb-PCB-дцДНК в SEQ ID NO: 128
- >Последовательность, кодирующая сигнальный пептид в ms-emAb-RSV-дцДНК представляет собой SEQ ID NO: 129
- >Последовательность, кодирующая легкую цепь мПаливизумаба в ms-emAb-RSV-дцДНК представляет собой SEQ ID NO: 130
- >Последовательность, кодирующая варибельной области легкой цепи мПаливизумаба в ms-emAb-RSV-дцДНК представляет собой SEQ ID NO: 131
- >Последовательность, кодирующая константную область легкой цепи каппа мПаливизумаба в ms-emAb-RSV-дцДНК представляет собой SEQ ID NO: 132
- >Последовательность, кодирующая линкер GSSG-streptag в ms-emAb-RSV-дцДНК представляет собой SEQ ID NO: 116
- >Последовательность, кодирующая варибельную область тяжелой цепи мПаливизумаба в ms-emAb-RSV-дцДНК представляет собой SEQ ID NO: 133
- >Аминокислотная последовательность сигнального пептида в ms-emAb-RSV-дцДНК представляет собой SEQ ID NO: 134
- >Аминокислотная последовательность легкой цепи мПаливизумаба в ms-emAb-RSV-дцДНК представляет собой SEQ ID NO: 135
- >Аминокислотная последовательность варибельной области легкой цепи мПаливизумаба в ms-emAb-RSV-дцДНК представляет собой SEQ ID NO: 136
- >Аминокислотная последовательность константной области легкой цепи каппа мПаливизумаба представляет собой ms-emAb-RSV-дцДНК представляет собой SEQ ID NO: 137
- >Аминокислотная последовательность линкера GSSG-streptag в ms-emAb-RSV-дцДНК представляет собой SEQ ID NO: 122
- >Аминокислотная последовательность варибельной области тяжелой цепи мПаливизумаба представляет собой ms-emAb-RSV-дцДНК представляет собой SEQ ID NO: 138
- >Граница сплайсинга с фланкирующей последовательностью в ms-emAb-RSV-дцДНК представляет собой SEQ ID NO: 139
- >Последовательность гомологичной области, расположенной ниже в ms-emAb-RSV-дцДНК ATCCATAGGGACAAAGAGTGGAGTGGGGCACTTTCTTTA (SEQ ID NO: 143)
- >Последовательность, кодирующая легкую цепь мПаливизумаба без сигнальной последовательности в ms-emAb-RSV-дцДНК представляет собой SEQ ID NO: 281
- >Аминокислотная последовательность легкой цепи мПаливизумаба без сигнального пептида в ms-emAb-RSV-дцДНК представляет собой SEQ ID NO: 286

Фиг. 25D



ATATTTCTTTAGAAATATGAGGTGCGTGTGTGCAACCTGCATCTTAAATCTTTATTGGCTGGAAGAGAAGTGTGGAGTGGTGAATCCAGCCAGGAGGGAC
 >Гомологичная область, расположенная ниже T7 человека

2,160 2,180 2,200 2,220 2,240

CGCTAGCCCCGGTCTTGATGAGAGCAGGGTTGGGGCAGGGGTAGCCAGAAACGGTGGCTGCCGTCTGACAGGGGCTTAGGGAGGCTCCAGGACCTCAGTGCCTT
 >Гомологичная область, расположенная ниже T7 человека

2,260 2,280 2,300 2,320 2,340

GAACTGGTTTCCATGAGAAAAGGATTGTTTATCTTAGAGGCATGCTTACTGTTAAAGACAGGATATGTTTGAAGTGGCTTCTGAGAAAAATGTTAAGAAAAAT
 >Гомологичная область, расположенная ниже T7 человека

2,360 2,380 2,400 2,420 2,440 2,460

ATGACTAAAAATGTGAGAGATTTCAAGTATATAATTTTTTAAGTGTCCAGTATTTGAAATCTTATCATTTGATTAACACCCATG (SEQ ID NO: 105)
 >Гомологичная область, расположенная ниже T7 человека

2,470 2,480 2,490 2,500 2,510 2,520 2,530 2,540 2,550

>Гомологичная область, расположенная выше T7 человека в Hu-emAb-VRC01-AAV представляет собой SEQ ID NO: 110

>Промотор IgVH1-69 в Hu-emAb-VRC01-AAV представляет собой SEQ ID NO: 111

>Последовательность, кодирующая сигнальный пептид в Hu-emAb-VRC01-AAV представляет собой SEQ ID NO: 112

>Последовательность, кодирующая легкую цепь VRC01 в Hu-emAb-VRC01-AAV

ATGGCTACCGGCAGCAGAAACAAGCCTGCTGCTCGCTTTGGACTGCTGCTGCTCCCTGGTTGCAAGAAGGCAGCGCCGAAAT
 GTGTTGACACAGTCTCCAGGCACCTGCTTTGCTCCAGGGAAACAGCCATCATCTCTTGTCCGACCAAGTATGTTCC
 TTAGCCTGGTATCAACAGAGGCCCGGGCCAGGCCCCAGGCTCGTATCATCTATCCGGGCTCTACTCGGGCCGCTGGCATCCAGA
 CAGGTTACAGCGGCACTCGGTGGGGCCAGACTACAATCTCACCATCAGCAACCTGGAGTCGGGAGATTTGGTGTATTATTG
 CCAGCAGTATGAATTTTTGGCCAGGGGACCAAGTCCAGGTCGACATTAAGCGCACTGTGGCCGCTCCTAGCGTGTTCATCTT
 TCCACCTAGCGACGAGCAGCTGAAGTCTGGCACTGCGCTGTGCTGTGCCTGTGTAACAATCTTACCCCTCGAGAGGCCAAGG
 TGCAGTGGAAAGTGGACAATGCCCTGCAGAGCGGGCAACAGCCAAAGAGTCTGTGACCGAGCAGGACTCCAAGGATTCACCTAC
 AGCCTGTCTAGCACCTCTGACTCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCCTGCGAAGTGACACACCAGGGACT
 GAGCAGCCCTGTGACCAAGAGCTTCAATCGGGGGGAGTGC (SEQ ID NO: 145)

>Последовательность, кодирующая переменную область легкой цепи VRC01 в Hu-emAb-VRC01-AAV

GAAATGTGTTGACACAGTCTCCAGGCACCTGCTTTGCTCCAGGGGAAACAGCCATCATCTCTTGTCCGACCAAGTATG
 GTTCTTAGCCTGGTATCAACAGAGGCCCGGGCCAGGCCCCAGGCTCGTATCATCTATCCGGGCTCTACTCGGGCCGCTGGCATC
 CAGACAGGTTCCAGCGCAGTCCGGTGGGGCCAGACTACAATCTCACCATCAGCAACCTGGAGTCGGGAGATTTGGTGTTTA
 TTATTGCCAGCAGTATGAATTTTTGGCCAGGGGACCAAGGTCCAGGTCGACATTAAGCGC (SEQ ID NO: 146)

>Последовательность, кодирующая константную область легкой цепи каппа в Hu-emAb-VRC01-AAV представляет собой SEQ ID NO: 115

>Последовательность, кодирующая GSSG-streptag линкера в Hu-emAb-VRC01-AAV представляет собой SEQ ID NO: 116

>Последовательность, кодирующая переменную область тяжелой цепи VRC01 в Hu-emAb-VRC01-AAV

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGTCCAGATGAAGAAGCCTGGCGAGTCGATGAGAATTTCTTGTCCGGGCTCTCGGATATGA
 ATTTATTGATTGTACGCTAAATGGATTCTGTCGGCCCGGAAAGCCCTGAGTGGATGGGATGGCTGAAGCCTCGAGGTGG
 CGCGGTCAACTACGCACGCTCCACTTCCAGGGCAGAGTACCATGACTCGAGAGCTTTATCCGACACAGCCTTTTGGAGTGGC
 CTCGTTGACAGTAGACGACAGCCGCTCTACTTTTGTACTAGGGGAAAAAAGTGTGATTACAATTTGGGACTTCGAACACTGGGG
 CCGGGGCACCCCGTCTCGTCTCATCA (SEQ ID NO: 147)

>Аминокислотная последовательность сигнального пептида в Hu-emAb-VRC01-AAV представляет собой SEQ ID NO: 118

>Аминокислотная последовательность легкой цепи VRC01 в Hu-emAb-VRC01-AAV

MATGSRTSLLAFGLLCLPWLQEGSAEIVLTQSPGTLSPGETAIIISCRISQYGLAWYQQRPGQAPRLVIYSGSTRAAGIPDRFSGS
 RWGPDYNTISNLESGDFGVYCCQYEFFGQGTQVQVDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPYREAKVQWVKVDNAL
 QSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 148)

>Аминокислотная последовательность переменной области легкой цепи VRC01 в Hu-emAb-VRC01-AAV

EIVLTQSPGTLSPGETAIIISCRISQYGLAWYQQRPGQAPRLVIYSGSTRAAGIPDRFSGSRWGPYDYNLTISNLESGDFGVYCCQ
 YEFFGQGTQVQVDIKR (SEQ ID NO: 149)

>Аминокислотная последовательность константной области легкой цепи каппа в Hu-emAb-VRC01-AAV представляет собой SEQ ID NO: 121

>Аминокислотная последовательность линкера GSSG-streptag в Hu-emAb-VRC01-AAV представляет собой SEQ ID NO: 122

>Аминокислотная последовательность переменной области тяжелой цепи VRC01 в Hu-emAb-VRC01-AAV

QVQLVQSGGQMKPKGEMRISRASGYEFIDCTLNWIRLAPGKRPVWMLKPRGGAVNYARPLQGRVTMTRDVSDFLELRLSL
 TVDDTAIFYFCTRGKNCNDYNWDFEHWGRGTPVIVSS (SEQ ID NO: 150)

>Граница сплайсинга с фланкирующей последовательностью в конструкциях настоящего изобретения

CAGGTGAGTTGGCTTCTCTGCTCCTTTCTGCGCCAGCTCCTCTGACCTGGAGCTGGGAGATAATGTCGGGGGGCT
 CCTT (SEQ ID NO: 151)

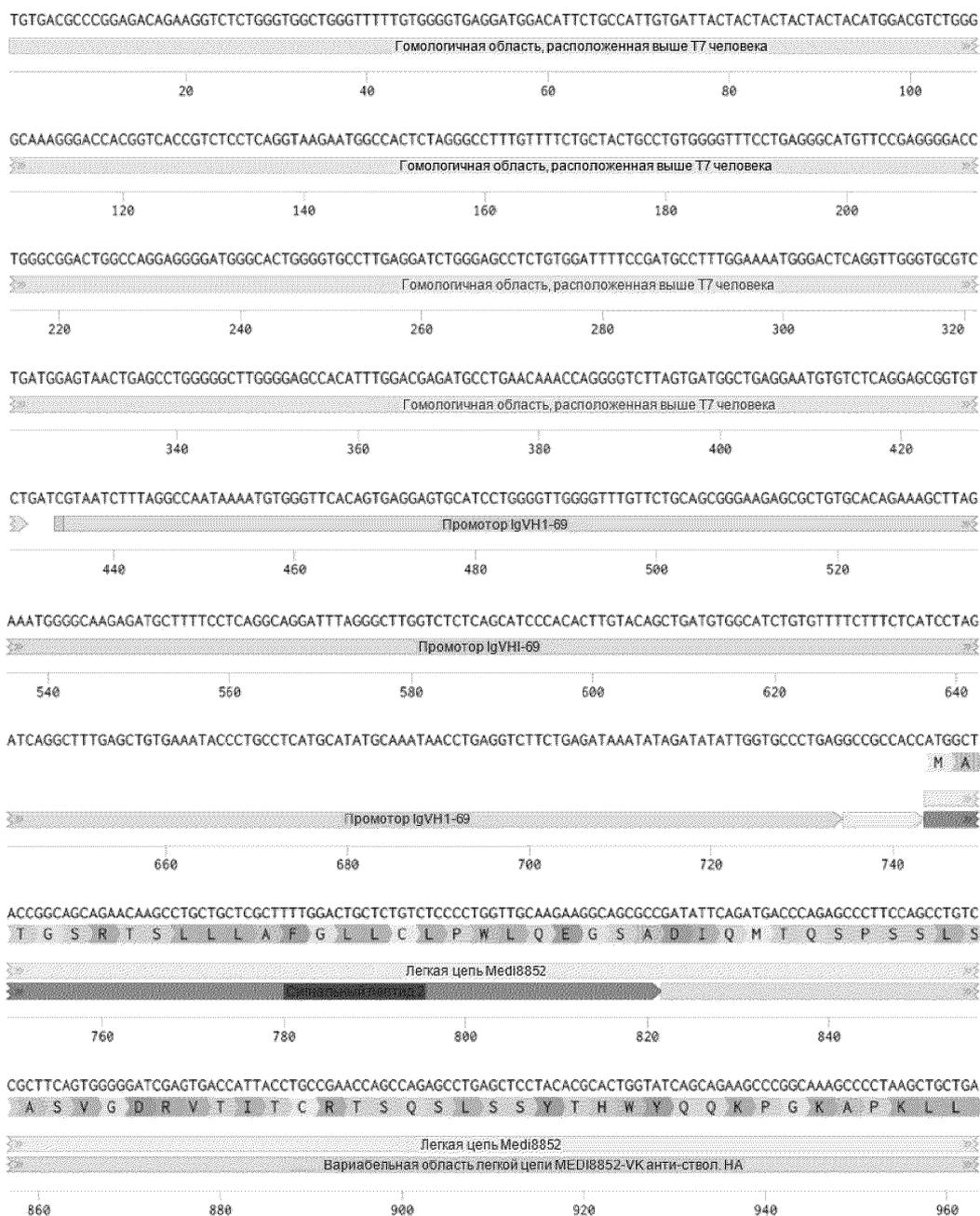
>Гомологичная область, расположенная ниже T7 человека в Hu-emAb-VRC01-AAV представляет собой SEQ ID NO: 125

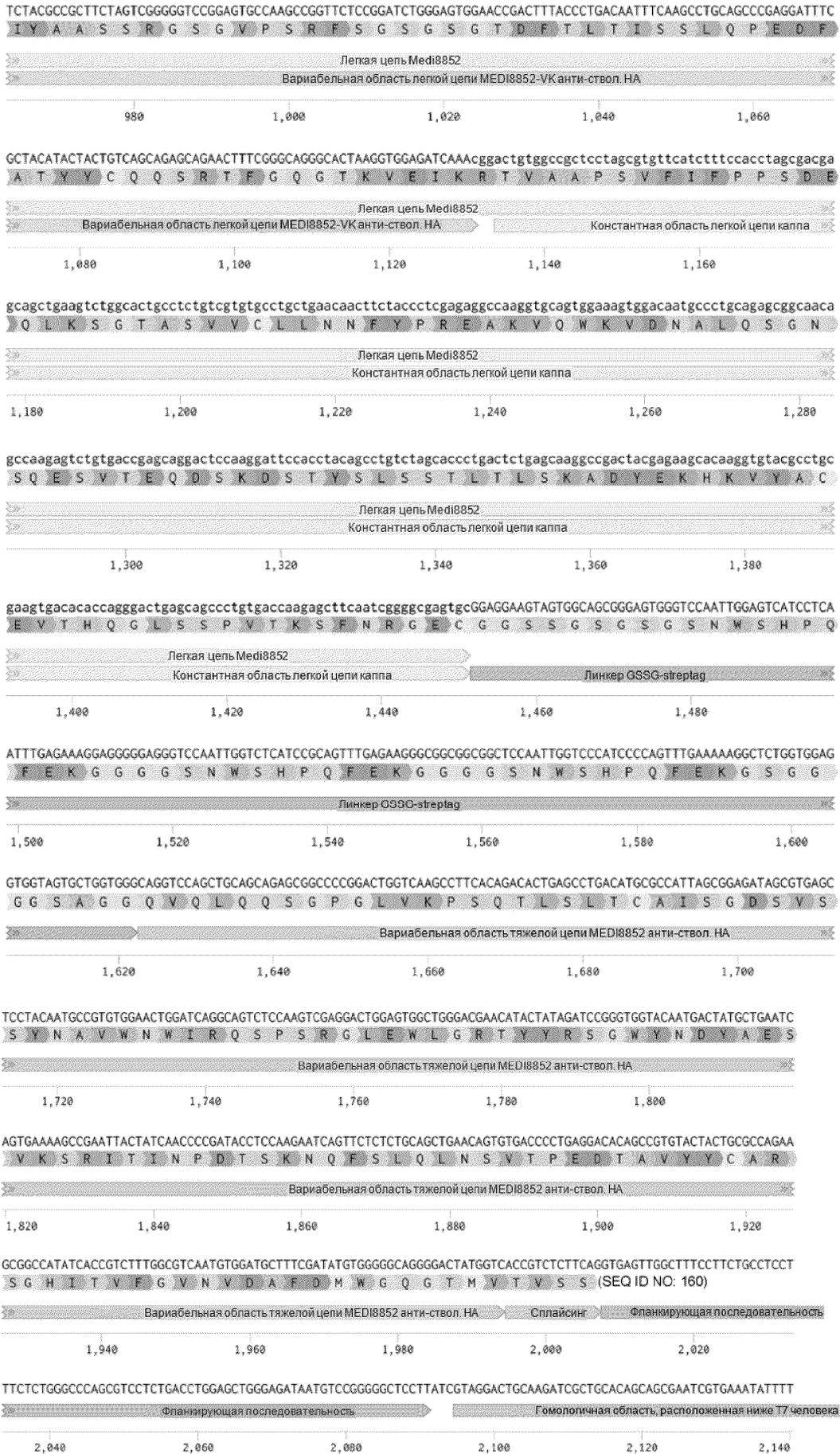
>Последовательность, кодирующая легкую цепь VRC01 без сигнальной последовательности в Hu-emAb-VRC01-AAV
 GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAACAGCCATCATCTCTTGTCCGACCAGTCAGTATG
 GTTCCTTAGCCTGGTATCAACAGAGGCCGGCCAGGCCCCAGGCTCGTCATCTATTCCGGGCTCTACTCGGGCCGCTGGGCATC
 CCAGACAGGTTACAGCGGCAGTCGGTGGGGGCCAGACTACAATCTCACCATCAGCAACCTGGAGTCGGGAGATTTTGGTGTTTA
 TTATTGCCAGCAGTATGAATTTTTGGCCAGGGGACCAAGGTCCAGGTCGACATTAAGCGCACTGTGGCCGCTCCTAGCGTGT
 CATCTTTCCACCTAGCGACGAGCAGCTGAAGTCTGGCACTGCCCTGTGCTGTGCTGTGCTGAACAACCTTACCCTCGAGAGGC
 CAAGGTGCAGTGGAAAGTGGACAAATGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAAAGTCTGTGACCGAGCAGGACTCCAAGGATTTCCA
 CCTACAGCCTGTCTAGCACCCCTGACTCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGCGAAGTGACACACCAG
 GGACTGAGCAGCCCTGTGACCAAGAGCTTCAATCGGGGCGAGTGC (SEQ ID NO: 282)

>Аминокислотная последовательность легкой цепи VRC01 без сигнального пептида в Hu-emAb-VRC01-AAV
 EIVLTQSPGTLISLSPGETAIIISCRTSQYGLAWYQQRPGQAPRLVIYSGSTRAAGIPDRFSGSRWGPDYNLITISNLESGDFGVVYCCQ
 YEFFGQGTKVQVDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVIVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLT
 LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 287)

Фиг. 25Е

hu-emAb-Medi8852-AAV (2544 н.о.)



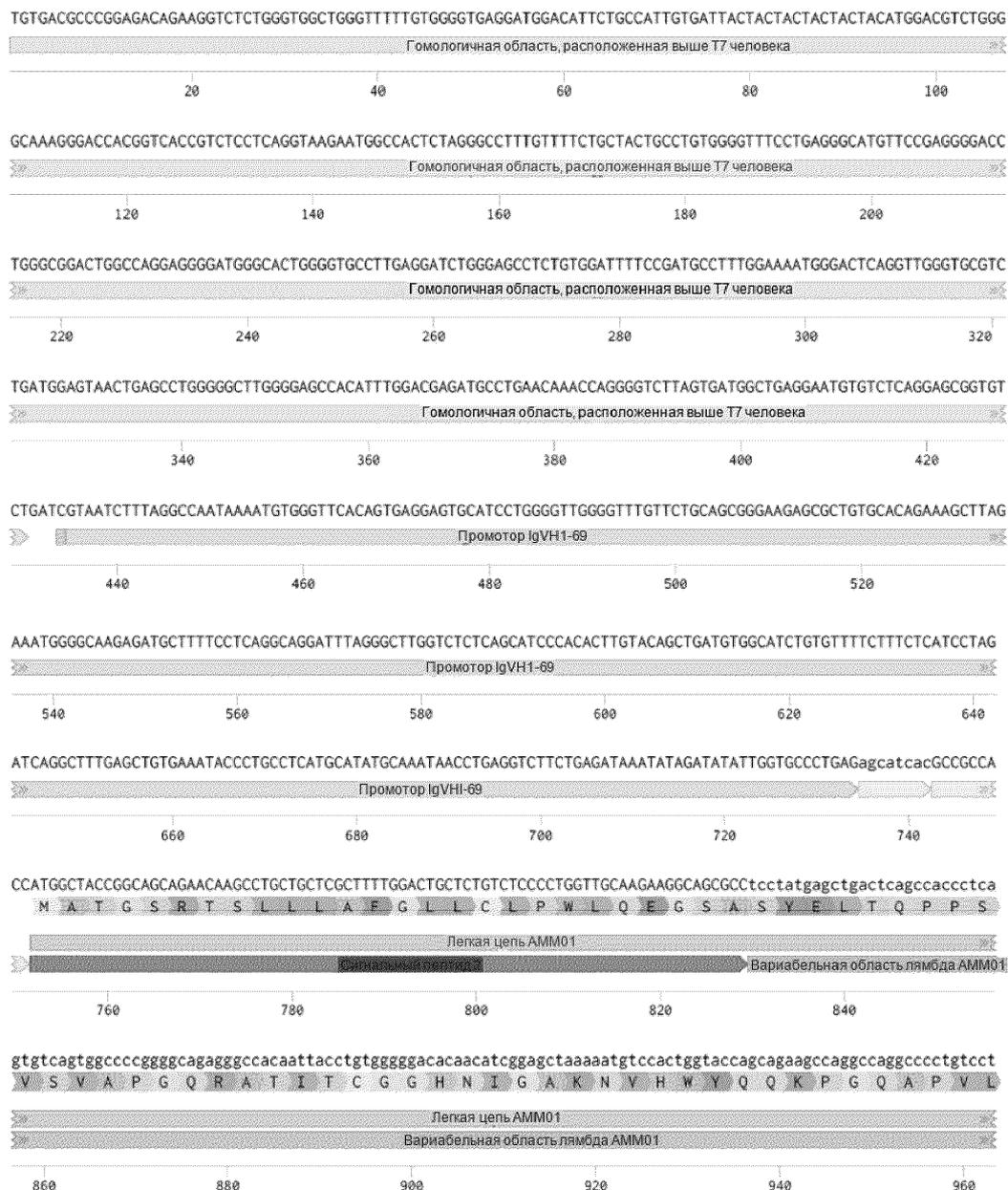


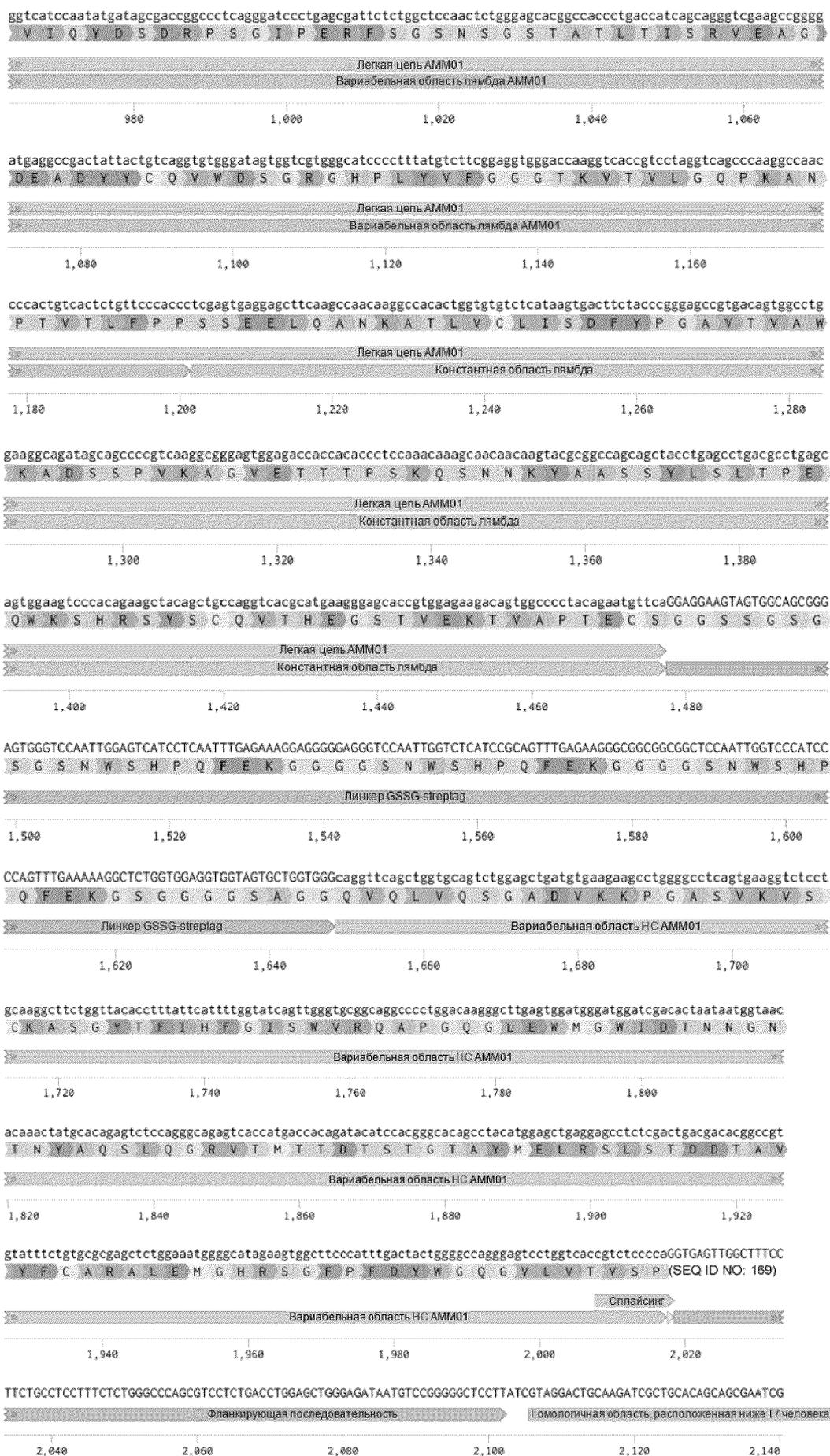
>Последовательность, кодирующая легкую цепь Medi8852 без сигнальной последовательности в hu-emAb-Medi8852-AAV
 GATATTCAGATGACCCAGAGCCSTTCCAGCCTGTCCGCTTCAGTGGGGGATCGAGTGACCATTACCTGCCGAACCAGCCAGAG
 CCTGAGCTCCTACACGCACTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCAAGCCCTAAGCTGCTGATCTACGCCGCTTCTAGTCGGGGGT
 CCGGAGTGCCAAAGCCGGTCTCCGGATCTGGGAGTGGAAACCCGACTTTACCCTGACAATTTCAAGCCTGCAGCCCGAGGATTTCC
 GCTACATACTACTGTGACGAGCAGAACTTTCGGGCAGGGCACTAAGGTGGAGATCAAACGGACTGTGGCCGCTCTAGCGT
 GTTCATCTTCCACCTAGCGACGAGCAGCTGAAGTCTGGCACTGCCTCTGTCTGTGCTGCTGAACAACCTTACCCCTCGAGA
 GGCCAAAGTGCAGTGGAAAGTGGACAATGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAAGAGTCTGTGACCGAGCAGGACTCCAAGGAT
 TCCACCTACAGCCTGTCTAGCACCCCTGACTCTGAGCAAGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCCTGCCAAGTGACACA
 CCAGGGACTGAGCAGCCCTGTGACCAAGAGCTTCAATCGGGGCGAGTGC (SEQ ID NO: 283)

>Аминокислотная последовательность легкой цепи Medi8852 без сигнального пептида в hu-emAb-Medi8852-AAV
 DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRISQSLSSYTHWYQQKPKGAPKLLIYAASSRSGVPSRFSGSGSGTDFLTISSLQPEDFATYYC
 QQSRTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKIDSTYLSLSTL
 LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 288)

Фиг. 25F

hu-emAb-AMM01-AAV (2555 н.о.)





TGAAATATTTCTTTAGAAATTATGAGGTGCGCTGTGTCAACCTGCATCTTAAATCTTTATTGGCTGGAAAGAGAACTGTCGGAGTGGTGAATCCAGCCAGGAG
 Гомологичная область, расположенная ниже T7 человека

2,160 2,180 2,200 2,220 2,240

GGACCGTAGCCCGGTCTTATGAGAGCAGGGTGGGGCAGGGGTAGCCAGAAAACGGTGGCTGCCCTGACAGGGGCTTAGGGAGGCTCCAGGACCTCACTG
 Гомологичная область, расположенная ниже T7 человека

2,260 2,280 2,300 2,320 2,340

CCTGAAGCTGGTTCCATGAGAAAAGGATTGTTTATCTTAGGAGGCATGCTTACTGTTAAAAGACAGGATATGTTGAAGTGGCTTCTGAGAAAATGGTTAAGAA
 Гомологичная область, расположенная ниже T7 человека

2,360 2,380 2,400 2,420 2,440 2,460

AATTAGCTAAAAATGTGAGAGATTTCAAGTATATTAATTTTTAACTGTCCAAGTATTTGAAATCTTATCATTTGATTAACACCCATG (SEQ ID NO: 107)
 Гомологичная область, расположенная ниже T7 человека

2,470 2,480 2,490 2,500 2,510 2,520 2,530 2,540 2,550

>Гомологичная область, расположенная выше T7 человека в hu-emAb-AMM01-AAV

представляет собой SEQ ID NO: 153

>Промотор IgVH1-69 в hu-emAb-AMM01-AAV представляет собой SEQ ID NO: 111

>Последовательность, кодирующая сигнальный пептид в hu-emAb-AMM01-AAV представляет

ATGGCTACCGGCAGCAGAACAAGCCTGCTGCTCGCTTTTGGACTGCTCTGCTCCCTGGTTGCAAGAAGGCAGCGCCTCCTAT
 GAGCTGACTCAGCCACCCTCAGTGTCACTGGCCCCGGGGCAGAGGGCCACAATTAACCTGTGGGGGACACAACATCGGAGCTA
 AAAATGTCCACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGCCAGGCCCTGTCTGGTCAATCAATATGATAGCCAGCCGCGCCCTCAGGGATC
 CCTGAGCGATTCTGGCTCCAACCTCTGGGAGCACGGCCACCTGACCATCAGCAGGGTGAAGCCGGGGATGAGGCCACT
 ATTACTGTCAAGTGTGGGATAGTGGTGTGGGCATCCCCCTTTATGTCTTCGGAGGTGGGACCAAGGTCACCGTCTTAGGTCAGC
 CCAAGGCCAACCCCACTGCTACTCTGTTCCACCCCTCGAGTGAAGGAGCTTCAAGCCAAACAAGGCCACACTGGTGTGTCTATAA
 GTGACTTCTACCCGGGAGCCGTGACAGTGGCCTGGAAGGCAGATAGCAGCCCGTCAAGGCCGGGAGTGGAGACCACACACC
 CTCCAAACAAGCAACAACAAGTACGCGGCCAGCAGCTACCTGAGCCTGACGCGCTGAGCAGTGGAAAGTCCACAGAAGCTACA
 GCTGCCAGGTACAGCAAGAAGGGAGCACCCTGGAGAAGCAGTGGCCCTACAGAAATGTCATCA (SEQ ID NO: 161)

>Последовательность, кодирующая варибельную область легкой цепи лямбда AMM01 в hu-emAb-AMM01-AAV

TCSTATGAGCTGACTCAGCCACCCTCAGTGTCACTGGCCCCGGGGCAGAGGGCCACAATTAACCTGTGGGGGACACAACAATCGG
 AGCTAAAAATGTCCACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGCCAGGCCCTGTCTGGTCAATCAATATGATAGCCAGCCGCGCCCTCAG
 GGATCCCTGAGCGATTCTCTGGCTCCAACCTCTGGGAGCACGGCCACCCCTGACCATCAGCAGGGTGAAGCCGGGGATGAGGC
 CGACTTACTGTCAAGTGTGGGATAGTGGTGTGGGCATCCCCCTTTATGTCTTCGGAGGTGGGACCAAGGTCACCGTCTTAGG
 TCAGCCCAAGGCCAACCCCACTGCTACTCTGTTCCACCC (SEQ ID NO: 162)

>Последовательность, кодирующая константную область легкой цепи лямбда в hu-emAb-AMM01-AAV

TCGAGTGAGGAGCTTCAAGCCAAACAAGGCCACACTGGTGTGTCTATAAGTACTTACCCGGGAGCCGTGACAGTGGCCTG
 GAAGGCAGATAGCAGCCCGTCAAGGCCGGGAGTGGAGACCACCCACCCCTCCAAACAAGCAACAACAAGTACGCGGCCAGC
 AGCTACCTGAGCCTGACGCTGAGCAGTGGAAAGTCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTACCGCATGAAGGGAGCACCCTGG
 AGAAGACAGTGGCCCTACAGAATGTTCA (SEQ ID NO: 163)

>Последовательность, кодирующая линкер GSSG-streptag в hu-emAb-AMM01-AAV представляет собой SEQ ID NO: 116

>Последовательность, кодирующая варибельную область тяжелой цепи AMM01 в hu-emAb-AMM01-AAV

CAGGTTCAAGTGTGAGTGTGAGGAGTGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCCTGCAAGGCTTCTGGTTACAC
 CTTTATTTGATTTGGTATCAGTTGGGTGCGGCAGGCCCTGGACAAGGCTTGAAGTGGATGGGATGGATCGACACTAATAATGG
 TAACACAATATGACAGAGTCTCCAGGGCAGAGTCAACATGACACAGATACATCCACGGGCACAGCCTACATGGAGCTGAG
 GAGCCTCTCGACTGACGACACGGCCGTGATTTCTGTGCGGAGCTGGAAATGGGGCATAGAAGTGGCTTCCCATTTGACTA
 CTGGGGCCAGGGAGTCTGGTCAACCGTCTCCCA (SEQ ID NO: 164)

>Аминокислотная последовательность сигнального пептида в hu-emAb-AMM01-AAV

представляет собой SEQ ID NO: 118

MATGSRSLLLAFGLLCLPWLQEGSASYELTQPPSVSVAPGQRATITCGGHNIGAKNVHWYQQKPGQAPVLIQYDSDRPSGIPERFS
 GSNSSGSTATLISRVEAGDEADYYCQVWDSGRGHPYVFGGGTKVTLVGLQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTV
 AWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNKKAASSYLSLTPEQWKSHPYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS (SEQ ID NO: 165)

>Аминокислотная последовательность варибельной области легкой цепи AMM01 в hu-emAb-AMM01-AAV

SYELTQPPSVSVAPGQRATITCGGHNIGAKNVHWYQQKPGQAPVLIQYDSDRPSGIPERFSGNSGSTATLISRVEAGDEADYYCQ
 VWDSGRGHPYVFGGGTKVTLVGLQPKANPTVTLFPP (SEQ ID NO: 166)

>Аминокислотная последовательность константной области легкой цепи лямбда AMM01 в hu-emAb-AMM01-AAV

SSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNKKAASSYLSLTPEQWKSHPYSCQVTHEGSTVEKTV
 APTECS (SEQ ID NO: 167)

>Аминокислотная последовательность линкера GSSG-streptag в hu-emAb-AMM01-AAV

представляет собой SEQ ID NO: 122

QVQLVQSGADVKKPGASVKVSCKASGYTFIHFGISWVRQAPGGLEWMGWIDTNNGNTNYAQLQGRVTMTTDTSTGTAYMELRSL
 STDDAVYFCARALEMGRSGFPFDYWGGQVLTIVSP (SEQ ID NO: 168)

>Граница сплайсинга с фланкующей последовательностью в hu-emAb-AMM01-AAV представляет собой SEQ ID NO: 151

>Гомологичная область, расположенная ниже T7 человека в hu-emAb-AMM01-AAV представляет собой SEQ ID NO: 125

>Последовательность, кодирующая легкую цепь AMM01 без сигнальной последовательности в hu-emAb-AMM01-AAV

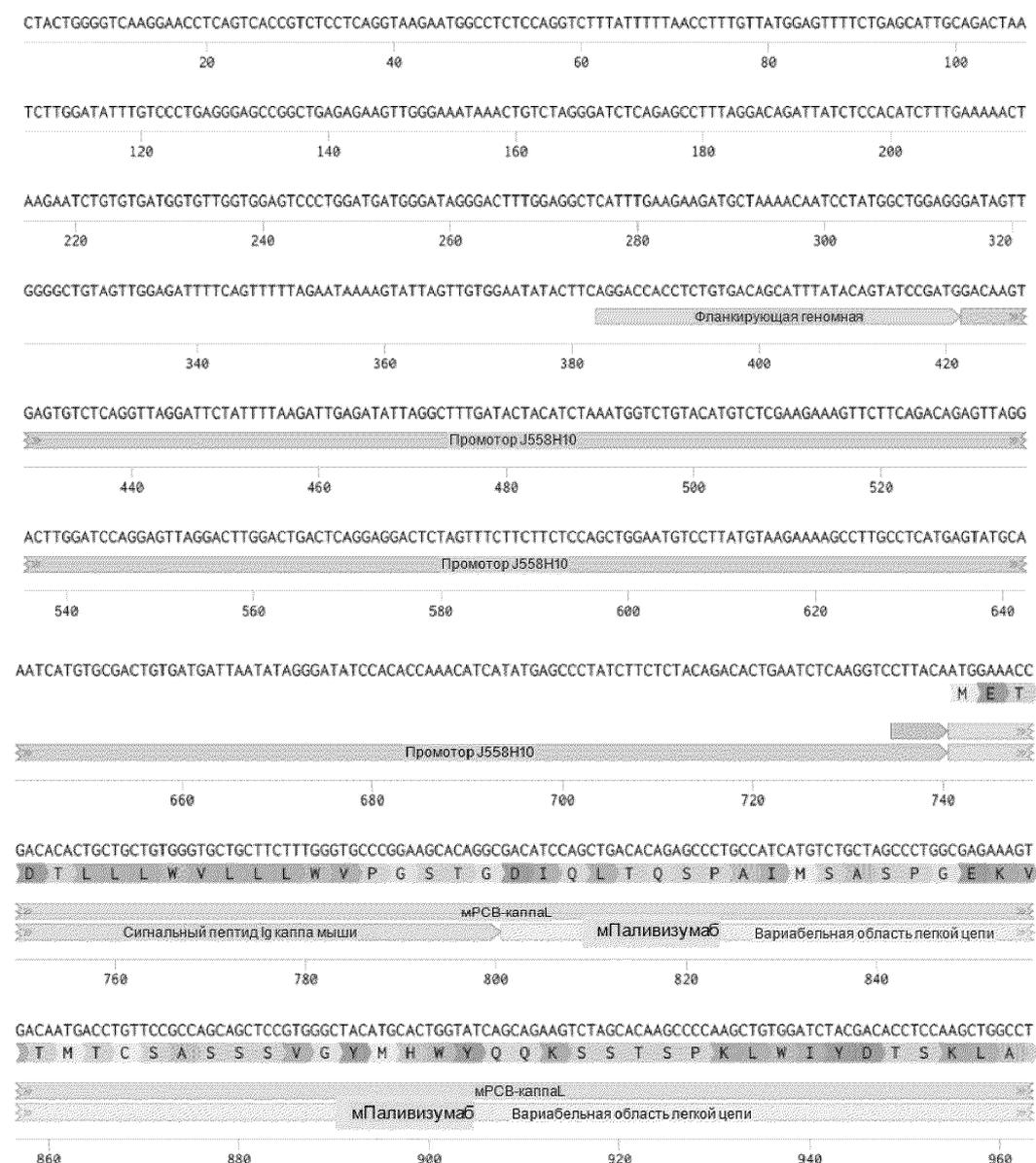
TCCTATGAGCTGACTCAGCCACCCCTCAGTGTCAGTGGCCCCGGGGCAGAGGGCCACAATTACCTGTGGGGGACACAACATCCG
AGCTAAAAATGTCCACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGCCAGGCCCTGTCTGGTCAATATGATAGCGACCCGGCCCTCAG
GGATCCCTGAGCGATTCTGGCTCCAACCTCTGGGAGCACAGCCACCCCTGACCATCAGCAGGGTCGAAGCCGGGGATGAGGC
CGACTTACTGTCAAGTGTGGGATAGTGGTCTGGGATCCCTTTATGCTTCGGAGGTGGGACCAAGGTCACCGTCTTAGG
TCAGCCCAAGGCCAACCCTCTGCACTCTGTCCACCCCTCGAGTGGAGAGCTTCAAGCCAACAAGGCCACACTGGTGTGTCT
CATAAGTGACTTCTACCCGGGAGCCGTGACAGTGGCTGGAAGGCAGATAGCAGCCCGTCAAGGGCGGAGTGGAGACCACC
ACACCCCTCAAAACAAGCAACAACAAGTACGCGGCCAGCAGTACCTGAGCCTGACGCTGAGCAGTGGAAAGTCCCACAGAAG
CTACAGCTGCCAGGTACGCATGAAGGGAGCACCGTGGAGAGACAGTGGCCCTACAGAATGTTCA (SEQ ID NO: 284)

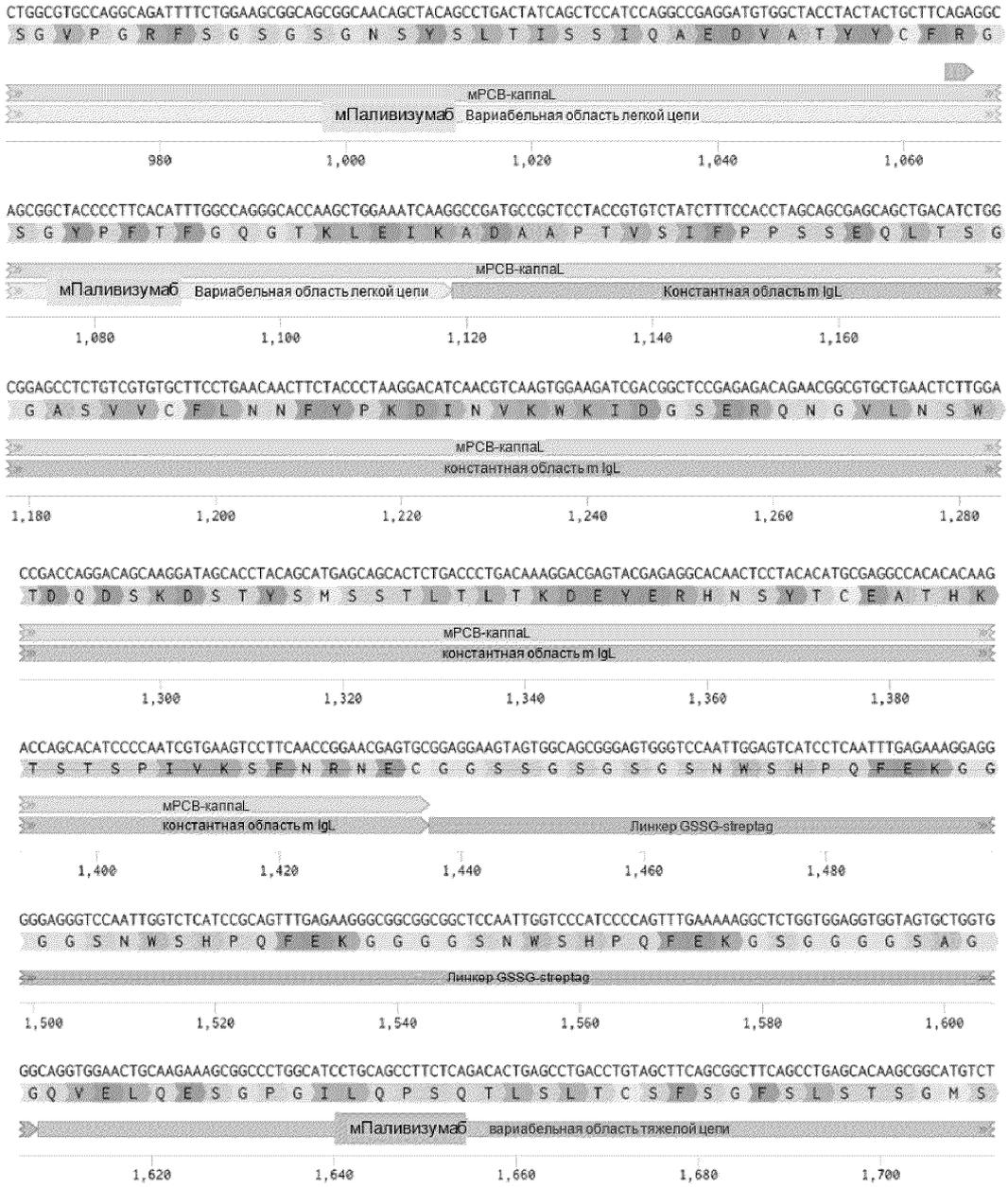
>Аминокислотная последовательность легкой цепи AMM01 без сигнального пептида в hu-emAb-AMM01-AAV

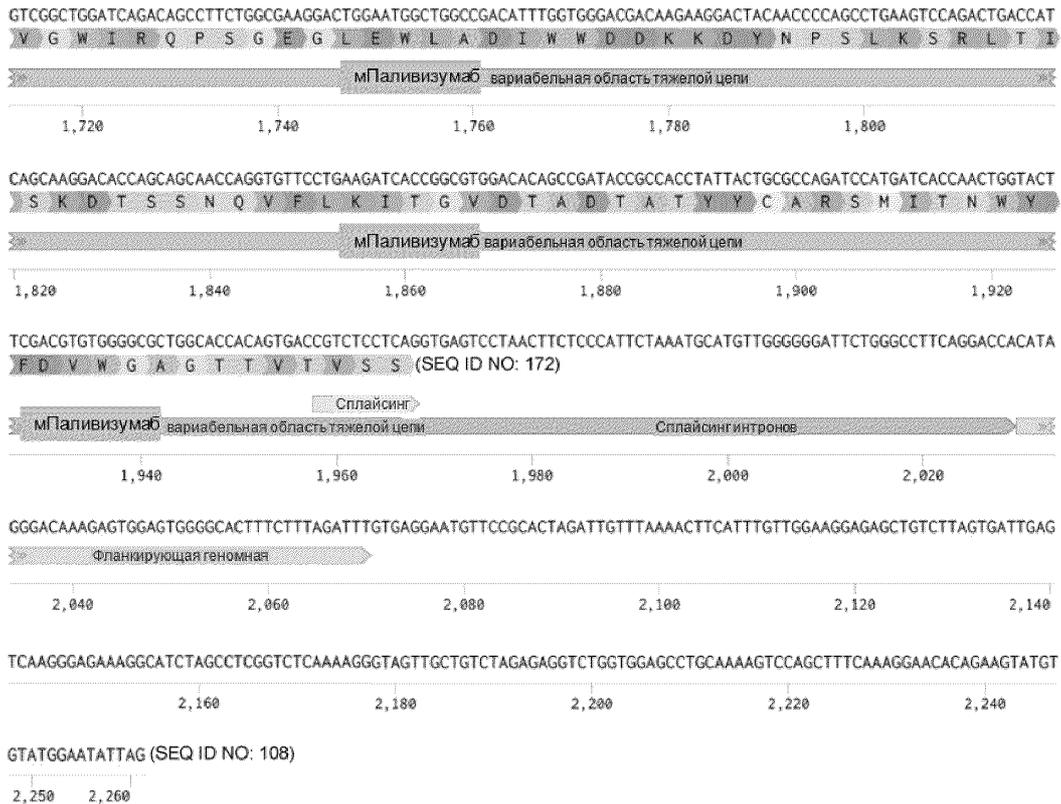
SYELTQPPSVSVAPGQRATITCGGHNIGAKNVHWYQOKPGQAPVLIQYDSRPSGIPERFSGSNSGSTATLISRVEAGDEADYYCQ
VWDSGRGHPLYVFGGGTKVTVLGQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTPSKQSNK
YAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS (SEQ ID NO: 289)

Фиг. 25G

Интегрирование сплайсинга мРНК Balb/C (2261 н.о.)







>Фланкирующая геномная ДНК, расположенная выше в интегрировании сплайсинга мPCV Balb/C
AGGACCCTCTGTGACAGCATTATACAGTATCCGATG (SEQ ID NO: 170)

- >Промотор J558N10 в интегрировании сплайсинга мPCV Balb/C в SEQ ID NO: 128
- >Последовательность, кодирующая сигнальный пептид в интегрировании сплайсинга мPCV Balb/C представляет собой SEQ ID NO: 129
- >Последовательность, кодирующая легкую цепь мПаливизумаба в интегрировании сплайсинга мPCV Balb/C представляет собой SEQ ID NO: 130
- >Последовательность, кодирующая варибельной области легкой цепи мПаливизумаба в интегрировании сплайсинга мPCV Balb/C представляет собой SEQ ID NO: 131
- >Последовательность, кодирующая константной области легкой цепи капла мПаливизумаба в интегрировании сплайсинга мPCV Balb/C представляет собой SEQ ID NO: 132
- >Последовательность, кодирующая линкера GSSG-streptag в интегрировании сплайсинга мPCV Balb/C представляет собой SEQ ID NO: 116
- >Последовательность, кодирующая варибельную область тяжелой цепи мПаливизумаба в интегрировании сплайсинга мPCV Balb/C представляет собой SEQ ID NO: 133
- >Аминокислотная последовательность сигнального пептида в интегрировании сплайсинга мPCV Balb/C представляет собой SEQ ID NO: 134
- >Аминокислотная последовательность легкой цепи мПаливизумаба в интегрировании сплайсинга мPCV Balb/C представляет собой SEQ ID NO: 135
- >Аминокислотная последовательность варибельной области легкой цепи мПаливизумаба в интегрировании сплайсинга мPCV Balb/C представляет собой SEQ ID NO: 136
- >Аминокислотная последовательность константной области легкой цепи капла мПаливизумаба в интегрировании сплайсинга мPCV Balb/C mRSV-сплайсинг интегрирование в SEQ ID NO: 137
- >Аминокислотная последовательность линкера GSSG-streptag в интегрировании сплайсинга мPCV Balb/C представляет собой SEQ ID NO: 122
- >Аминокислотная последовательность варибельной области тяжелой цепи мПаливизумаба в интегрировании сплайсинга мPCV Balb/C представляет собой SEQ ID NO: 138
- >Граница сплайсинга с фланкирующей последовательностью в интегрировании сплайсинга мPCV Balb/C представляет собой SEQ ID NO: 139
- >Фланкирующая геномная ДНК, расположенная ниже в интегрировании сплайсинга мPCV Balb/C

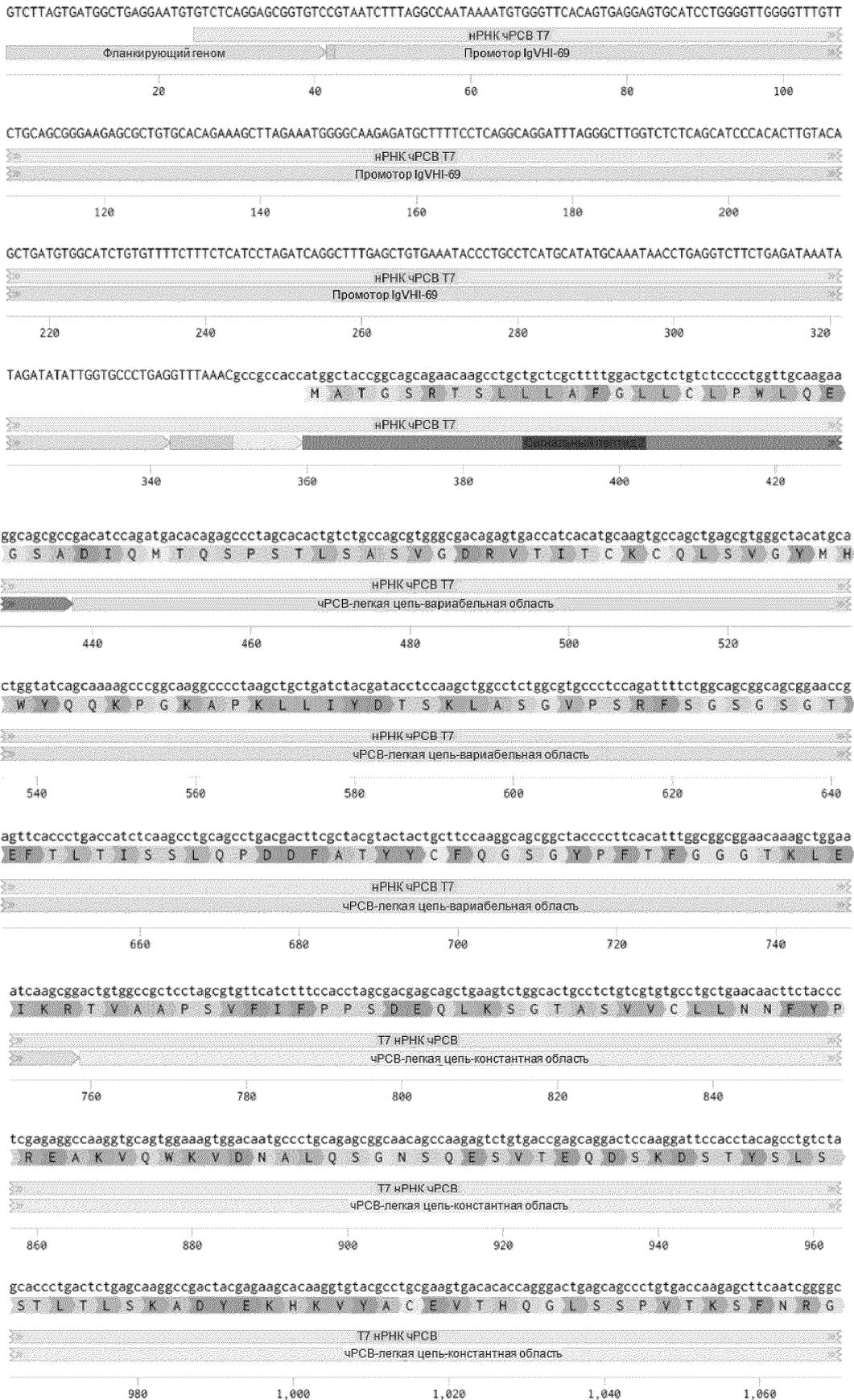
CATAGGGACAAAGAGTGGAGTGGGGCACTTTCTTTAGATTT (SEQ ID NO: 171)

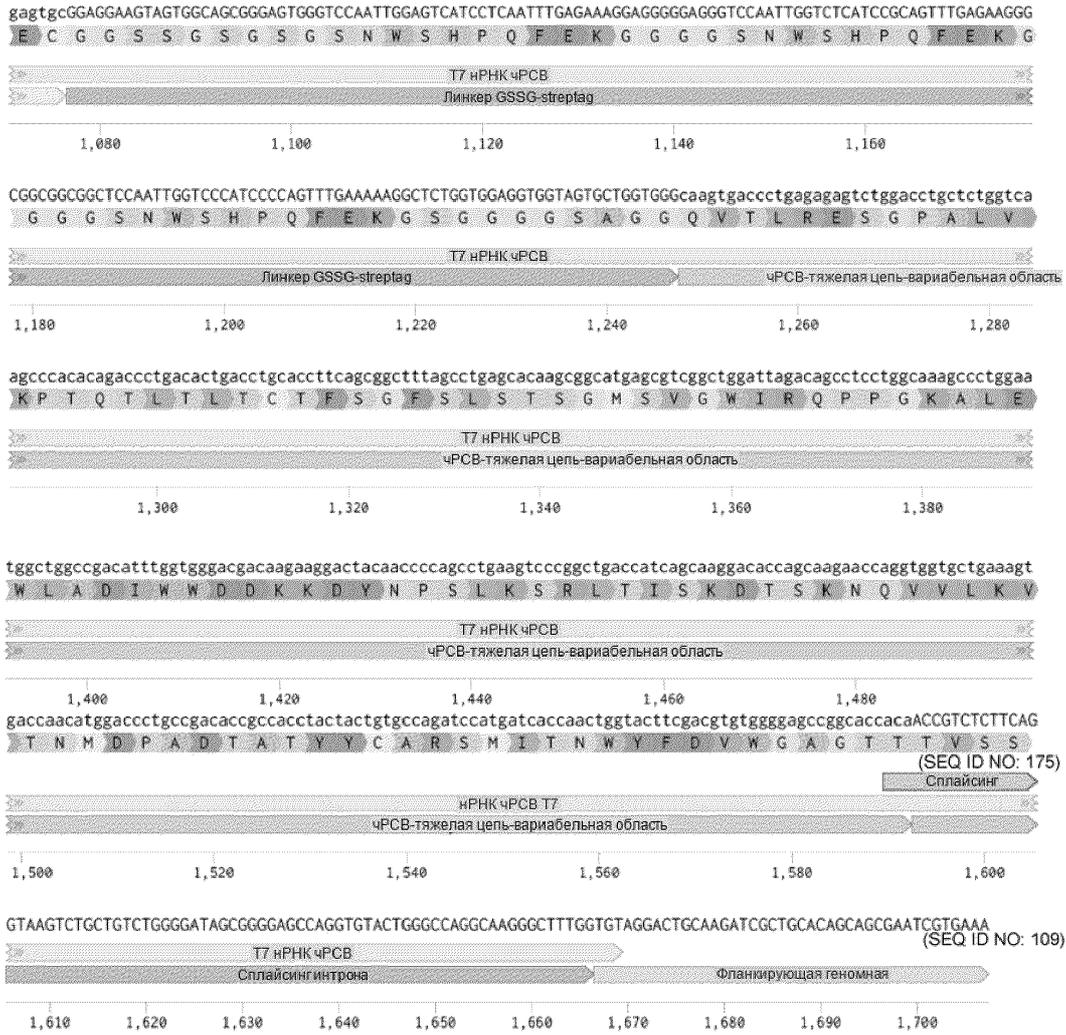
>Последовательность, кодирующая легкую цепь мПаливизумаба без сигнальной последовательности в интегрировании сплайсинга мPCV Balb/C представляет собой SEQ ID NO: 281

>Аминокислотная последовательность, кодирующая легкую цепь мПаливизумаба без сигнального пептида в интегрировании сплайсинга мPCV Balb/C представляет собой SEQ ID NO: 286

Фиг. 25Н

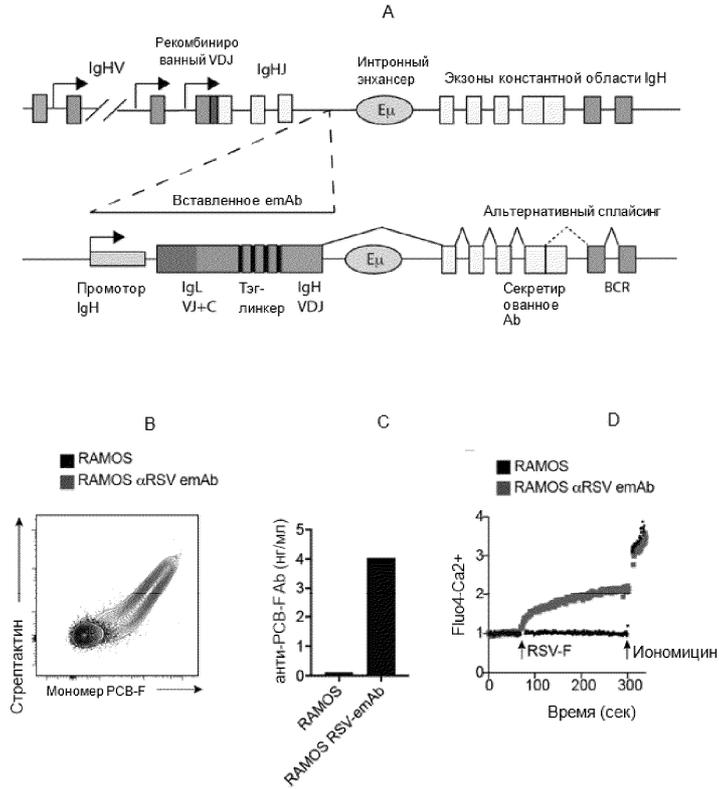
ТТ-hRSV-T7-интегрированный (1707 п.о.)



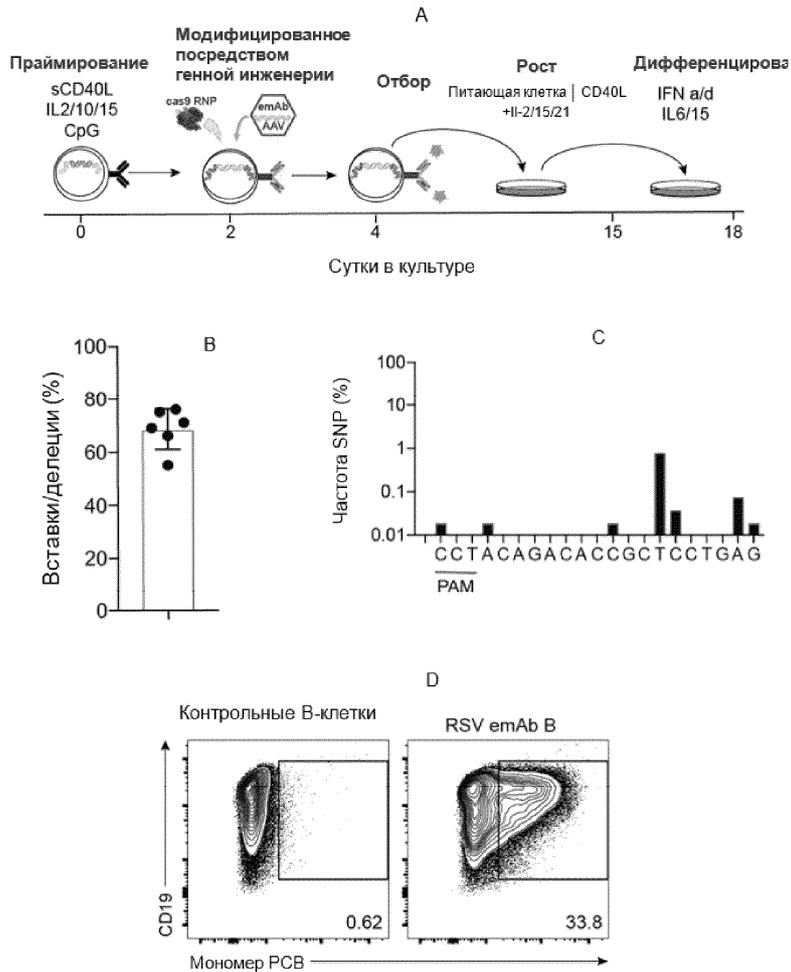


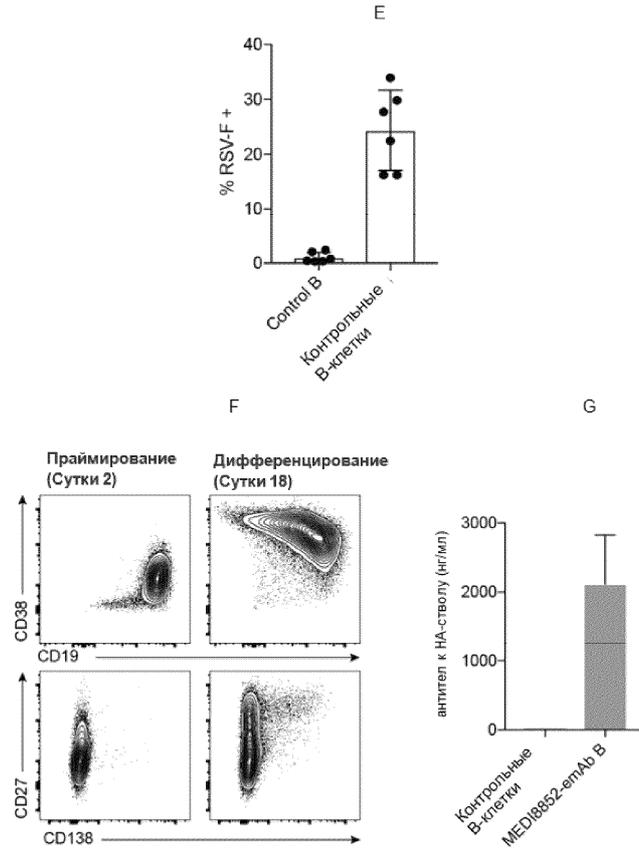
- >Фланкирующая геномная последовательность ДНК, расположенная выше в ТТ-hRSV-T7- GTCTTAGTGATGGCTGAGGAATGTGTCTCAGGAGCGGTGTC (SEQ ID NO: 173)
- >Промотор IgYH1-69 в ТТ-hRSV-T7-интегрированном представляет собой SEQ ID NO: 111
- >Последовательность, кодирующая сигнальный пептид ТТ-hRSV-T7-интегрированный представляет собой SEQ ID NO: 112
- >Последовательность, кодирующая легкой цепи ЧРСВ в ТТ-hRSV-T7-интегрированный представляет собой SEQ ID NO: 113
- >Последовательность, кодирующая переменной области легкой цепи ЧРСВ в ТТ-hRSV-T7-интегрированный представляет собой SEQ ID NO: 114
- >Последовательность, кодирующая константной области легкой цепи каппа в ТТ-hRSV-T7-интегрированный представляет собой SEQ ID NO: 115
- >Последовательность, кодирующая линкер GSSG-streptag ТТ-hRSV-T7-интегрированный представляет собой SEQ ID NO: 116
- >Последовательность, кодирующая переменной области тяжелой цепи hRSV в ТТ-hRSV-T7-интегрированный представляет собой SEQ ID NO: 117
- >Аминокислотная последовательность сигнального пептида ТТ-hRSV-T7-интегрированный представляет собой SEQ ID NO: 118
- >Аминокислотная последовательность легкой цепи ЧРСВ в ТТ-hRSV-T7-интегрированный представляет собой SEQ ID NO: 119
- >Аминокислотная последовательность переменной области легкой цепи ЧРСВ в ТТ-hRSV-T7-интегрированный представляет собой SEQ ID NO: 120
- >Аминокислотная последовательность константной области легкой цепи каппа ЧРСВ в ТТ-hRSV-T7-интегрированный представляет собой SEQ ID NO: 121
- >Аминокислотная последовательность линкера GSSG-streptag ТТ-hRSV-T7-интегрированный представляет собой SEQ ID NO: 122
- >Аминокислотная последовательность переменной области тяжелой цепи ЧРСВ в ТТ-hRSV-T7-интегрированный представляет собой SEQ ID NO: 123
- >Граница сплайсинга с фланкирующей последовательностью ТТ-hRSV-T7-интегрированный представляет собой SEQ ID NO: 124
- >Фланкирующая геномная последовательность ДНК ниже в ТТ-hRSV-T7-интегрированный
- TGTAGGACTGCAAGATCGCTGCACAGCAGCGAATCGTGAAA (SEQ ID NO: 174)
- >Последовательность, кодирующая легкую цепь ЧРСВ без сигнальной последовательности в ТТ-hRSV-T7-интегрированный представляет собой SEQ ID NO: 280
- >Аминокислотная последовательность легкой цепи ЧРСВ без сигнальной последовательности в ТТ-hRSV-T7-интегрированный представляет собой SEQ ID NO: 285

Фиг. 25I

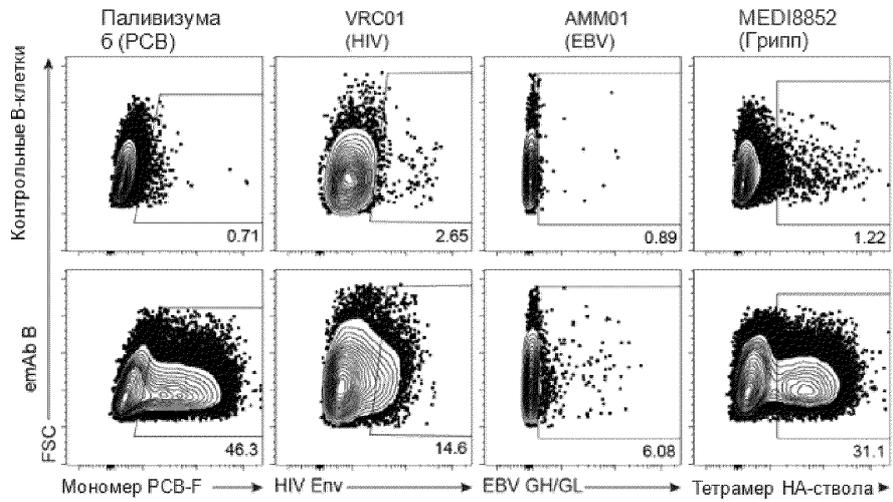


Фиг. 26A-D

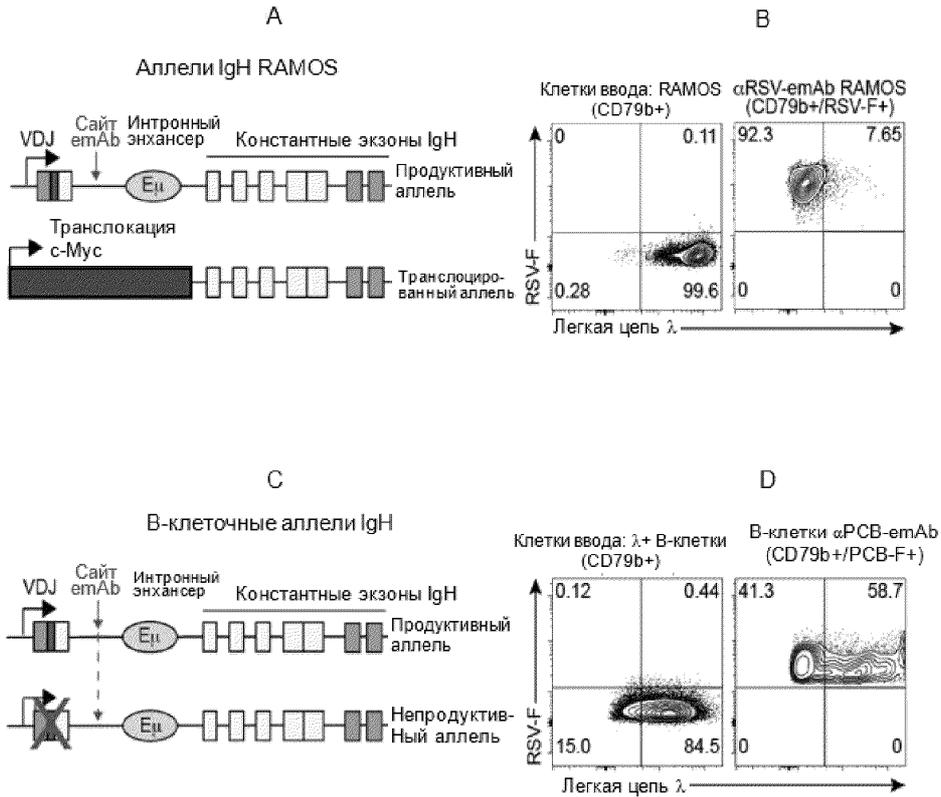




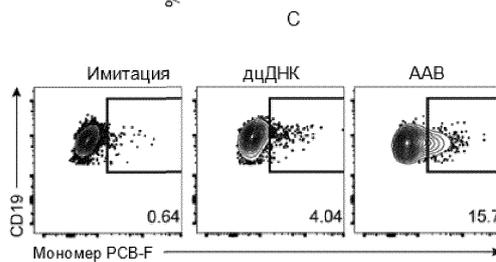
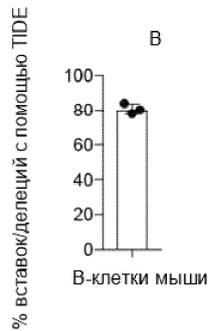
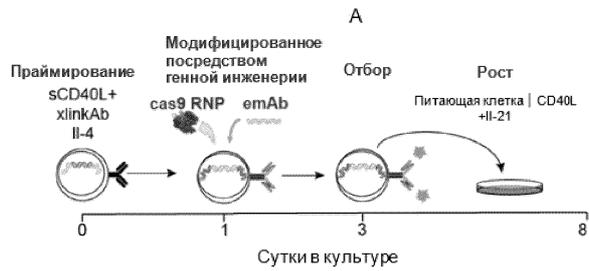
Фиг. 27А-Г



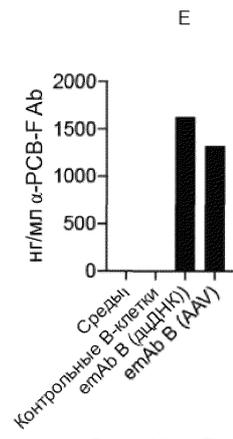
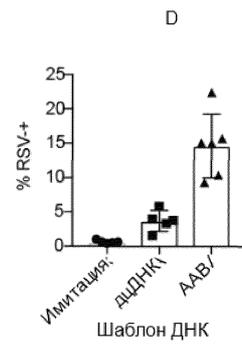
Фиг. 28



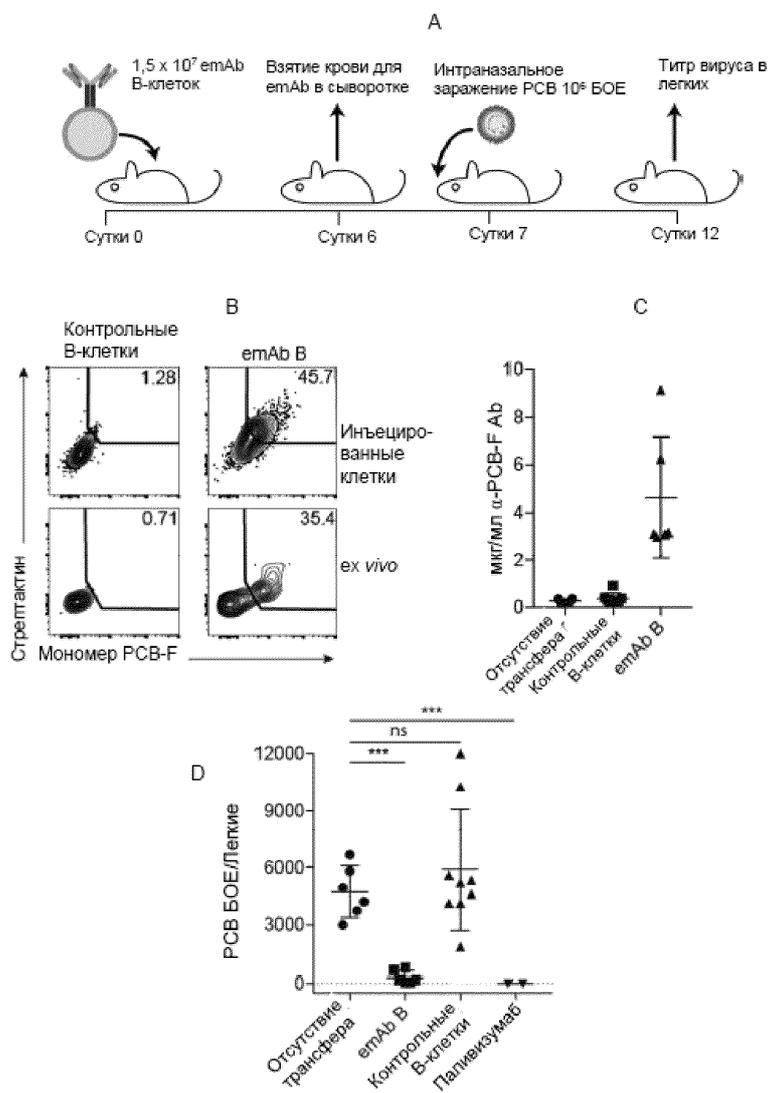
Фиг. 29A-D



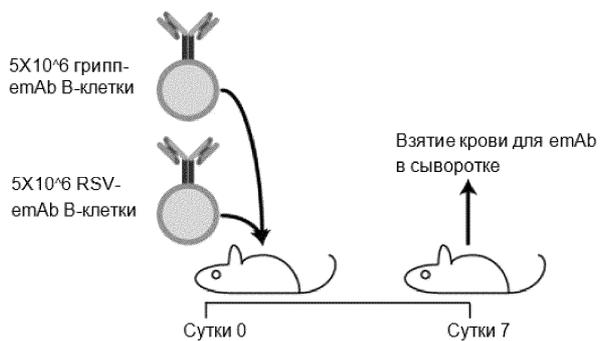
046539



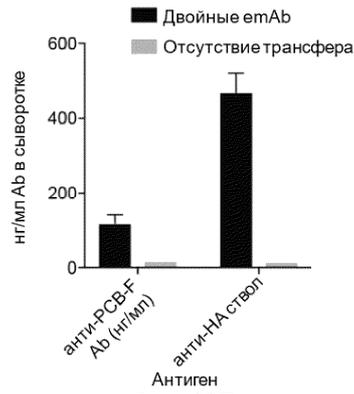
Фиг. 30А-Е



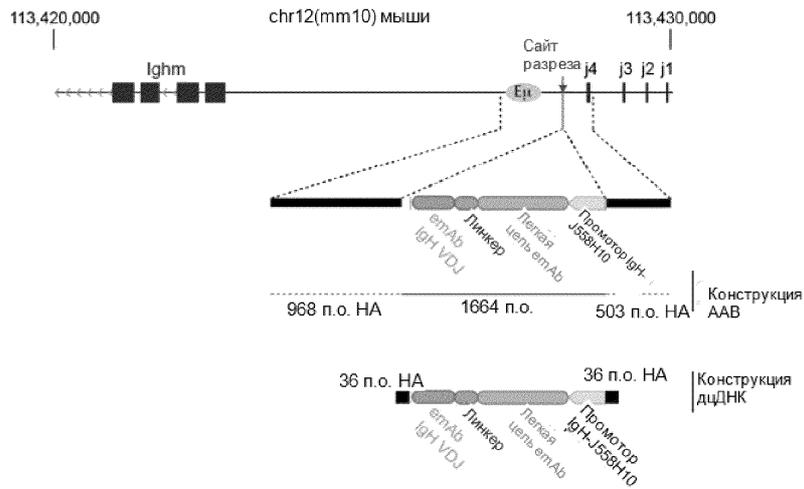
Фиг. 31A-D



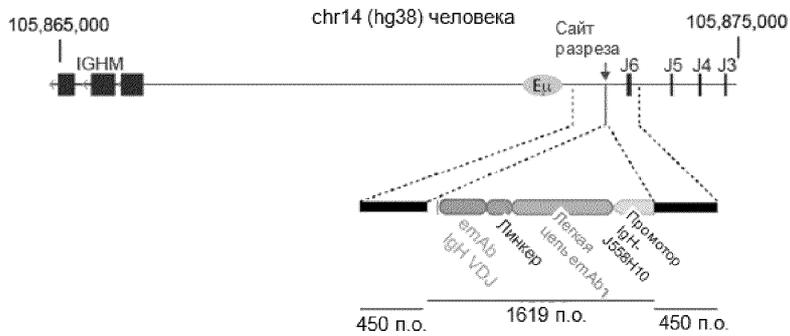
046539



Фиг. 32В



Фиг. 33А



Фиг. 33В

