

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202392911

(13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.02.16

(51) Int. Cl. C07K 14/005 (2006.01)
C12N 15/10 (2006.01)
C12N 15/86 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2022.04.16

(54) НАЦЕЛИВАНИЕ ВИРУСА НА ГЕМОПОЭТИЧЕСКИЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ

(31) 63/176,120

(72) Изобретатель:

(32) 2021.04.16

Бирнбаум Майкл, Добсон Коннор,
Гальоне Стефани, Ройбал Коул,
Бёрнетт Кассандра (US)

(33) US

(86) PCT/US2022/025142

(87) WO 2022/221745 2022.10.20

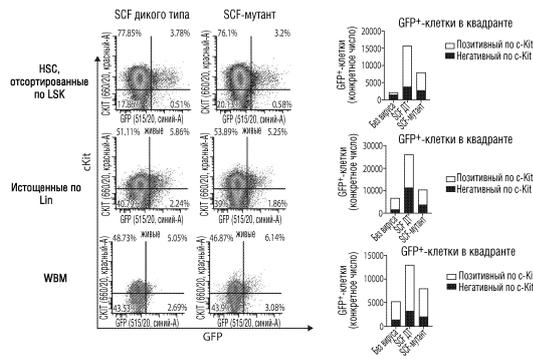
(74) Представитель:

(71) Заявитель:

Медведев В.Н. (RU)

МАССАЧУСЕТС ИНСТИТЮТ ОФ
ТЕКНОЛОДЖИ; ДЗЕ РИДЖЕНТС
ОФ ДЗЕ ЮНИВЕРСИТИ ОФ
КАЛИФОРНИЯ (US)

(57) В изобретении раскрыты композиции ретровирусов и способы их применения для доставки генов в гемopoэтическую стволовую клетку (HSC), где указанные ретровирусы содержат вирусный белок оболочки, имеющий по меньшей мере одну мутацию, которая уменьшает его нативную функцию; невирусный мембраносвязанный белок, содержащий мембраносвязанный домен, и внеклеточный нацеливающий домен.



A1

202392911

202392911

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-579452EA/55

НАЦЕЛИВАНИЕ ВИРУСА НА ГЕМОПОЭТИЧЕСКИЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ

Родственные заявки

В настоящей заявке испрашивается приоритет предварительной заявки на патент США № 63/176120, которая подана 16 апреля 2021 года в соответствии со статьей 35 Кодекса законов США § 119(e), и которая в полном объеме включена в настоящее описание посредством ссылки.

Ссылка на список последовательностей, представленный в виде текстового файла в EFS-WEB

Настоящая заявка содержит список последовательностей, который был представлен в формате ASCII в EFS-Web, и который в полном объеме включен в настоящее описание посредством ссылки. Упомянутая копия в формате ASCII, созданная 11 апреля 2022 года, называется M065670508WO00-SEQ-GIC и имеет размер 1051168 байт.

Предшествующий уровень техники

Гемопоэтические стволовые клетки (HSC) представляют собой клетки-предшественники, которые облегчают продуцирование клеток крови и клеток адаптивной иммунной системы. Соответственно, HSC играют важную роль в поддержании иммунитета и нормальной функции организма. Поскольку HSC самообновляются и делятся, создавая миллиарды клеток крови каждый день, то дисфункция HSC создает определенные проблемы. Генетические заболевания, такие как серповидноклеточная анемия или тяжелый комбинированный иммунодефицит (SCID), могут вызывать серьезные заболевания и приводить к летальному исходу. Кроме того, пролиферативная способность клеток линии HSC и их потомков в сочетании со способностью В- и Т-клеток рекомбинировать свои геномы приводит к развитию рака крови, такого как лейкозы и лимфомы.

В настоящее время, самым крайним методом лечения рака или генетических заболеваний (например, связанных с дисфункцией HSC) является трансплантация костного мозга. Хотя такая трансплантация может быть эффективной, однако, существует несколько осложняющих факторов. Поиск донора с соответствующими HLA может быть сложной задачей, а режим предварительной подготовки к лимфоистощению перед трансплантацией может быть токсичным и плохо переноситься пациентом.

Таким образом, прямое генетическое изменение HSC было бы чрезвычайно эффективным либо для коррекции генетических заболеваний, либо для создания самообновляющегося источника сконструированных противоопухолевых иммунных клеток, таких как CAR-T-клетки. Однако, достичь этого достаточно трудно. HSC являются редкими и гетерогенными, а поэтому эффективно и избирательно модифицировать их геномы довольно сложно.

Сущность изобретения

Авторами настоящего изобретения было продемонстрировано, что комбинация мутаций, приводящих к отмене нативной функции (например, тропизма) и сверхэкспрессии

второго мембранного белка, позволяет этому второму белку функционировать в качестве основы для проникновения вируса в гемопоэтические стволовые клетки (HSC). Эти открытия, как описано в настоящей заявке, позволяют применять новые и новаторские методики, например, для скрининга клеток, которые, как известно, трудно поддаются скринингу на специфические антигены и функции, и для доставки нуклеиновых кислот в HSC по специфическому для HSC механизму.

Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к способу доставки одной или более нуклеиновых кислот в гемопоэтическую стволовую клетку (HSC). В некоторых вариантах осуществления изобретения, способ доставки одной или нескольких нуклеиновых кислот в HSC включает: (i) получение ретровируса, содержащего одну или несколько нуклеиновых кислот, белка вирусной оболочки, содержащего по меньшей мере одну мутацию, которая уменьшает его нативную функцию, и невирусного мембраносвязанного белка, содержащего внеклеточный нацеливающий домен, который связывается с белком на поверхности HSC; и (ii) контактирование ретровируса с HSC, что обеспечивает доставку одной или нескольких нуклеиновых кислот в HSC.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, внеклеточным нацеливающим доменом является фактор стволовых клеток (SCF), лиганд FMS-подобной тирозинкиназы 3 (FLT3L) или тромбопоэтин (TPO). В некоторых вариантах осуществления изобретения, белком на поверхности HSC являются CD34, CD90, CD133, CD49f, CD201, c-Kit, FMS-подобная тирозинкиназа 3 (FLT3) или рецептор тромбопоэтина.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, по меньшей мере одна или более нуклеиновых кислот кодирует представляющий интерес ген. В некоторых вариантах осуществления изобретения, представляющий интерес ген кодирует представляющий интерес белок. В некоторых вариантах осуществления изобретения, представляющий интерес белок представляет собой белок, редактирующий ген. В некоторых вариантах осуществления изобретения, белок, редактирующий ген, представляет собой Cas-эндонуклеазу, нуклеазу «цинковые пальцы», эффекторную нуклеазу, подобную активатору транскрипции (TALEN), или мегануклеазу. В некоторых вариантах осуществления изобретения, Cas-эндонуклеаза представляет собой Cas9-эндонуклеазу. В некоторых вариантах осуществления изобретения, по меньшей мере одна или более нуклеиновых кислот представляет собой направляющую РНК.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, ретровирус проникает в клетку или инфицирует ее на стадии (ii). В некоторых вариантах осуществления изобретения, ретровирус является лентивирусом. В некоторых вариантах осуществления изобретения, белок оболочки вируса представляет собой белок оболочки VSV-G или G-белок вируса *cosac1*. В некоторых вариантах осуществления изобретения, по меньшей мере одна мутация белка оболочки VSV-G представляет собой мутацию, выбранную из группы, состоящей из N8, I41, K47, Y209 и R354. В некоторых вариантах осуществления изобретения, по меньшей мере одна мутация белка оболочки вируса кори представляет собой мутацию, выбранную из группы, состоящей из Y481, R533, S548 и F549. В некоторых вариантах осуществления

изобретения, по меньшей мере одна мутация белка оболочки вируса *pirah* представляет собой мутацию, выбранную из группы, состоящей из E501, W504, Q530 и E533. В некоторых вариантах осуществления изобретения, по меньшей мере одна мутация G-белка вируса *sosal* представляет собой мутацию, выбранную из группы, состоящей из K64 и R371.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, линкер расположен между мембраносвязанным доменом и внеклеточным нацеливающим доменом. В некоторых вариантах осуществления изобретения, линкер является жестким линкером. В некоторых вариантах осуществления изобретения, жесткий линкер содержит «стебель» PDGFR или «стебель» CD8 α . В некоторых вариантах осуществления изобретения, линкер является гибким линкером. В некоторых вариантах осуществления изобретения, гибкий линкер содержит аминокислотную последовательность, включающую GAPGAS (SEQ ID NO:5) или GGGGS (SEQ ID NO:7). В некоторых вариантах осуществления изобретения, линкер представляет собой олигомеризованный линкер. В некоторых вариантах осуществления изобретения, олигомеризованный линкер содержит шарнирную область IgG4 или аминокислотную последовательность, которая может образовывать тетрамерную суперспирализованную спираль.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, HSC представляют собой мышинные HSC или HSC человека. В некоторых вариантах осуществления изобретения, одна или более нуклеиновых кислот кодируют химерный антигенный рецептор.

Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к способу редактирования генов в гемопоэтической стволовой клетке (HSC). В некоторых вариантах осуществления изобретения, способ редактирования генов в HSC включает (i) получение ретровируса, содержащего одну или более нуклеиновых кислот, кодирующих композицию для редактирования генов, вирусный белок оболочки, содержащий по меньшей мере одну мутацию, которая уменьшает его нативную функцию, и невирусный мембраносвязанный белок, содержащий внеклеточный нацеливающий домен, который связывается с белком на поверхности HSC; и (ii) контактирование ретровируса с HSC таким образом, чтобы одна или несколько нуклеиновых кислот, кодирующих композицию для редактирования генов, доставлялись в HSC, где композиция для редактирования генов специфически нацелена на участок хромосомной ДНК HSC, что приводит к генетической модификации.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, внеклеточным нацеливающим доменом является фактор стволовых клеток (SCF), лиганд FMS-подобной тирозинкиназы 3 (FLT3L) или тромбопоэтин (TPO). В некоторых вариантах осуществления изобретения, белком на поверхности HSC является CD34, CD90, CD133, CD49f, CD201, c-Kit, FMS-подобная тирозинкиназа 3 (FLT3) или рецептор тромбопоэтина.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, композиция для редактирования генов содержит одну или более нуклеиновых кислот, где одна или более нуклеиновых кислот кодируют белок для редактирования генов и/или направляющую РНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения, белок, редактирующий ген, представляет собой Cas-эндонуклеазу, нуклеазу «цинковые пальцы», эффекторную

нуклеазу, подобную активатору транскрипции (TALEN), или мегануклеазу. В некоторых вариантах осуществления изобретения, Cas-эндонуклеаза представляет собой Cas9-эндонуклеазу.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, ретровирус проникает в клетку или инфицирует ее на стадии (ii). В некоторых вариантах осуществления изобретения, ретровирус является лентивирусом. В некоторых вариантах осуществления изобретения, белок оболочки вируса представляет собой белок оболочки VSV-G или G-белок вируса *sosal*. В некоторых вариантах осуществления изобретения, по меньшей мере одна мутация белка оболочки VSV-G представляет собой мутацию, выбранную из группы, состоящей из H8, I41, K47, Y209 и R354. В некоторых вариантах осуществления изобретения, по меньшей мере одна мутация белка оболочки вируса кори представляет собой мутацию, выбранную из группы, состоящей из Y481, R533, S548 и F549. В некоторых вариантах осуществления изобретения, по меньшей мере одна мутация белка оболочки вируса *pirah* представляет собой мутацию, выбранную из группы, состоящей из E501, W504, Q530 и E533. В некоторых вариантах осуществления изобретения, по меньшей мере одна мутация G-белка вируса *sosal* представляет собой мутацию, выбранную из группы, состоящей из K64 и R371.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, линкер расположен между мембраносвязанным доменом и внеклеточным нацеливающим доменом. В некоторых вариантах осуществления изобретения, линкер является жестким линкером. В некоторых вариантах осуществления изобретения, жесткий линкер содержит «стебель» PDGFR или «стебель» CD8 α . В некоторых вариантах осуществления изобретения, линкер является гибким линкером. В некоторых вариантах осуществления изобретения, гибкий линкер содержит аминокислотную последовательность, включающую GAPGAS (SEQ ID NO:5) или GGGGS (SEQ ID NO:7). В некоторых вариантах осуществления изобретения, линкер представляет собой олигомеризованный линкер. В некоторых вариантах осуществления изобретения, олигомеризованный линкер содержит шарнирную область IgG4 или аминокислотную последовательность, которая может образовывать тетрамерную суперспирализованную спираль.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, HSC представляют собой мышинные HSC или HSC человека. В некоторых вариантах осуществления изобретения, способ дополнительно включает доставку одной или нескольких нуклеиновых кислот, кодирующих химерный антигенный рецептор, в HSC.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 показана экспрессия метки HA на клетках НЕК для конструкций стебля SCFa PStalk и шарнирной области IgG4.

На фиг. 2 показана экспрессия метки HA на клетках НЕК для конструкций стебля S4-3a PStal и шарнирной области IgG4.

На фиг. 3 показана экспрессия неконцентрированного вируса после смешивания с клетками, экспрессирующими MC9 cKIT. Соотношение клеток MC9:вирус составляет 1:1.

На фиг. 4 показана экспрессия неконцентрированного вируса после смешивания с

клетками, экспрессирующими MC9 сKIT. Соотношение клеток MC9:вирус составляет 2:1.

На фиг. 5 показана экспрессия неконцентрированного вируса после смешивания с клетками, экспрессирующими MC9 сKIT. Соотношение клеток MC9:вирус составляет 4:1.

На фиг. 6 показано проникновение вируса mSCFa-IgG4Hinge-VSVd в концентрации 5 мкл, 2,5 мкл, 1,25 мкл и 0,625 мкл (слева направо) в клетки MC9 в присутствии или отсутствии полибрена.

На фиг. 7 показано проникновение вируса mS4-3a-IgG4Hinge-VSVd в концентрации 5 мкл, 2,5 мкл, 1,25 мкл и 0,625 мкл (слева направо) в клетки MC9 в присутствии или отсутствии полибрена.

На фиг. 8 показана экспрессия нецелевого вирусного контроля, mFLT3L-IgG4Hinge-VSVd и только вируса VSVd в клетках MC9.

На фиг. 9 показана экспрессия вирусных конструкций (5 мкл с полибренем) в клетках VhCm, не экспрессирующих сKIT.

На фиг. 10 представлена схема экспериментального проекта по тестированию эффективности и специфичности SCF-WT, SCF-мутанта и специфичного к FLT3 лентивируса в первичных клетках костного мозга мыши.

На фиг. 11 показана эффективность вариантов вируса SCF с SCF и без SCF в клетках MC9 (линия мышинных тучных клеток).

На фиг. 12A-12B показана эффективность вариантов SCF-вируса, оцененная с помощью GFP⁺ в отсортированных клетках LSK (Lin⁻, Sca-1⁺, сKIT⁺), обогащенных по сKIT и истощенных по линии дифференцировки клеток и клеток WBM (цельных клеток костного мозга).

На фиг. 13A-13B показана эффективность вариантов SCF-вируса, оцененная с помощью GFP⁺ в клетках, обогащенных по сKIT, в присутствии и в отсутствии SCF.

На фиг. 14 показана специфичность вариантов SCF-вируса, оцененная с помощью GFP⁺ в отсортированных клетках LSK (Lin⁻, Sca-1⁺, сKIT⁺), истощенных по линии дифференцировки клеток и клеток WBM.

На фиг. 15A-15C показана эффективность вариантов вируса FLT3, оцененная с помощью GFP⁺ в клетках, отсортированных по HSC-FLT3, обогащенных по сKIT и истощенных по линии происхождения, и в клетках WBM.

На фиг. 16A-16B показана эффективность вариантов вируса FLT3, оцененная с помощью GFP⁺ в клетках, обогащенных по сKIT, с FLT3 и без него.

На фиг. 17 показана специфичность вариантов вируса FLT3, оцененная с помощью GFP⁺ в клетках, отсортированных по HSC-FLT3 и истощенных по линии дифференцировки и в клетках WBM.

На фиг. 18A-18H приведены примеры мышинных конструкций согласно изобретению.

На фиг. 19A-19D приведены примеры человеческих конструкций согласно изобретению.

Подробное описание изобретения

В настоящей заявке представлены новые и инновационные способы, например, способы доставки нуклеиновых кислот (например, для замены гена или редактирования гена) в клетки-мишени по механизму, специфичному для мишени. В некоторых вариантах осуществления изобретения, описанные здесь системы представляют собой системы, которые обеспечивают, например, доставку нуклеиновых кислот (например, нуклеиновых кислот, кодирующих ген) к гемопоэтическим стволовым клеткам (HSC). В некоторых вариантах осуществления изобретения, описанные здесь системы представляют собой системы на основе ретровирусов, которые перепрофилируют вирусный тропизм как метод отбора для молекулярных взаимодействий и заменяют связывающие функции белков поверхности вируса дикого типа на функции представляющих интерес вариантов белка, например, посредством кодирования этих вариантов белка на соответствующей плазмиде для переноса, используемой для получения вируса, что тем самым будет гарантировать то, что полученный вирус будет отображать вариант белка на своей поверхности и упаковывать соответствующую генетическую последовательность. Таким образом, когда вирус проникает в клетку-мишень (например, несущую рецептор, который связывается с представленным внеклеточным нацеливающим доменом варианта белка), то проникновение в клетку приводит к интеграции генетической последовательности представленного белка в геном клетки-мишени.

Вирусный фузоген с дефицитом аффинности к «разрушенному VSV» может совместно экспрессироваться с конструкциями, содержащими фактор мышиных стволовых клеток (mSCF) на поверхности лентивируса. В настоящей заявке представлены конструкции на основе mSCF: мономерные варианты, в которых mSCF связан со стеблем PDGFR и трансмембранным белком, а также предварительно димеризован посредством Fc-шарнирной области. Также был использован mSCF «дикого типа» с эндогенной аффинностью к рецептору cKIT, а также S4-3a, аффинно-зрелый вариант SCF, который может демонстрировать более эффективное проникновение вируса (как ранее было описано в публикации Ho CC et al., Cell 2017).

Было продемонстрировано, что (a) все эти белки экспрессируются на поверхности клеточной линии, упаковывающей вирус НЕК, (b) белки SCF обеспечивают селективное проникновение вируса в клетки MC9 (которые не являются HSC, а представляют собой иммортализованную клеточную линию на основе тучных клеток, которая представляет собой cKIT⁺-линию), и (c) эти белки не проникают в cKIT-клетки. Эта системы функционирует с эффективностью, сопоставимой с другими подходами по нацеливанию на В- и Т-клетки. Кроме того, была создана конструкция для нацеливания с помощью FLT3L, другого лиганда, который может обладать эффективностью, и было показано, что она может экспрессироваться. Эти вирусы были протестированы (a) *in vitro* на мышиных HSC и (b) доставлены *in vivo*.

Представленные здесь способы обеспечивают широкий спектр применений в клеточной и генной терапии, что значительно расширяет возможности достижения этой цели при одновременном снижении затрат и потенциально могут оказывать влияние на

широкий спектр заболеваний.

Ретровирусы

В настоящей заявке описаны ретровирусы, содержащие вирусный белок оболочки, имеющий по меньшей мере одну мутацию, которая уменьшает его нативную функцию; невирусный мембраносвязанный белок, содержащий мембраносвязанный домен и внеклеточный нацеливающий домен; и нуклеиновую кислоту, кодирующую репортер. В некоторых вариантах осуществления изобретения, ретровирус содержит вирусный белок оболочки, имеющий по меньшей мере одну мутацию, которая уменьшает его нативную функцию, и невирусный мембраносвязанный белок, содержащий мембраносвязанный домен и внеклеточный нацеливающий домен.

Описанный здесь ретровирус содержит один или более элементов, происходящих от ретровирусного генома (встречающегося в природе или модифицированного) подходящего вида. Ретровирусы включают 7 семейств: альфаретровирус (вирус птичьего лейкоза), бетаретровирус (вирус опухоли мышшиной молочной железы), гаммаретровирус (вирус мышшиного лейкоза), дельтаретровирус (вирус лейкоза крупного рогатого скота), эпсилонретровирус (вирус кожной саркомы судака), лентивирус (вирус иммунодефицита человека 1) и спумавирус (спумавирус человека). Шесть дополнительных примеров ретровирусов представлены в патенте США № 7901671.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, ретровирус представляет собой лентивирус. Лентивирус принадлежит к роду ретровирусов, который обычно вызывает медленно развивающиеся заболевания из-за их способности встраиваться в геном хозяина. Модифицированные лентивирусные геномы являются подходящими в качестве вирусных векторов для доставки нуклеиновых кислот в клетку-хозяина. Клетки-хозяева могут быть трансфицированы лентивирусными векторами и, необязательно, дополнительными векторами для экспрессии лентивирусных упаковывающих белков (например, VSV-G, Rev и Gag/Pol) для получения лентивирусных частиц в культуральной среде.

Конструкции ретровирусов и лентивирусов хорошо известны специалистам в данной области, и любой подходящий ретровирус может быть использован для конструирования ретровируса (или множества ретровирусов или библиотеки ретровирусов), как описано в настоящей заявке. Неограничивающие примеры конструкций ретровирусов включают лентивирусные векторы, вектор вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), вектор вируса птичьего лейкоза (ALV), вектор вируса мышшиного лейкоза (MLV), вектор вируса опухоли мышшиной молочной железы (MMTV), вирус мышшиных стволовых клеток и вектор вируса Т-клеточного лейкоза человека (HTLV). Эти конструкции ретровируса содержат провирусные последовательности соответствующего ретровируса.

Описанный здесь ретровирус может содержать вирусные элементы, такие как описанные здесь элементы, происходящие от одного или нескольких подходящих ретровирусов, которые представляют собой РНК-вирусы с одноцепочечной молекулой РНК со смысловой плюс-цепью. Ретровирусы содержат фермент обратную транскриптазу и фермент интегразу. При проникновении в клетку-мишень, ретровирусы используют свою

обратную транскриптазу для транскрипции своей молекулы РНК в молекулу ДНК. Впоследствии, фермент интегразы используется для интеграции молекулы ДНК в геном клетки-хозяина. После интеграции в геном клетки-хозяина, последовательность ретровируса становится провирусом (например, провирусной последовательностью или последовательностью провируса). Описанные здесь ретровирусные векторы могут также содержать дополнительные функциональные элементы, известные специалистам в данной области, что позволяет решить проблемы безопасности и/или улучшить функции вектора, такие как эффективность упаковки и/или титр вируса. Дополнительную информацию можно найти в публикациях US20150316511 и WO2015/117027, каждая из которых включена в настоящее описание посредством ссылки для достижения нужной цели и описания предмета изобретения. Дополнительную информацию о лентивирусах можно найти, например, в заявке WO2019/056015, которая включена в настоящее описание посредством ссылки для достижения конкретной цели.

Белок вирусной оболочки

Описанные здесь ретровирусы содержат вирусный белок оболочки, имеющий по меньшей мере одну мутацию, которая уменьшает его нативную функцию (например, функцию немутированного вирусного белка оболочки дикого типа). В некоторых вариантах осуществления изобретения, белком вирусной оболочки является любой белок вирусной оболочки любого ретровируса (например, лентивируса). Белок вирусной оболочки может представлять собой белок оболочки VSV-G, белок оболочки вируса кори, белок оболочки вируса *pirah* или G-белок вируса *cosac1*. В некоторых вариантах осуществления изобретения, белок оболочки дикого типа или немутированный VSV-G имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12 (с лидерной последовательностью) или SEQ ID NO:13 (без лидерной последовательности). В некоторых вариантах осуществления изобретения, белок оболочки вируса кори дикого типа или немутированного вируса имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO:19 (с лидерной последовательностью). В некоторых вариантах осуществления изобретения, G-белок вируса *cosac1* дикого типа или немутированного вируса имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO:24. В некоторых вариантах осуществления изобретения, нативной функцией, которая уменьшается из-за мутации белка вирусной оболочки, является вирусный тропизм (например, способность заражать клетки, связываться с клетками и т.п.).

В некоторых вариантах осуществления изобретения, вирусный белок оболочки, имеющий по меньшей мере одну мутацию, которая уменьшает его нативную функцию, представляет собой мутированный белок оболочки VSV-G. В некоторых вариантах осуществления изобретения, белок оболочки вируса, имеющий по меньшей мере одну мутацию, которая уменьшает его нативную функцию, представляет собой мутированный белок оболочки вируса кори. В некоторых вариантах осуществления изобретения, белок оболочки вируса, содержащий по меньшей мере одну мутацию, которая уменьшает его нативную функцию, представляет собой мутированный белок оболочки вируса *pirah*. В

некоторых вариантах осуществления изобретения, вирусный белок оболочки, содержащий по меньшей мере одну мутацию, которая уменьшает его нативную функцию, представляет собой мутированный G-белок вируса *socal*.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, мутированный белок оболочки VSV-G содержит мутацию в H8, I41, K47, Y209 и/или R354. Положение для аминокислотной замены в мутированном белке оболочки VSV-G идентифицируют по отношению к белку оболочки VSV-G дикого типа без лидерной последовательности, например, как указано в SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления изобретения, мутированный белок оболочки VSV-G содержит мутацию H8A, I41L, K47A, K47Q, Y209A, R354A и/или R354Q. В некоторых вариантах осуществления изобретения, мутированный белок VSV-env содержит мутации I41L, K47Q и R354A, например, мутированный белок VSV-env, представленный в SEQ ID NO: 16. В некоторых вариантах осуществления изобретения, мутированный белок VSV-env содержит мутации K47Q и R354A, например, мутированный белок VSV-env, указанный в SEQ ID NO: 17. В некоторых вариантах осуществления изобретения, мутированный белок оболочки VSV-G является таким, как он описан в публикации Nikolic et al. «Structural basis for the recognition of LDL-receptor family members by VSV glycoprotein». *Nature Comm.*, 2018, 9:1029, соответствующее описание которой включено в настоящее изобретение посредством ссылки для этой конкретной цели.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, мутированный белок оболочки вируса кори содержит мутацию в Y481, R533, S548 и/или F549. В некоторых вариантах осуществления изобретения, мутированный белок оболочки вируса кори содержит мутацию Y481A, R533A, S548L и/или F549S. В некоторых вариантах осуществления изобретения, мутированный белок оболочки вируса кори содержит мутированный белок оболочки вируса кори, указанный в SEQ ID NO:21.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, мутированный белок оболочки вируса *Nipah* содержит мутацию в E501, W504, Q530 и/или E533. В некоторых вариантах осуществления изобретения, мутированный белок оболочки вируса кори содержит мутацию E501A, W504A, Q530A и/или E533A. В некоторых вариантах осуществления изобретения, мутированный белок оболочки вируса *Nipah* содержит мутированный белок оболочки вируса *Nipah*, указанный в SEQ ID NO:23.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, мутированный G-белок вируса *socal* содержит мутацию в K64 и/или R371. В некоторых вариантах осуществления изобретения, мутированный G-белок вируса кокка содержит мутацию в K64Q и/или R371A. Положение для аминокислотной замены в мутированном G-белке вируса *socal* идентифицируют по отношению к G-белку вируса *socal* дикого типа, например, как указано в SEQ ID NO: 24. В некоторых вариантах осуществления изобретения, мутированный G-белок вируса *socal* содержит мутации K64Q и R371A, например, мутированный G-белок вируса *socal*, указанный в SEQ ID NO:26.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, мутированный белок оболочки

происходит от любого другого вируса, имеющего оболочку, включая, но не ограничиваясь ими, бакуловирус, вирус простого герпеса (HSV), цитомегаловирус (CMV), вирус лимфоцитарного хориоменингита (LCMV), вирус Эпштейна-Барра (EBV), вирус осповакцины, вирус гепатита А, В или С, вирус осповакцины, альфавирус, вирус денге, вирус желтой лихорадки, вирус Зика, вирус гриппа, хантавирус, вирус Эбола, вирус бешенства, вирус иммунодефицита человека (ВИЧ), коронавирусы и другие представители семейства рабдовирусов.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, белок вирусной оболочки, имеющий по меньшей мере одну мутацию, содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более мутаций. В некоторых вариантах осуществления изобретения, вирусный белок оболочки, имеющий по меньшей мере одну мутацию, содержит нуклеотидную последовательность и/или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, или на 97% идентична вирусному белку оболочки дикого типа. В некоторых вариантах осуществления изобретения, белок вирусной оболочки, содержащий по меньшей мере одну мутацию, которая уменьшает его нативную функцию, сохраняет менее 95%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20% или 10% функции вирусного белка оболочки дикого типа. В некоторых вариантах осуществления изобретения, вирусный белок оболочки, содержащий по меньшей мере одну мутацию, полностью лишен своей нативной функции. В некоторых вариантах осуществления изобретения, ретровирус, содержащий белок вирусной оболочки, имеющий по меньшей мере одну мутацию, которая уменьшает его нативную функцию, содержит менее 95%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, или 10% от клеточной инфекционности ретровируса, содержащего белок вирусной оболочки дикого типа.

Невирусный мембраносвязанный белок

Описанные здесь ретровирусы содержат невирусный мембраносвязанный белок. Невирусный мембраносвязанный белок может содержать мембраносвязанный домен и внеклеточный нацеливающий домен, который связывается с белком на поверхности гемопоэтической стволовой клетки (HSC). В некоторых вариантах осуществления изобретения, невирусный мембраносвязанный белок представляет собой химерный белок, содержащий последовательности по меньшей мере двух различных белков. В некоторых вариантах осуществления изобретения, невирусный мембраносвязанный белок представляет собой полноразмерный или усеченный белок, содержащий последовательность из одного белка.

Мембраносвязанный домен представляет собой белок или пептид, который имеет аминокислотную последовательность, позволяющую белку или пептиду полностью или частично внедряться в мембрану или ассоциироваться с мембраной (например, оболочкой) ретровируса. В некоторых вариантах осуществления изобретения, мембраносвязанный домен обеспечивает презентацию и доставку внеклеточного нацеливающего домена во внеклеточную среду. В некоторых вариантах осуществления изобретения, мембраносвязанный домен включает внутриклеточный домен, трансмембранный домен

и/или внеклеточный домен. В некоторых вариантах осуществления изобретения, мембраносвязанный домен включает внутриклеточный домен и трансмембранный домен. В некоторых вариантах осуществления изобретения, мембраносвязанный домен содержит белок главного комплекса гистосовместимости (МНС) или его фрагмент. Белок МНС может представлять собой белок МНС класса I или класса II.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, мембраносвязанный домен содержит 10-50, 10-100, 25-100, 50-200, 50-150, 100-500, 100-250, 250-500 или любое разумное количество общих аминокислот.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, ретровирус, присутствующий в библиотеке ретровирусов, содержит тот же мембраносвязанный домен, что и некоторые или все другие ретровирусы в библиотеке. В некоторых вариантах осуществления изобретения, каждый ретровирус, присутствующий в библиотеке ретровирусов, содержит другой мембраносвязанный домен по сравнению с некоторыми или всеми другими ретровирусами в библиотеке.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, внеклеточный нацеливающий домен представляет собой любой белок или пептид, который имеет аминокислотную последовательность и является партнером по связыванию с молекулой-мишенью или лигандом (например, родственным белком) на поверхности гемопоэтической стволовой клетки (HSC). Если этот домен присутствует во внеклеточной среде за пределами внутренней части ретровируса, то внеклеточный нацеливающий домен способен связываться с HSC. В некоторых вариантах осуществления изобретения, внеклеточный нацеливающий домен связывается с родственным белком или лигандом или нацеливается на родственный белок или лиганд (например, белковый рецептор, присутствующий на HSC-мишени), который присутствует на клеточной поверхности HSC или субпопуляции HSC. В некоторых вариантах осуществления изобретения, внеклеточный нацеливающий домен связывается с родственным белком или лигандом, который присутствует на клеточной поверхности отдельных HSC или субпопуляции HSC. В некоторых вариантах осуществления изобретения, связывающее взаимодействие между внеклеточным нацеливающим доменом ретровируса и родственным белком или лигандом клетки позволяет ретровирусу проникать в HSC.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, внеклеточный нацеливающий домен содержит 10-50, 10-100, 25-100, 50-200, 50-150, 100-500, 100-250, 250-500 или любое разумное количество общих аминокислот. В некоторых вариантах осуществления изобретения, внеклеточный нацеливающий домен содержит по меньшей мере 5, по меньшей мере 10, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20 или по меньшей мере 50 аминокислот.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, внеклеточный нацеливающий домен представляет собой белок, антитело или пептид. В некоторых вариантах осуществления изобретения, антитело представляет собой полноразмерное антитело, фрагмент антитела, наноантитело или одноцепочечное антитело (scFv). В некоторых

вариантах осуществления изобретения, внеклеточный нацеливающий домен представляет собой антитело, которое связывается с родственным белком клетки-мишени. В некоторых вариантах осуществления изобретения, внеклеточный нацеливающий домен представляет собой антитело, которое связывается с антигеном HSC. В некоторых вариантах осуществления изобретения, внеклеточный нацеливающий домен представляет собой белок или пептид, который связывается с рецептором (например, с рецептором, который присутствует на поверхности клетки-мишени).

В некоторых вариантах осуществления изобретения, внеклеточным нацеливающим доменом является фактор стволовых клеток (SCF), лиганд FMS-подобной тирозинкиназы 3 (FLT3L) или тромбопоэтин (TPO). В некоторых вариантах осуществления изобретения, внеклеточный нацеливающий домен содержит аминокислотную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 54-59.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, внеклеточный нацеливающий домен связывается с белком на поверхности HSC, выбранным из группы, состоящей из: CD34, CD90, CD133, CD49f, CD201, c-Kit, FMS-подобной тирозинкиназы 3 (FLT3) и рецептора тромбопоэтина.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, внеклеточный нацеливающий домен представляет собой белок или пептид, который связывается с рецептором цитокинов (например, рецептором интерлейкина-13 (IL-13)). В некоторых вариантах осуществления изобретения, внеклеточный нацеливающий домен представляет собой цитокин (например, IL-2, IL-6, IL-12, IL-13). В некоторых вариантах осуществления изобретения, внеклеточный нацеливающий домен представляет собой лиганд хемокина (например, CXCL9, CXCL10, CXCL11 и т.п.). В некоторых вариантах осуществления изобретения, внеклеточный нацеливающий домен представляет собой клеточный рецептор, включающий рецепторы цитокинов (например, рецепторы IL-13Ra1, IL-13Ra2, IL-2, общую гамма-цепь), GPCR (включая рецепторы хемокинов, такие как CSCR3, CXCR4 и т.п.) и интегрины. В некоторых вариантах осуществления изобретения, внеклеточный нацеливающий домен представляет собой пептид, который презентуется белком MHC. В некоторых вариантах осуществления изобретения, невирусный мембраносвязанный белок содержит мембраносвязанный домен, содержащий белок или фрагмент MHC, и внеклеточный нацеливающий домен, содержащий пептид, который презентуется белком MHC.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, внеклеточный нацеливающий домен связывается с клеткой-мишенью или молекулой клеточной поверхности с аффинностью связывания от 10^{-9} до 10^{-8} М, от 10^{-8} до 10^{-7} М, от 10^{-7} до 10^{-6} М, от 10^{-6} до 10^{-5} М, от 10^{-5} до 10^{-4} М, от 10^{-4} до 10^{-3} М или от 10^{-3} до 10^{-2} М. В некоторых вариантах осуществления изобретения, внеклеточный нацеливающий домен связывается с родственным белком или лигандом клетки-мишени с аффинностью связывания от 10^{-9} до 10^{-8} М, от 10^{-8} до 10^{-7} М, от 10^{-7} до 10^{-6} М, от 10^{-6} до 10^{-5} М, от 10^{-5} до 10^{-4} М, от 10^{-4} до 10^{-3} М или от 10^{-3} до 10^{-2} М. В некоторых вариантах осуществления изобретения, аффинность связывания между внеклеточным нацеливающим доменом и родственным белком или

лигандом находится в диапазоне от пикомолярного до наномолярного (например, приблизительно от 10^{-12} до приблизительно 10^{-9} М). В некоторых вариантах осуществления изобретения, аффинность связывания между внеклеточным нацеливающим доменом и родственным белком или лигандом находится в диапазоне от наномолярного до микромолярного (например, приблизительно от 10^{-9} до приблизительно 10^{-6} М). В некоторых вариантах осуществления изобретения, аффинность связывания между внеклеточным нацеливающим доменом и родственным белком или лигандом находится в диапазоне от микромолярного до миллимолярного (например, приблизительно от 10^{-6} до приблизительно 10^{-3} М). В некоторых вариантах осуществления изобретения, аффинность связывания между внеклеточным нацеливающим доменом и родственным белком или лигандом находится в диапазоне от пикомолярного до микромолярного (например, приблизительно от 10^{-12} до приблизительно 10^{-6} М). В некоторых вариантах осуществления изобретения, аффинность связывания между внеклеточным нацеливающим доменом и родственным белком или лигандом находится в диапазоне от наномолярного до миллимолярного (например, приблизительно от 10^{-9} до приблизительно 10^{-3} М).

Используемый здесь термин «антитело» обычно относится к белку, который включает по меньшей мере один переменный домен иммуноглобулина или последовательность переменного домена иммуноглобулина. Например, антитело может включать переменную область тяжелой (H) цепи (сокращенно обозначаемую здесь как V_H) и/или переменную область легкой (L) цепи (сокращенно обозначаемую здесь как V_L). В другом примере, антитело включает две переменные области тяжелой (H) цепи и/или две переменные области легкой (L) цепи. Антитело может иметь структурные особенности IgA, IgG, IgE, IgD, IgM (а также их подтипы). Области V_H и V_L могут быть дополнительно подразделены на области с гипервариабельностью, называемые «комплементарность-определяющими областями» («CDR»), и перемежающиеся с областями, которые являются более консервативными и называются «каркасными областями» («FR»). Каждая V_H и/или V_L обычно состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от аминоконца до карбокси-конца в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Цепи V_H или V_L антитела могут дополнительно включать константную область тяжелой или легкой цепи, что таким образом способствует образованию тяжелой или легкой цепи иммуноглобулина, соответственно. В некоторых вариантах осуществления изобретения, антитело представляет собой тетрамер двух тяжелых цепей иммуноглобулинов и двух легких цепей иммуноглобулинов, где тяжелые и легкие цепи иммуноглобулинов являются взаимосвязанными, например, они связаны дисульфидными связями. В IgG, константная область тяжелой цепи включает три домена иммуноглобулина, CH1, CH2 и CH3.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, ретровирус, присутствующий в библиотеке ретровирусов, содержит такой же внеклеточный нацеливающий домен, как и некоторые или все другие ретровирусы в библиотеке. В некоторых вариантах осуществления изобретения, каждый ретровирус, присутствующий в библиотеке

ретровирусов, содержит другой внеклеточный нацеливающий домен, отличающийся от некоторых или всех других ретровирусов в библиотеке.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, невирусный мембраносвязанный белок дополнительно содержит сигнальную последовательность (также называемую сигнальным пептидом последовательности определения локализации). В некоторых вариантах осуществления изобретения, сигнальная последовательность находится на N- или C-концах невирусного мембраносвязанного белка. Сигнальная последовательность способствует перемещению невирусного мембраносвязанного белка в мембрану (или оболочку) ретровируса. В некоторых вариантах осуществления изобретения, сигнальная последовательность представляет собой последовательность из 5-10, 5-15, 10-20, 15-20, 15-30, 20-30 или 25-30 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления изобретения, сигнальная последовательность представляет собой лидерную последовательность Ig каппа (например, лидерную последовательность мышинового Ig каппа, содержащую: METDTLLLLWVLLLWVPGSTG (SEQ ID NO: 1)) или последовательность сигнального пептида B2M (например, последовательность сигнального пептида B2M, содержащую: MSRSVALAVLALLSLSGLEA (SEQ ID NO:2)). В некоторых вариантах осуществления изобретения, ретровирус, присутствующий в библиотеке ретровирусов, содержит такую же сигнальную последовательность, как и некоторые или все другие ретровирусы в библиотеке. В некоторых вариантах осуществления изобретения, каждый ретровирус, присутствующий в библиотеке ретровирусов, содержит другую сигнальную последовательность, отличающуюся от некоторых или всех других ретровирусов в библиотеке.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, нуклеиновая кислота, кодирующая невирусный мембраносвязанный белок, дополнительно содержит внутренний сайт связывания с рибосомой (IRES). IRES представляет собой последовательность РНК, которая позволяет инициировать трансляцию во время синтеза белка. В некоторых вариантах осуществления изобретения, IRES расположен на C-конце или рядом с ним. В некоторых вариантах осуществления изобретения, IRES расположен на C-конце по отношению к мембраносвязанному домену и внеклеточному нацеливающему домену. В некоторых вариантах осуществления изобретения, IRES является вирусным IRES. В некоторых вариантах осуществления изобретения, IRES представляет собой IRES, который является нативным для ретровируса. В некоторых вариантах осуществления изобретения, IRES представляет собой последовательность, происходящую от вируса энцефаломиокардита (EMCV). В некоторых вариантах осуществления изобретения, ретровирус, присутствующий в библиотеке ретровирусов, содержит такую же IRES, как и некоторые или все другие ретровирусы в библиотеке. В некоторых вариантах осуществления изобретения, каждый ретровирус, присутствующий в библиотеке ретровирусов, содержит другую IRES, отличающуюся от некоторых или всех других ретровирусов в библиотеке.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, невирусный

мембраносвязанный белок дополнительно содержит линкер, расположенный между мембраносвязанным доменом и внеклеточным нацеливающим доменом. Линкер представляет собой аминокислотный линкер и может быть жестким линкером, гибким линкером или олигомеризованным линкером. Жесткий линкер представляет собой аминокислотную последовательность, лишенную гибкости (например, она может содержать по меньшей мере один пролин). В некоторых вариантах осуществления изобретения, жесткий линкер содержит стебель рецептора тромбоцитарного фактора роста (PDGFR) или стебель CD8 α . В некоторых вариантах осуществления изобретения, стебель PDGFR содержит аминокислотную последовательность, включающую AVGQDTQEVIVVPHSLPFK (SEQ ID NO: 3). В некоторых вариантах осуществления изобретения, стебель PDGFR содержит аминокислотную последовательность, содержащую ASAKPTTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEAARPAAGGAVHTRGLDFAK (SEQ ID NO: 4). Гибкий линкер представляет собой аминокислотную последовательность, которая имеет много степеней свободы (например, она может содержать множество аминокислот с небольшими боковыми цепями, например, глицин или аланин). В некоторых вариантах осуществления изобретения, гибкий линкер содержит аминокислотную последовательность, включающую GAPGAS (SEQ ID NO: 5). В некоторых вариантах осуществления изобретения, гибкий линкер содержит аминокислотную последовательность, состоящую из GAPGSGGGGSGGGGSAS (SEQ ID NO: 6). В некоторых вариантах осуществления изобретения, гибкий линкер содержит аминокислотную последовательность, включающую GGGGS (SEQ ID NO: 7). В некоторых вариантах осуществления изобретения, гибкий линкер содержит аминокислотную последовательность, включающую (GAPGAS)_N (SEQ ID NO: 52) или (G₄S)_N (SEQ ID NO: 53), где N равно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более. Олигомеризованный линкер представляет собой аминокислоту, которая может олигомеризоваться в другую родственную аминокислоту. В некоторых вариантах осуществления изобретения, олигомеризованный линкер представляет собой аминокислотную последовательность, которая может образовывать димер, тример или тетрамер. В некоторых вариантах осуществления изобретения, олигомеризованный линкер содержит шарнирный домен IgG4 (например, ASESKYGPPCPPCPAVGQDTQEVIVVPHSLPFK (SEQ ID NO: 8)). В некоторых вариантах осуществления изобретения, олигомеризованный линкер содержит аминокислотную последовательность, которая может образовывать тетрамерную суперспирализованную спираль (например, ASGGGSGELAAIKQELAAIKKELAAIKWELAAIKQGAG (SEQ ID NO: 9)). В некоторых вариантах осуществления изобретения, олигомеризованный линкер содержит аминокислотную последовательность, которая может образовывать димерную суперспирализованную спираль (например, ASESKYGPPCPPCP (SEQ ID NO: 10)).

В некоторых вариантах осуществления изобретения, невирусный мембраносвязанный белок содержит SCF или его усеченный вариант, стебель PGDFR и трансмембранный домен PGDFRb. В некоторых вариантах осуществления изобретения, невирусный мембраносвязанный белок содержит S4-3a или его усеченный вариант, стебель

PGDFR и трансмембранный домен PGDFRb. В некоторых вариантах осуществления изобретения, невирусный мембраносвязанный белок содержит FLT3L, стебель PGDFR и трансмембранный домен PGDFRb. В некоторых вариантах осуществления изобретения, невирусный мембраносвязанный белок содержит TPO или его усеченный вариант, стебель PGDFR и трансмембранный домен PGDFRb.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, невирусный мембраносвязанный белок содержит SCF или его усеченный вариант, шарнирную область IgG4 и трансмембранный домен PGDFRb. В некоторых вариантах осуществления изобретения, невирусный мембраносвязанный белок содержит S4-3a или его усеченный вариант, шарнирную область IgG4 и трансмембранный домен PGDFRb. В некоторых вариантах осуществления изобретения, невирусный мембраносвязанный белок содержит FLT3L, шарнирную область IgG4 и трансмембранный домен PGDFRb. В некоторых вариантах осуществления изобретения, невирусный мембраносвязанный белок содержит TPO или его усеченный вариант, шарнирную область IgG4 и трансмембранный домен PGDFRb.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, невирусный мембраносвязанный белок содержит аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 28, 29, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48 или 50.

Способы доставки нуклеиновой кислоты в гемопоэтическую стволовую клетку (HSC)

В настоящей заявке описаны способы доставки нуклеиновой кислоты в HSC, включающие (i) получение описанного здесь ретровируса, содержащего нуклеиновую кислоту, вирусный белок оболочки, имеющий по меньшей мере одну мутацию, которая уменьшает его нативную функцию, и невирусный мембраносвязанный белок, содержащий внеклеточный нацеливающий домен, который способен связываться с родственным лигандом клетки; и (ii) контактирование ретровируса с клеткой таким образом, чтобы ретровирус проникал в клетку или инфицировал клетку. В некоторых вариантах осуществления изобретения, нуклеиновая кислота кодирует молекулу мРНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения, мРНК является представляющим интерес геном. В некоторых вариантах осуществления изобретения, нуклеиновая кислота кодирует двухцепочечную РНК, антисмысловую РНК, микроРНК или любую другую молекулу РНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения, представляющий интерес ген кодирует белок. В некоторых вариантах осуществления изобретения, представляющий интерес ген кодирует терапевтический белок (например, белок для устранения патологического состояния у индивидуума).

В некоторых вариантах осуществления изобретения, нуклеиновая кислота кодирует химерный антигенный рецептор. В некоторых вариантах осуществления изобретения, химерный антигенный рецептор содержит внеклеточный домен, включающий антигенсвязывающий домен (например, антитело, такое как scFv), трансмембранный домен и цитоплазматический домен. В некоторых вариантах осуществления изобретения,

внеклеточный домен специфически связывается с опухолевым антигеном. В некоторых вариантах осуществления изобретения, опухолевым антигеном является любой из CD19, BCMA, альфа-фолатного рецептора, 5T4, Ab-интегрин, B7-H3, B7-H6, CAIX, CD20, CD22, CD23, CD30, CD33, CD38, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD52, CD70, CD79a, CD79b, CD80, CD123, CD138, CD171, CEA, CSPG4, EGFR, ErbB2 (HER2), EGFRvIII, EGP2, EGP40, EpCAM, FAP, AChR плода, FLT3, Fra, GD2, GD3, глипикана-3 (GPC3), HLA-A1+MAGE1, HLA-A2+MAGE1, HLA-A3+MAGE1, HLA-A1+NY-ESO-1, HLA-A2+NY-ESO-1, HLA-A3+NY-ESO-1, HLADR, IL-11R-альфа, IL-13R-альфа 2, лямбда, антигена Lewis-Y, каппа, мезотелина, Muc1, Muc16, лигандов NCAM, NKG2d, NY-ESO-1, PRAME, PSCA, PSMA, ROR1, SSX, сурвивина, TAG72, TEMs, VEGFR2, BAFF-R, клаудина 18.2, CD86, FcRL5, GPRC5 и TACI. В некоторых вариантах осуществления изобретения, внеклеточный домен химерного антигенного рецептора включает антигенсвязывающий домен и по меньшей мере один из сигнального пептида и/или внеклеточного спейсерного домена (например, шарнирного домена). В некоторых вариантах осуществления изобретения, сигнальный пептид усиливает специфичность химерного антигенного рецептора к антигену. В некоторых вариантах осуществления изобретения, внеклеточный спейсерный домен расположен между антигенсвязывающим доменом и трансмембранным доменом химерного антигенного рецептора. В некоторых вариантах осуществления изобретения, шарнирный домен представляет собой шарнирный домен, происходящий от IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgD, CD8a, CD4, CD28 или CD7. В некоторых вариантах осуществления изобретения, трансмембранный домен представляет собой гидрофобную альфа-спираль, которая охватывает клеточную мембрану и тем самым обеспечивает стабильность химерного антигенного рецептора. В некоторых вариантах осуществления изобретения, трансмембранный домен представляет собой трансмембранный домен CD28, CD2, CD4, CD8a, CD5, CD3ε, CD3δ, CD3ζ, CD9, CD16, CD22, CD25, CD27, CD33, CD37, CD40, CD45, CD64, CD79A, CD79B, CD80, CD86, CD95 (Fas), CD134 (OX40), CD137 (4-1BB), CD150 (SLAMF1), CD152 (CTLA4), CD154 (CD40L), CD200R, CD223 (LAG3), CD270 (HVEM), CD272 (BTLA), CD273 (PD-L2), CD274 (PD-L1), CD278 (ICOS), CD279 (PD-1), CD300, CD357 (GITR), A2aR, DAP10, FcRα, FcRβ, FcRγ, Fyn, GAL9, KIR, Lck, LAT, LRP, NKG2D, NOTCH1, NOTCH2, NOTCH3, NOTCH4, PTH2, ROR2, Ryk, Slp76, SIRPα, pTα, TCRα, TCRβ, TIM3, TRIM, LPA5 и Zap70. В некоторых вариантах осуществления изобретения, цитоплазматический домен химерного антигенного рецептора представляет собой белковый домен, который после распознавания антигена вызывает передачу сигнала внутри клетки. В некоторых вариантах осуществления изобретения, цитоплазматический домен включает сигнальный домен, содержащий ITAM. В некоторых вариантах осуществления изобретения, сигнальный домен, содержащий ITAM, представляет собой внутриклеточный сигнальный домен любого из CD3γ, CD3δ, CD3ε, CD3ζ, CD5, CD22, CD79a, CD278 (ICOS), DAP10, DAP12, FcRγ и CD66d. В некоторых вариантах осуществления изобретения, цитоплазматический домен дополнительно содержит один или более костимулирующих сигнальных доменов. В некоторых вариантах осуществления изобретения,

костимулирующий сигнальный домен представляет собой внутриклеточный сигнальный домен любого из CD27, CD28, CD40L, GITR, NKG2C, CARD1, CD2, CD7, CD27, CD30, CD40, CD54 (ICAM), CD83, CD134 (OX-40), CD137 (4-1BB), CD150 (SLAMF1), CD152 (CTLA4), CD223 (LAG3), CD226, CD270 (HVEM), CD273 (PD-L2), CD274 (PD-L1), CD278 (ICOS), DAP10, LAT, LFA-1, LIGHT, NKG2C, NKD2C, SLP76, TRIM и ZAP70.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, нуклеиновая кислота кодирует белок, редактирующий ген. Белком, редактирующим ген, может быть Cas-эндонуклеаза, Cpf1-эндонуклеаза, нуклеаза «цинковые пальцы», эффекторная нуклеаза, подобная активатору транскрипции (TALEN), или мегануклеаза.

Cas-эндонуклеаза может представлять собой Cas9-эндонуклеазу, инактивированную Cas-эндонуклеазу (dCas, например, dCas9) В некоторых вариантах осуществления изобретения, Cas-эндонуклеаза происходит от *Streptococcus pyogenes*. Cas-эндонуклеаза может быть Cas-эндонуклеазой дикого типа или модифицированными или мутантными вариантами Cas-эндонуклеазы.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, нуклеиновая кислота представляет собой направляющую РНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения, направляющая РНК имеет длину 20-200, 20-100, 50-200, 50-150 или приблизительно 100 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления изобретения, направляющая РНК представляет собой одномолекулярную направляющую РНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения, направляющая РНК содержит спейсерную последовательность, которая связывается с последовательностью гена-мишени. В некоторых вариантах осуществления изобретения, спейсерная последовательность имеет длину 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 нуклеотидов.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, нуклеиновая кислота доставляется в клетку, когда ретровирус проникает в клетку или инфицирует ее на стадии (ii). В некоторых вариантах осуществления изобретения, описанные здесь способы доставки нуклеиновой кислоты не требуют трансфецирующего агента (например, липофильного трансфецирующего агента, такого как липофектин).

Способы редактирования генов

В настоящей заявке описаны способы редактирования генов в клетке-мишени (например, гемопоэтической стволовой клетке (HSC)), включающие (i) получение ретровируса, содержащего одну или более нуклеиновых кислот, кодирующих композицию для редактирования генов, белок вирусной оболочки, содержащий по меньшей мере одну мутацию, которая уменьшает его нативную функцию, и невирусный мембраносвязанный белок, содержащий внеклеточный нацеливающий домен, который связывается с белком на поверхности клетки-мишени; и (ii) контактирование ретровируса с клеткой-мишенью таким образом, что одна или более нуклеиновых кислот, кодирующих композицию для редактирования генов, доставляются в клетку-мишень, где композиция для редактирования генов специфически нацелена на участок хромосомной ДНК клетки-мишени и вызывает

генетическую модификацию.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, композиция для редактирования генов содержит одну или более нуклеиновых кислот, где одна или более нуклеиновых кислот кодируют белок для редактирования генов и/или направляющую РНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения, композиция для редактирования генов содержит одну или более нуклеиновых кислот, где одна или более нуклеиновых кислот кодируют белок для редактирования генов. В некоторых вариантах осуществления изобретения, композиция для редактирования генов содержит одну или более нуклеиновых кислот, где одна или более нуклеиновых кислот кодируют белок для редактирования генов и направляющую РНК.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, ген может быть использован для коррекции или уменьшения дефектов гена, которые могут включать дефекты, при которых нормальные гены экспрессируются на уровнях ниже нормы, или дефекты, при которых функциональный продукт гена не экспрессируется. Альтернативно, ген может обеспечивать клетку продуктом, который изначально не экспрессируется в клетке данного типа или в организме хозяина. Последовательность генов этого типа кодирует терапевтический белок или полипептид, который экспрессируется в клетке-хозяине. Настоящее изобретение также включает использование множества генов. В некоторых ситуациях, другой ген может быть использован для кодирования каждой субъединицы белка или для кодирования различных пептидов или белков. Это желательно в том случае, когда размер ДНК, кодирующей белковую субъединицу, является слишком большим.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, нуклеиновая кислота кодирует белок, редактирующий ген. Белком, редактирующим ген, может быть Cas-эндонуклеаза, Cpf1-эндонуклеаза, нуклеаза «цинковые пальцы», эффекторная нуклеаза, подобная активатору транскрипции (TALEN), или мегануклеаза.

Cas-эндонуклеаза может представлять собой Cas9-эндонуклеазу, инактивированную Cas-эндонуклеазу (dCas, например, dCas9). В некоторых вариантах осуществления изобретения, Cas-эндонуклеаза происходит от *Streptococcus pyogenes*. Cas-эндонуклеаза может быть Cas-эндонуклеазой дикого типа или модифицированными или мутантными вариантами Cas-эндонуклеазы.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, нуклеиновая кислота представляет собой направляющую РНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения, направляющая РНК имеет длину 20-200, 20-100, 50-200, 50-150 или приблизительно 100 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления изобретения, направляющая РНК представляет собой одномолекулярную направляющую РНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения, направляющая РНК содержит спейсерную последовательность, которая связывается с последовательностью гена-мишени. В некоторых вариантах осуществления изобретения, спейсерная последовательность имеет длину 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 нуклеотидов.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, способ редактирования гена дополнительно включает доставку нуклеиновой кислоты, кодирующей химерный антигенный рецептор. Химерный антигенный рецептор, в некоторых вариантах осуществления изобретения, содержит внеклеточный домен, включающий антигенсвязывающий домен (например, антитело, такое как scFv), трансмембранный домен и цитоплазматический домен. В некоторых вариантах осуществления изобретения, внеклеточный домен химерного антигенного рецептора включает антигенсвязывающий домен и по меньшей мере один из сигнального пептида и/или шарнирного домена. В некоторых вариантах осуществления изобретения, сигнальный пептид усиливает специфичность химерного антигенного рецептора к антигену. В некоторых вариантах осуществления изобретения, шарнирный домен расположен между внеклеточным доменом и трансмембранным доменом химерного антигенного рецептора. В некоторых вариантах осуществления изобретения, трансмембранный домен представляет собой гидрофобную альфа-спираль, которая охватывает клеточную мембрану и обеспечивает стабильность химерного антигенного рецептора. В некоторых вариантах осуществления изобретения, цитоплазматический домен химерного антигенного рецептора представляет собой белковый домен, который после распознавания антигена, вызывает передачу сигнала внутри клетки.

Нуклеиновые кислоты

Используемый здесь термин «нуклеиновые кислоты» обычно относится к множественным связанным нуклеотидам (то есть, к молекулам, содержащим сахар (например, рибозу или дезоксирибозу), связанным с заменяемым органическим основанием, которое является либо пиримидином (например, цитозином (C), тимидином (T) или урацилом (U)), либо пурином (например, аденином (A) или гуанином (G)). Нуклеиновые кислоты включают ДНК, такую как ДНК D-формы и ДНК L-формы, и РНК, а также различные их модификации. Модификации включают модификации основания, модификации сахара и модификации остова.

Следует отметить, что нуклеиновые кислоты, используемые в ретровирусах и способах согласно изобретению, могут быть гомогенными или гетерогенными по своей природе. В качестве примера, они могут быть полностью ДНК по своей природе или они могут состоять из мономеров или последовательностей ДНК и не-ДНК (например, LNA). Таким образом, может быть использована любая комбинация элементов нуклеиновой кислоты. Модификация может сообщать нуклеиновой кислоте большую стабильность и/или меньшую восприимчивость к разложению в определенных условиях. Например, в некоторых случаях, нуклеиновые кислоты устойчивы к нуклеазам. Способы синтеза нуклеиновых кислот, включая автоматизированный синтез нуклеиновых кислот, также известны специалистам в данной области.

Нуклеиновые кислоты могут содержать модификации в своих основаниях. Модифицированными основаниями являются модифицированные цитозины (такие как 5-замещенные цитозины (например, 5-метилцитозин, 5-фторцитозин, 5-хлорцитозин, 5-

бромцитозин, 5-йодоцитозин, 5-гидроксицитозин, 5-гидроксиметилцитозин, 5-дифторметилцитозин и незамещенный или замещенный 5-алкинилцитозин), 6-замещенные цитозины, N4-замещенные цитозины (например, N4-этилцитозин), 5-аза-цитозин, 2-меркаптоцитозин, изоцитозин, псевдо-изоцитозин, аналоги цитозина с конденсированными кольцевыми системами (например, N, N'-пропиленцитозин или феноксазин), а также урацил и его производные (например, 5-фторурацил, 5-бромуррацил, 5-бромовинилурацил, 4-тиоурацил, 5-гидроксиурацил, 5-пропинилурацил), модифицированные гуанины, такие как 7-деазагуанин, 7-деаза-7-замещенный гуанин (такой как 7-деаза-7-(С2-С6)алкинилгуанин), 7-диаза-8-замещенный гуанин, гипоксантин, N2-замещенные гуанины (например, N2-метилгуанин), 5-амино-3-метил-3Н,6Н-тиазоло[4,5-d]пиримидин-2,7-дион, 2,6-диаминопурин, 2-аминопурин, пурин, индол, аденин, замещенные аденины (например, N6-метиладенин, 8-оксоаденин), 8-замещенный гуанин (например, 8-гидроксигуанин и 8-бромгуанин) и 6-тиогуанин. Нуклеиновые кислоты могут содержать универсальные основания (например, 3-нитропиррол, Р-основание, 4-метилиндол, 5-нитроиндол и К-основание) и/или системы ароматических колец (например, фторбензол, дифторбензол, бензимидазол или дихлорбензимидазол, амид 1-метил-1Н-[1,2,4]триазол-3-карбоновой кислоты). Конкретная пара оснований, которая может быть включена в олигонуклеотиды согласно изобретению, представляет собой нестандартную пару нуклеиновых оснований dZ и dP, описанную Yang et al. NAR, 2006, 34(21):6095-6101. dZ, аналог пиримидина, представляет собой 6-амино-5-нитро-3-(1'-β-D-2'-дезоксирибофуранозил)-2(1H)-пиридон, а его комплемент Уотсона-Крика dP, аналог пурина, представляет собой 2-амино-8-(1'-β-D-1'-дезоксирибофуранозил)-имидазо[1,2-a]-1,3,5-триазин-4(8H)-он.

Аминокислотные замены

В некоторых вариантах осуществления изобретения, варианты аминокислотных остатков представляют собой консервативные замены аминокислотных остатков. Используемый здесь термин «консервативная аминокислотная замена» относится к аминокислотной замене, которая не изменяет относительный заряд или размер белка, в котором была сделана аминокислотная замена. Варианты могут быть получены в соответствии со способами изменения полипептидной последовательности, известными специалисту в данной области, такими как способы, приведенные в ссылках, в которых представлен список таких способов, например, в руководствах *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, J. Sambrook, et al., eds., Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989, или *Current Protocols in Molecular Biology*, F.M. Ausubel, et al., eds., John Wiley & Sons, Inc., New York. Консервативные замены аминокислот включают замены, проведенные среди аминокислот в следующих группах: (a) M, I, L, V; (b) F, Y, W; (c) K, R, H; (d) A, G; (e) S, T; (f) Q, N; и (g) E, D.

«Процент идентичности» двух аминокислотных последовательностей определяют с использованием алгоритма Karlin and Altschul Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-68, 1990, модифицированного Karlin и Altschul Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-77, 1993. Такой алгоритм включен в программы NBLAST и XBLAST (версия 2.0) Altschul et al. J. Mol. Biol.

215:403-10, 1990. Поиск белков BLAST может быть осуществлен с помощью программы XBLAST, количество баллов=50, длина слова=3, чтобы получить аминокислотные последовательности, гомологичные молекулам представляющего интерес белка. Если между двумя последовательностями имеются пробелы, то может быть использована программа BLAST с пробелами, как описано в публикации Altschul et al., *Nucleic Acids Res.* 25(17):3389-3402, 1997. При использовании программ BLAST и BLAST с пробелами можно использовать параметры по умолчанию соответствующих программ (например, XBLAST и NBLAST).

Репортер

В некоторых вариантах осуществления изобретения, ретровирусы, описанные в настоящей заявке, могут содержать репортер (например, репортерный белок). В некоторых вариантах осуществления изобретения, описанные здесь ретровирусы содержат нуклеиновую кислоту, кодирующую репортер (например, репортерный белок). Используемый здесь термин «репортер» обычно означает белок или ген, который может быть обнаружен при экспрессии в ретровирусе и/или в клетке-мишени. В некоторых вариантах осуществления изобретения, присутствие или отсутствие репортера в клетке-мишени или в субпопуляции клеток-мишеней обеспечивает возможность сортировки клеток (например, с помощью проточной цитометрии и/или клеточного сортирования с активацией флуоресценции).

В некоторых вариантах осуществления изобретения, репортером является флуоресцентный белок. Флуоресцентным белком может быть белок, флуоресцирующий в зеленом диапазоне спектра (GFP), белок, флуоресцирующий в желтом диапазоне спектра (YFP), белок, флуоресцирующий в красном диапазоне спектра (RFP). Флуоресцентный белок может быть таким, как описано в патенте США № 7060869, озаглавленном «Датчики флуоресцентного белка для обнаружения анализируемых веществ».

В некоторых вариантах осуществления изобретения, репортер представляет собой маркер резистентности к антибиотикам. В некоторых вариантах осуществления изобретения, маркером резистентности к антибиотикам является белок или ген, который сообщает конкурентное преимущество клетке-мишени, содержащей маркер. В некоторых вариантах осуществления изобретения, маркер резистентности к антибиотикам включает белок или ген резистентности к гигромицину, белок или ген резистентности к канамицину, белок или ген резистентности к ампициллину, белок или ген резистентности к стрептомицину или белок или ген резистентности к неомицину.

Клетки

Описанной здесь клеткой может быть любая бактериальная клетка, клетка млекопитающего или клетка дрожжей. В некоторых вариантах осуществления изобретения, клеткой является клетка человека, мыши, крысы или приматов, не являющихся человеком. В некоторых вариантах осуществления изобретения, клетка представляет собой стволовую клетку. В некоторых вариантах осуществления изобретения, клетка представляет собой гемопоэтическую стволовую клетку (HSC).

В некоторых вариантах осуществления изобретения, клетка представляет собой соматическую клетку или репродуктивную клетку. В некоторых вариантах осуществления изобретения, клетка представляет собой эпителиальную клетку, нервную клетку, секретирующую гормон клетку, иммунную клетку, секреторную клетку, клетку крови, интерстициальную клетку или зародышевую клетку. В некоторых вариантах осуществления изобретения, клетка представляет собой антигенспецифическую клетку (например, клетку, которая связывается со специфическим антигеном). В некоторых вариантах осуществления изобретения, антигенспецифическая клетка представляет собой иммунную клетку. В некоторых вариантах осуществления изобретения, антигенспецифическая клетка представляет собой В-клетку или Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления изобретения, клетка является клеткой-мишенью (например, которая содержит родственный белок или лиганд, способный быть мишенью для ретровируса, описанного в настоящей заявке).

Популяция клеток, описанная в настоящей заявке, может представлять собой любую популяцию клеток бактерий, млекопитающих или дрожжей. В некоторых вариантах осуществления изобретения, популяция клеток представляет собой популяцию клеток человека, мыши, крысы или приматов, не являющихся человеком. В некоторых вариантах осуществления изобретения, популяция клеток представляет собой популяцию соматических клеток или популяцию репродуктивных клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения, популяция клеток включает эпителиальные клетки, нервные клетки, клетки, секретирующие гормоны, иммунные клетки, секреторные клетки, клетки крови, интерстициальные клетки и/или зародышевые клетки. В некоторых вариантах осуществления изобретения, популяция клеток включает антигенспецифические клетки (например, клетки, которые связываются со специфическим антигеном). В некоторых вариантах осуществления изобретения, популяция антигенспецифических клеток включает иммунные клетки. В некоторых вариантах осуществления изобретения, популяция антигенспецифических клеток включает В-клетки и/или Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления изобретения, популяция клеток включает гомогенную популяцию клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения, популяция клеток включает гетерогенную популяцию клеток.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, популяция клеток представляет собой популяцию клеток, выделенных у индивидуума. Индивидуумом может быть человек (например, человек, страдающий заболеванием), мышь, крыса или примат, не являющийся человеком. В некоторых вариантах осуществления изобретения, популяцию клеток выделяют из крови или опухоли индивидуума.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, популяция клеток была предварительно заморожена и разморожена (например, за 1, 2, 3, 4, 5 или более циклов замораживания/оттаивания). В некоторых вариантах осуществления изобретения, популяцию клеток поддерживают в жидких культуральных средах. В некоторых вариантах осуществления изобретения, популяцию клеток пассировали 1, 2, 3, 4, 5 или более раз с

применением любого известного способа. В некоторых вариантах осуществления изобретения, популяцию клеток поддерживают в жидких культуральных средах перед объединением с ретровирусом или множеством ретровирусов. В некоторых вариантах осуществления изобретения, популяцию клеток поддерживают в жидких культуральных средах после их объединения с ретровирусом или множеством ретровирусов. В некоторых вариантах осуществления изобретения, популяцию клеток поддерживают в жидких культуральных средах до их объединения с ретровирусом или множеством ретровирусов.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, популяция клеток содержит любой из описанных здесь ретровирусов. В некоторых вариантах осуществления изобретения, субпопуляция клеток содержит любой из описанных здесь ретровирусов. В некоторых вариантах осуществления изобретения, субпопуляция клеток содержит ретровирус внутри каждой клетки данной субпопуляции (например, внутри ядра каждой клетки данной субпопуляции). В некоторых вариантах осуществления изобретения, популяция клеток или их субпопуляция экспрессирует репортер (например, флуоресцентный белок или маркер резистентности к антибиотикам). В некоторых вариантах осуществления изобретения, популяцию клеток или их субпопуляцию (например, содержащую ретровирус) выделяют и/или сортируют на основе присутствия или отсутствия репортера. В некоторых вариантах осуществления изобретения, субпопуляцию клеток, которые содержат описанный здесь ретровирус, выделяют и/или сортируют на основе присутствия или отсутствия репортера отдельно от клеток популяции, которые не содержат ретровирус. В некоторых вариантах осуществления изобретения, по меньшей мере 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 95% популяции клеток до сортировки клеток содержат ретровирус. В некоторых вариантах осуществления изобретения, по меньшей мере 70%, 80%, 90%, 95%, или 100% популяции клеток содержат ретровирус после выделения и/или сортировки на основе присутствия или отсутствия репортера.

Используемый здесь термин «объединения» (который в некоторых вариантах осуществления изобретения, является синонимом терминов «обеспечение» и «контактирование») обычно относится к инициации тесного физического контакта ретровируса с популяцией клеток, так, чтобы внеклеточный нацеливающий домен ретровируса был способен связываться с родственным лигандом, присутствующим в субпопуляции клеток данной популяции. В некоторых вариантах осуществления изобретения, объединение ретровируса и популяции клеток происходит при смешивании раствора, содержащего ретровирус, и раствора, содержащего популяцию клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения, объединение ретровируса и популяции клеток происходит при смешивании лиофилизованного ретровируса и раствора, содержащего популяцию клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения, объединение ретровируса и популяции клеток происходит в том случае, когда лиофилизированный ретровирус и лиофилизованную популяцию клеток смешивают и восстанавливают раствором. В некоторых вариантах осуществления изобретения, клетки популяции поддерживают в среде для культивирования клеток, в монослое клеток и/или

прикрепляют к планшету для культивирования тканей или к чашке Петри.

Обычно, ретровирус и популяцию клеток объединяют (например, физически объединяют или подвергают контактированию) в течение определенного периода времени. В некоторых вариантах осуществления изобретения, период времени определяется в секундах, минутах, часах или днях. В некоторых вариантах осуществления изобретения, период времени составляет 0-30 секунд, 15-45 секунд, 30-60 секунд, 45-90 секунд, 60-90 секунд или 60-120 секунд. В некоторых вариантах осуществления изобретения, ретровирус и популяцию клеток объединяют и подвергают контактированию в течение 0-30 секунд, 15-45 секунд, 30-60 секунд, 45-90 секунд, 60-90 секунд или 60-120 секунд. В некоторых вариантах осуществления изобретения, период времени составляет 1-2 минуты, 1-5 минут, 1-10 минут, 2-10 минут, 5-10 минут, 5-20 минут, 10-20 минут, 25-30 минут, 25-60 минут, 30-45 минут, 30-40 минут, 40-60 минут, 50-70 минут или 60-120 минут. В некоторых вариантах осуществления изобретения, ретровирус и популяцию клеток объединяют и подвергают контактированию в течение 1-2 минут, 1-5 минут, 1-10 минут, 2-10 минут, 5-10 минут, 5-20 минут, 10-20 минут, 25-30 минут, 25-60 минут, 30-45 минут, 30-40 минут, 40-60 минут, 50-70 минут или 60-120 минут. В некоторых вариантах осуществления изобретения, период времени составляет 1-2 часа, 1-5 часов, 1-3 часа, 2-5 часов, 3-6 часов, 3-12 часов, 6-12 часов, 12-18 часов, 12-24 часа, 15-30 часов, 18-24 часа, 24-48 часов, 24-36 часов или 36-50 часов. В некоторых вариантах осуществления изобретения, ретровирус и популяцию клеток объединяют и подвергают контактированию в течение 1-2 часов, 1-5 часов, 1-3 часов, 2-5 часов, 3-6 часов, 3-12 часов, 6-12 часов, 12-18 часов, 12-24 часов, 15-30 часов, 18-24 часов, 24-48 часов, 24-36 часов или 36-50 часов. В некоторых вариантах осуществления изобретения, период времени составляет 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или 5-15 дней. В некоторых вариантах осуществления изобретения, ретровирус и популяцию клеток объединяют и подвергают контактированию в течение 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или 5-15 дней.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, популяцию клеток сортируют на основе присутствия или отсутствия репортера. В некоторых вариантах осуществления изобретения, субпопуляцию клеток, содержащих репортер (например, экспрессирующих репортер), сортируют из оставшейся субпопуляции клеток, которые не содержат репортера. В некоторых вариантах осуществления изобретения, сортировку популяции клеток осуществляют с использованием проточной цитометрии (например, сортировки клеток с активацией флуоресценции), путем секвенирования генома следующего поколения (например, секвенирования отдельных клеток следующего поколения) или отбора на антибиотики.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, условия проведения стадии (ii), которые позволяют ретровирусу взаимодействовать с субпопуляцией клеток, включают объединение ретровируса и популяции клеток в присутствии определенных растворов, композиций и при определенных температурах. В некоторых вариантах осуществления изобретения, ретровирус и популяцию клеток объединяют в присутствии среды для культивирования клеток (например, среды для культивирования клеток RPMI или DMEM).

В некоторых вариантах осуществления изобретения, ретровирус и популяцию клеток объединяют в присутствии забуференного физиологического раствора. В некоторых вариантах осуществления изобретения, забуференный физиологический раствор представляет собой фосфатно-буферный физиологический раствор или HEPES-забуференный физиологический раствор. В некоторых вариантах осуществления изобретения, забуференный физиологический раствор содержит альбумин бычьей сыворотки и/или EDTA. В некоторых вариантах осуществления изобретения, ретровирус и популяцию клеток объединяют в присутствии энхансера ретровирусной трансдукции (например, сульфата гепарина, полибрена, сульфата протамина или декстрана). В некоторых вариантах осуществления изобретения, ретровирус и популяцию клеток объединяют в (ii) при температуре в диапазоне от 4°C до 42°C, от 4°C до 8°C, от 4°C до 10°C, от 8°C до 15°C, от 10°C до 20°C, от 18°C до 23°C, от 20°C до 30°C, от 25°C до 35°C, от 30°C до 40°C или от 37°C до 42°C.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, способы скрининга, описанные в настоящей заявке, дополнительно включают промывку популяции клеток между стадиями (ii) и (iii) промывочным раствором. В некоторых вариантах осуществления изобретения, промывочным раствором является любой жидкий раствор, который позволяет поддерживать здоровые клетки (например, раствор, имеющий нейтральный pH и ионную силу от низкого до умеренного уровня). В некоторых вариантах осуществления изобретения, промывка популяции клеток удаляет избыток ретровирус и/или оставшийся ретровирус из популяции клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения, популяцию клеток промывают с использованием среды для культивирования клеток (например, среды для культивирования клеток RPMI или DMEM). В некоторых вариантах осуществления изобретения, популяцию клеток промывают с использованием забуференного физиологического раствора. В некоторых вариантах осуществления изобретения, забуференный физиологический раствор представляет собой фосфатно-буферный физиологический раствор или HEPES-забуференный физиологический раствор. В некоторых вариантах осуществления изобретения, забуференный физиологический раствор содержит альбумин бычьей сыворотки и/или EDTA. В некоторых вариантах осуществления изобретения, популяцию клеток промывают при температуре в диапазоне от 4°C до 42°C, от 4°C до 8°C, от 4°C до 10°C, от 8°C до 15°C, от 10°C до 20°C, от 18°C до 23°C, от 20°C до 30°C, от 25°C до 35°C, от 30°C до 40°C или от 37°C до 42°C.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, популяцию клеток поддерживают в жидкой культуре перед объединением с ретровирусом. В некоторых вариантах осуществления изобретения, популяцию клеток поддерживают в жидкой культуре после объединения с ретровирусом. В некоторых вариантах осуществления изобретения, популяцию клеток поддерживают в жидкой культуре во время стадии объединения с ретровирусом. В некоторых вариантах осуществления изобретения, популяцию клеток прикрепляют к планшету для культивирования клеток или к чашке Петри. В некоторых вариантах осуществления изобретения, популяция клеток

поддерживается в монослое, в эмбриоидном тельце или в любом клеточном агрегате.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, множество ретровирусов включает по меньшей мере 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} или 10^{12} уникальных ретровирусов. В некоторых вариантах осуществления изобретения, во множестве ретровирусов может присутствовать по меньшей мере 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} или 10^{12} копий каждого уникального ретровируса.

Библиотека ретровирусов

В настоящей заявке описаны библиотеки ретровирусов, где библиотека содержит множество уникальных ретровирусов, где каждый уникальный ретровирус содержит вирусный белок оболочки, имеющий по меньшей мере одну мутацию, которая уменьшает его нативную функцию; невирусный мембраносвязанный белок, содержащий мембраносвязанный домен и внеклеточный нацеливающий домен, и нуклеиновую кислоту, кодирующую репортер, и где каждый уникальный ретровирус содержит другой и уникальный внеклеточный нацеливающий домен. В настоящей заявке также описаны библиотеки клеток, содержащих ретровирусы, где библиотека содержит множество уникальных клеток, при этом каждая уникальная клетка содержит уникальный ретровирус.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, библиотека содержит по меньшей мере 10^2 , по меньшей мере 10^3 , по меньшей мере 10^4 , по меньшей мере 10^5 , по меньшей мере 10^6 , по меньшей мере 10^7 , по меньшей мере 10^8 , по меньшей мере 10^9 или по меньшей мере 10^{10} уникальных ретровирусов. В некоторых вариантах осуществления изобретения, библиотека, содержащая уникальные ретровирусы, содержит внеклеточные нацеливающие домены, длина которых составляет по меньшей мере 5, по меньшей мере 10, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20 или по меньшей мере 50 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления изобретения, каждый отдельный и уникальный внеклеточный нацеливающий домен получают посредством сайт-направленного мутагенеза.

Библиотеки ретровирусов или клеток могут варьироваться по размеру от сотен до сотен тысяч, миллионов или более уникальных ретровирусов или уникальных клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения, библиотеки согласно изобретению содержат по меньшей мере 500000 уникальных ретровирусов или уникальных клеток. Библиотеки согласно изобретению включают ретровирусные библиотеки и клеточные библиотеки. Библиотека представляет собой синтетический набор (то есть, выделенный и полученный путем синтеза набор, не содержащий компонентов, которые по своей природе содержатся вместе в клетке, и очищенный перед помещением в библиотеку) членов, имеющих общий элемент и по меньшей мере один отдельный элемент. Библиотека включает тысячу или более (например, по меньшей мере: 1000; 2000; 3000; 4000; 5000; 10000; 50000; 100000; 500000; 600000; 700000; 800000; 900000; 1000000; 2000000; 3000000; 4000000 или более) членов. Верхний предел размера библиотеки определяется комбинаторикой доменов или модулей, обеспечивающих четкость или разнообразие среди членов. Например, верхний предел может составлять 4000000 членов. Таким образом, в

некоторых вариантах осуществления изобретения, библиотеки являются очень разнообразными и включают по меньшей мере 500000 различных элементов. Достаточно разнообразные библиотеки могут иметь вариабельность порядка 10^6 или более. В некоторых вариантах осуществления изобретения, библиотеку ретровирусов получают с использованием сайт-направленного мутагенеза нуклеиновой кислоты, описанной в настоящей заявке. В некоторых вариантах осуществления изобретения, сайт-направленный мутагенез включает использование праймеров и РНК-полимеразы с низкой достоверностью для обеспечения возможности рандомизированного мутагенеза обычной нуклеиновой кислоты, описанной в настоящей заявке.

Способы детектирования

В настоящей заявке описаны способы детектирования взаимодействия между ретровирусом и клеткой, включающие: (i) контактирование образца, содержащего ретровирус и клетку, с антителом, где ретровирус содержит вирусный белок оболочки, содержащий по меньшей мере одну мутацию, которая уменьшает его нативную функцию; невирусный мембраносвязанный белок, содержащий внеклеточный нацеливающий домен, и где антитело связывается с внеклеточным нацеливающим доменом ретровируса; (ii) необязательно, удаление несвязанного антитела из образца; и (iii) визуализацию образца для того, чтобы определить, связан ли комплекс антитело-ретровирус с клеткой.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, антитело дополнительно содержит по меньшей мере одну флуоресцентную метку. В некоторых вариантах осуществления изобретения, флуоресцентная метка представляет собой производное ксантина (например, флуоресцеин, родамин, орегонский зеленый, эозин и тexasский красный), производное цианина (например, цианин, индокарбоцианин, оксакарбоцианин, тиакрбоцианин и мероцианин), производное нафталина (например, производные дансила и продана), производное кумарина, производное оксадиазола (например, пиридилосазол, нитробензоксадиазол и бензоксадиазол), производное пирена (например, каскадный синий), производное оксазина (например, нильский красный, нильский синий, крезильный фиолетовый и оксазин 170), производное акридина (например, профлавин, акридиновый оранжевый и акридиновый желтый), производное арилметина (например, аурамин, кристаллический фиолетовый и малахитовый зеленый) или производное тетрапиррола (например, порфин, фталоцианин и билирубин). Флуоресцентная метка может быть нековалентно или ковалентно связана с антителом.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, изображение образца получают на стадии (iii) с помощью конфокальной или флуоресцентной микроскопии. В некоторых вариантах осуществления изобретения, способы детектирования могут быть осуществлены с использованием стандартной микроскопии (например, на конфокальных или флуоресцентных микроскопах). В некоторых вариантах осуществления изобретения, образец детектируют в ультра-мультиплексированном формате при визуализации с использованием стандартного конфокального или эпифлуоресцентного микроскопа.

ПРИМЕРЫ

Пример 1. Экспрессия SCFa и конструкций S4-3a PStalk и IgG4Hinge

Нужные лентивирусы были получены путем трансфекции полиэтилененимином (PEI) клеток HEK293T с использованием плазмид, кодирующих мутированный VSV-G (VSVd) или VSV-G дикого типа (VSVwt). Конструкции, содержащие фактор мышиных стволовых клеток дикого типа (mSCFa), обладающий эндогенной аффинностью к рецептору cKIT, и S4-3a, аффинно созревший вариант SCF, который, как было показано, демонстрирует более эффективное проникновение вируса (Ho CC et al., Cell 2017), были получены в соответствии с процедурой, описанной в Международной патентной публикации WO 2020/236263. Были созданы мономерные и предимерные варианты конструкций. В мономерных вариантах, mSCF был связан со стеблем PDGFR и трансмембранным белком (mSCFa-Pstalk (SEQ ID NO: 32), mS4-3a-Pstalk (SEQ ID NO: 28)). В предимерных вариантах, mSCF был связан с белком-линкером для шарнирного IgG4 (mSCFa-IgG4hinge (SEQ ID NO: 42), mS4-3a-IgG4hinge (SEQ ID NO: 36)). Конструкции подвергали воздействию VSVd или VSVwt вместе с флуоресцентно меченым антителом (НА-метка: AF647) и тестировали на экспрессию на поверхности линии упаковки вируса HEK. Как показано на фиг. 1 (mSCFa) и фиг. 2 (mS4-3a), было обнаружено, что все конструкции экспрессируются на клетках HEK.

Пример 2. Экспрессия неконцентрированного вируса в клетках MC9, экспрессирующих cKIT

Для проверки аффинности конструкций к cKIT, описанных в примере 1, конструкции тестировали на экспрессию в клетках MC9. Клетки MC9 не являются гемопоэтическими стволовыми клетками (HSC). Вместо этого, MC9 представляет собой иммортализованную клеточную линию на основе тучных клеток, которая является позитивной по cKIT. Клетки MC9 смешивали с помощью пипетки с неконцентрированным VSVwt (контроль) и вирусом VSVd в следующих соотношениях: 1:1 (фиг. 3), 2:1 (фиг. 4) и 4:1 (фиг. 5). Результаты показали, что белки SCF обеспечивают селективное проникновение вируса в клетки MC9. Для дальнейших экспериментов были отобраны наиболее эффективные конструкции, mSCFa-IgG4hinge-VSVd и mS4-3a-IgG4hinge-VSVd.

Пример 3. Экспрессия концентрированного вируса клетками MC9, экспрессирующими cKIT, и клетками VhCm, не экспрессирующими cKIT

Основные конструкции Примера 2 дополнительно тестировали на проникновение вируса в клеточные линии MC9 (экспрессирующие cKIT) и VhCm (не экспрессирующие cKIT). Каждую конструкцию тестировали на проникновение вируса в MC9 в объемах 5 мкл, 2,5 мкл, 1,25 мкл и 0,625 мкл в присутствии или в отсутствии полибрена, энхансера ретровирусной трансдукции. Затем оценивали два маркера: FITC (для определения наличия вируса) и BV421 (для определения присутствия cKIT). Нецелевую вирусную конструкцию (mFLT3L-IgG4Hinge-VSVd) и только вирус VSVd использовали в качестве контроля. Как показано на фиг. 8, вирус mFLT3LG плохо связывался с cKIT и плохо заражал клетки, позитивные по cKIT. Только один VSVd также плохо заражал cKIT⁺-клетки. Все три конструкции были также протестированы на клетках J76 (клетках VhCm), которые

являются негативными по cKIT. Как было показано на фиг. 9, даже при максимальной дозе вируса (5 мкл) и в присутствии полибрена, ни один из вирусов не инфицировал cKIT-клетки. Все эти результаты показали, что как mSCFa-IgG4hinge-VSVd (рис. 6), так и mS4-3a-IgG4hinge-VSVd (рис. 7) обеспечивают дозозависимое селективное проникновение вируса в cKIT⁺-клетки.

Пример 4. Первичная трансдукция HSC сконструированным вирусом, специфичным к SCF и FLT3

Сконструированные вирусные конструкции SCF и FLT3 тестировали для того, чтобы определить, являются ли они специфичными и эффективными с точки зрения доставки белка GFP в гемопоэтические стволовые клетки мышей в присутствии или в отсутствии экзогенных цитокинов (SCF и FLT3) (фиг. 10).

Цельные клетки костного мозга (WBM) выделяли у мышей B6 через 7 недель. Аликвоту выделенных клеток брали для дальнейшего тестирования специфичности в WBM. Затем проводили обогащение по cKIT и брали другую аликвоту для дальнейшего тестирования специфичности к популяции, обогащенной cKIT. Затем клетки были отсортированы по трем популяциям HSC в соответствии со следующими критериями: 1. Негативные по линии дифференцировки и позитивные по cKIT; 2. Негативные по линии дифференцировки, позитивные по Sca-1 и позитивные по cKIT (LSK); 3. Негативные по линии дифференцировки, позитивные по Sca-1, позитивные по cKIT и позитивные по FLT3. Затем клетки культивировали в средах с цитокинами или без них для соответствующих групп. Нормальная среда для всех первичных клеток HSC включала FLT3L (50 нг/мл), TPO (50 нг/мл) и SCF (50 нг/мл). Через 24 часа после сортировки, клетки (1 М/мл) инкубировали с концентрированным вирусом в соотношении 1:2. Через 24 часа, вирус удаляли, а клетки помещали в среду с полным содержанием цитокинов. Через 48 часов, клетки окрашивали и включали флуоресцентную панель для определения экспрессии GFP в определенных популяциях.

Эффективность и специфичность вариантов вируса SCF

Позитивный контроль приготавливали с использованием клеток MC9 с SCF-WT и SCF-мутантным вирусом в средах с SCF и без SCF (фиг. 11). Результаты показали, что концентрированный вирус обладал хорошей эффективностью трансдукции в контрольных клетках MC9, и что добавление экзогенного SCF в культуру во время трансдукции препятствовало, но не полностью ингибировало доставку вируса.

SCF-мутант тестировали против SCF-WT в LSK (Lin⁻, Sca-1⁺, cKIT⁺), в клетках, обогащенных cKIT, истощенных по линии дифференцировки и WBM (фиг. 12A-12B). Результаты показали, что GFP⁺-клетки преимущественно попадали во фракцию «незрелых» клеток, негативных по линии дифференцировки. Вирус SCF-WT обладал несколько более высокой эффективностью трансдукции, чем SCF-мутант. Однако, даже в очищенной популяции (LSK), эффективность была низкой.

Затем исследовали специфичность к SCF в клетках, обогащенных cKIT, в средах с SCF и без SCF (фиг. 13A-13B). Результаты показали, что жизнеспособность и размножение

не сильно изменялись при кратковременном истощении SCF в культуре. Кроме того, отказ от SCF, по-видимому, существенно не изменял процент GFP-позитивной фракции.

Специфичность вируса SCF определяли в популяциях клеток LSK (Lin-, Sca-1+, cKIT+), в клетках, истощенных по линии дифференцировки и в клеточных популяциях WBM (фиг. 14). Результаты показали, что GFP⁺-клетки преимущественно попадали в cKIT-позитивный сектор. Кроме того, было показано, что экспрессия cKIT может быть утрачена в культуре, поскольку все клетки в культуре LSK содержали cKIT только в одной точке, и, следовательно, небольшая доля GFP⁺-cKIT⁻-клеток могла быть вызвана специфической инфекцией. И наконец, относительная специфичность (# GFP⁺-клеток, которые являются позитивными по cKIT по сравнению с клетками, негативными по cKIT) масштабируется независимо от исходных клеток в культуре.

Эффективность и специфичность FLT3

Эффективность вируса FLT3 оценивали в отсортированных по HSC-FLT3, обогащенных по cKIT, истощенных по линии дифференцировки клетках и в клетках WBM (фиг. 15A-15C). Результаты показали, что вирус FLT3, по-видимому, обладал несколько лучшей эффективностью, чем варианты SCF. Даже в цельном костном мозге имелась небольшая, но наблюдаемая популяция, которая была эффективно трансдуцирована.

Затем исследовали специфичность FLT3 в клетках, обогащенных cKIT, в средах с FLT3 и без него (фиг. 16A-16B). Результаты показали, что жизнеспособность и размножение не были сильно изменены кратковременным истощением FLT3 в культуре. Кроме того, результаты показали, что все же может быть небольшая польза от отказа от FLT3 в культуре во время трансдукции.

Специфичность вируса FLT3 также оценивали в клеточных линиях, отсортированных по HSC-FLT3, и истощенных по линии дифференцировки и в клеточных линиях WBM (фиг. 17). Окрашивание антителом против FLT3 было не резким, возможно, из-за снижения уровня FLT3 в культуре. В результате, вместо него использовали cKIT. Результаты показали, что относительная специфичность (# GFP⁺-клеток, которые являются позитивными по cKIT по сравнению с клетками, негативными по cKIT) была довольно высокой в очищенных популяциях, но трудно определялась в WBM.

В целом, эти результаты показали, что сконструированные лентивирусы SCF и FLT3 демонстрируют низкую эффективность трансдукции, но довольно специфичную целевую интеграцию. Хотя эффективность была низкой, однако, по-видимому, имелась хорошая специфичность в тех случаях, когда клетки, которые были успешно трансдуцированы (как вирусами SCF, так и FLT3), являются cKIT-позитивными. Обычно, удаление одного цитокина из среды с исходными условиями культивирования, по-видимому, не препятствовало размножению и жизнеспособности клеток. В целом, WBM не показали хороших результатов в условиях культивирования, что позволяет предположить, что для трансдукции-трансплантации могут потребоваться другие условия.

Другие варианты осуществления изобретения

Все признаки, раскрытые в настоящем описании, могут быть объединены в любую

комбинацию. Каждый признак, раскрытый в настоящем описании, может быть заменен альтернативным признаком, предназначенным для той же, эквивалентной или сходной цели. Таким образом, если это не оговорено особо, то каждый раскрытый признак является лишь примером общей серии эквивалентных или сходных признаков.

Из приведенного выше описания, специалист в данной области может легко установить основные признаки настоящего изобретения и, не выходя за рамки существа и объема изобретения, может вносить различные изменения и модификации в изобретение, чтобы адаптировать его к различным типам применения и к различным условиям. Таким образом, другие варианты осуществления изобретения также входят в формулу изобретения.

Эквиваленты

Хотя в настоящей заявке описано и проиллюстрировано несколько вариантов осуществления изобретения, однако, специалистам в данной области известно множество других средств и/или структур для выполнения функции и/или получения результатов и/или одного или более из преимуществ, описанных в настоящей заявке, и считается, что каждый из таких вариантов и/или модификаций входит в объем описанных здесь вариантов осуществления изобретения. В общих чертах, специалистам в данной области очевидно, что все параметры, размеры, материалы и конфигурации, описанные в настоящей заявке, являются репрезентативными, и что фактические параметры, размеры, материалы и/или конфигурации будут зависеть от конкретного применения или областей применения, в которых применяются идеи изобретения. Специалистам в данной области известно, или они могут установить, путем проведения не более, чем обычных экспериментов, множество эквивалентов конкретным вариантам осуществления изобретения, описанным в настоящей заявке. Следовательно, следует отметить, что вышеупомянутые варианты осуществления изобретения представлены только в качестве примера, и что в рамках прилагаемой формулы изобретения и ее эквивалентов, варианты осуществления изобретения могут быть осуществлены иначе, чем это конкретно описано и заявлено. Варианты осуществления изобретения, описанные в настоящей заявке, относятся к каждому отдельному признаку, системе, изделию, материалу, набору и/или способу, описанному в настоящей заявке. Кроме того, любая комбинация из двух или более таких признаков, систем, изделий, материалов, наборов и/или способов, если такие признаки, системы, изделия, материалы, наборы и/или способы являются взаимосогласованными, включена в объем настоящего изобретения.

Все определения, как они указаны и используются в настоящей заявке, следует понимать как определения, которые не должны противоречить определениям, имеющимся в словарях, определениям, имеющимся в документах, включенных посредством ссылки, и/или обычным значениям определенных терминов.

Все ссылки, патенты и патентные заявки, раскрытые в настоящем изобретении, включены в настоящее описание посредством ссылки в отношении предмета, для которого цитируется каждая из них, и который, в некоторых случаях, может охватывать весь

документ.

Неопределенные артикли «а» и «an», относящиеся к существительным, используемым в описании и в формуле изобретения, если это не оговорено особо, следует понимать как «по меньшей мере один».

Союз «и/или», используемый здесь в описании и в формуле изобретения, следует понимать как «один или оба» элемента, соединенных определенным образом, то есть, элементы, которые присутствуют вместе в одних случаях и отдельно в других случаях. Множественные элементы, перед которыми стоит союз «и/или», должны толковаться так же, то есть, как «один или более» соединенных таким образом элементов. Необязательно могут присутствовать и другие элементы, отличающиеся от элементов, конкретно указанных в пункте «и/или», независимо от того, связаны они или не связаны с этими конкретно указанными элементами. Таким образом, в качестве неограничивающего примера, ссылка на «А и/или В», если она используется в сочетании с неинклюзивным текстом, таким как «содержащий», может относиться, в одном варианте осуществления изобретения, только к А (необязательно включая элементы, отличающиеся от В); в другом варианте осуществления изобретения, только к В (необязательно включая элементы, отличающиеся от А); а в еще одном варианте осуществления изобретения, и к А, и к В (необязательно включая другие элементы); и т.п.

Союз «или», используемый в описании и в формуле изобретения, следует понимать как имеющий такое же значение, как и союз «и/или», определенный выше. Например, при разделении элементов в списке, союз «или» или «и/или» должен интерпретироваться как включающий, то есть, включающий по меньшей мере один, но также включающий более одного числа или списка элементов и, необязательно, дополнительные элементы, не включенные в список. Термины, четко указывающие на обратное, такие как «только один из» или «исключительно один из», или, при использовании в формуле изобретения, «состоящий из», будут относиться к включению только одного элемента из числа или списка элементов. В общих чертах, союз «или», используемый в настоящей заявке, следует интерпретировать только как обозначающий взаимоисключающие понятия (то есть, «один или другой, но не оба»), если ему предшествуют термины эксклюзивности, такие как «либо», «один из», «только один из» или «исключительно один из». «Состоящий по существу из», если он используется в формуле изобретения, должен иметь свое обычное значение, используемое в области патентного права.

Используемое в описании и в формуле изобретения словосочетание «по меньшей мере один», относящееся к списку из одного или нескольких элементов, должно интерпретироваться как означающее по меньшей мере один элемент, выбранный из любого одного или нескольких элементов в списке элементов, но не обязательно включающее по меньшей мере один из всех элементов, конкретно перечисленных в списке элементов, и не исключающее любых комбинаций элементов в списке элементов. Это определение также допускает, что необязательно могут присутствовать элементы, отличающиеся от элементов, конкретно определенных в списке элементов, к которому относится

словосочетание «по меньшей мере один», независимо от того, связано оно или не связано с этими конкретно идентифицированными элементами. Таким образом, в качестве неограничивающего примера, «по меньшей мере один из А и В» (или, эквивалентно, «по меньшей мере один из А или В», или, эквивалентно, «по меньшей мере один из А и/или В») может относиться, в одном варианте осуществления изобретения, по меньшей мере к одному, необязательно включающему более, чем один А, в отсутствие В (и необязательно включающему элементы, отличающиеся от В); в другом варианте осуществления изобретения, по меньшей мере к одному, необязательно включающему более, чем один В, в отсутствие А (и необязательно включающему элементы кроме А); в еще одном варианте осуществления изобретения, по меньшей мере, к одному, необязательно включающему более, чем один А, и по меньшей мере одному, необязательно включающему более, чем один В (и необязательно включающему другие элементы); и т.п.

Следует также отметить, что, если это не оговорено особо, то в любых заявленных здесь способах, которые включают более, чем одну стадию или одно действие, порядок проведения таких стадий или действий указанного способа не обязательно ограничивается порядком, в котором указаны эти стадии или действия данного способа.

Последовательности

>Лидерная последовательность каппа, аминокислотная (SEQ ID NO: 1):
METDTLLLLWVLLLWVPGSTG

>Последовательность сигнального пептида B2M, аминокислотная (SEQ ID NO: 2):
MSRSVALAVLALLSLSGLEA

>Короткий стебель PDGFR, аминокислотная (SEQ ID NO: 3):
AVGQDTQEVIVVPHSLPFK

>Длинный стебель PDGFR, аминокислотная (SEQ ID NO: 4):
ASAKPTTPAPRPPTPAQTIASQPLSLRPEAARPAAGGAVHTRGLDFAK

>Короткий гибкий линкер, аминокислотная (SEQ ID NO: 5): GAPGAS

>Длинный гибкий линкер, аминокислотная (SEQ ID NO: 6):
GAPGSGGGGSGGGGSAS

>Короткий гибкий линкер, аминокислотная (SEQ ID NO: 7): GGGGS

>Шарнирный домен IgG4, аминокислотная (SEQ ID NO: 8):
ASESKYGPPCPPCPAVGQDTQEVIVVPHSLPFK

>Тетрамерная суперспирализованная спираль, аминокислотная (SEQ ID NO: 9):
ASGGGSGGELAAIKQELAAIKKELAAIKWELAAIKQQGAG

>Димерная суперспирализованная спираль, аминокислотная (SEQ ID NO: 10):
ASESKYGPPCPPCP

>Белок оболочки VSV-G дикого типа (с лидерной последовательностью), последовательность ДНК (SEQ ID NO: 11):

atgaagtgccctttgtacttagcctttttattcattgggggtgaattgcaagttcacatagttttccacacaaccaaaaaggaaactgg
aaaaatgttccttctaattaccattattgcccgtcaagctcagatttaaattggcataatgacttaataggcacagccatacaagtcaaaatgcc
aagagtcacaaggctattcaagcagacgggttgatgtgcatgcttccaaatgggtcactactgtgattccgctggatggaccgaagtata

taacacagtcctccgatccttctactccatctgtagaacaatgcaaggaaagcattgaacaaacgaaacaaggaactggctgaatccaggc
 ttccctcctcaaagttgtggatgcaactgtgacggatgccgaagcagtgattgtccaggtgactcctcacatgtgctggttgatgaataca
 caggagaatgggttgattcacagttcatcaacggaaaaatgcagcaattacatatgccccactgtccataactctacaacctggcattctgacta
 taaggtcaaaggctatgtgattctaacctcatttccatggacatcaccttctctcagaggacggagagctatcatccctgggaaaggaggg
 cacagggttcagaagtaactactttgcttataaaactggaggcaaggcctgcaaaaatgcaatactgcaagcattggggagtcagactccat
 caggtgtctggttcgagatggctgataaggatctcttctgctcagccagattccctgaatgccagaagggtcaagtatctctgctccatctca
 gacctcagtgatgtaagtctaattcaggacgttgagaggatcttggatttccctctgccaagaaacctggagcaaaatcagagcgggtct
 tccaatctcctcagtgatctcagctatcttctcctaaaaaccaggaaaccggctctgcttccaccataatcaatggtaccctaaaaactttga
 gaccagatacatcagagtcgatattgctgctccaatcctctcaagaatggtcggaatgatcagtggaactaccacagaaagggaaactgtgg
 gatgactgggcaccatataagacgtggaaattggacccaatggagttctgaggaccaggtcaggatataagtttctttatacatgattggac
 atggatgttggactccgatcttcatcttagctcaaaggctcaggtgttcgaacatcctcacattcaagacgctgcttcgcaacttctgatgatg
 agagttatttttgggtgatactgggctatccaaaaatccaatcgagcttgtagaaggttggttcagtagttgaaaagctctattgctctttttct
 ttatcataggggtaatcattggactattcttggttctccgagttggatccatcttgcattaaattaagcacaccaagaaaagacagatttataca
 gacatagagatgaaccgactggaaagtaa

>Белок оболочки VSV-G дикого типа (с лидерной последовательностью),
 аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 12):

MKCLLYLAFLFIGVNCKFTIVFPHNQKGNWKNVPSNYHYCPSSSDLNWHNDLIG
 TAIQVKMPKSHKAIQADGWMCHASKWVTTCDFRWYGPKYITQSIRSFTPSVEQCKESIE
 QTKQGTWLNPGFPPQSCGYATVTDAAEAVIVQVTPHHVLVDEYTGWVDSQFINGKCSN
 YICPTVHNSTTWHSYKVKGLCDSNLISMDITFFSEDGELSSLGKEGTGFRSNYFAYETG
 GKACKMQYCKHWGVRLPSGVWFEMADKDLFAAARFPECPEGSSISAPSQTSVDVSLIQ
 DVERILDYSLCQETWSKIRAGLPISPVDLSYLAPKNPGTGPAFTIINGTLKYFETRYIRVDI
 AAPILSRMVGMISSGTTTERELWDDWAPYEDVEIGPNGVLRRTSSGYKFPLYMIGHGMLDS
 DLHLSSKAQVFEHPHIQDAASQLPDDESLLFFGDTGLSKNPIELVEGWFSWKSSIASFFFII
 GLIIGLFLVLRVGIHLCKIKLHHTKKRQIYTDIEMNRLGK

>Белок оболочки VSV-G дикого типа (без лидерной последовательности),
 аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 13):

KFTIVFPHNQKGNWKNVPSNYHYCPSSSDLNWHNDLIGTAIQVKMPKSHKAIQA
 DGWMCHASKWVTTCDFRWYGPKYITQSIRSFTPSVEQCKESIEQTKQGTWLNPGFPPQS
 CGYATVTDAAEAVIVQVTPHHVLVDEYTGWVDSQFINGKCSNYICPTVHNSTTWHSY
 KVKGLCDSNLISMDITFFSEDGELSSLGKEGTGFRSNYFAYETGGKACKMQYCKHWGV
 RLPSGVWFEMADKDLFAAARFPECPEGSSISAPSQTSVDVSLIQDVERILDYSLCQETWS
 KIRAGLPISPVDLSYLAPKNPGTGPAFTIINGTLKYFETRYIRVDIAAPILSRMVGMISSGTT
 TERELWDDWAPYEDVEIGPNGVLRRTSSGYKFPLYMIGHGMLDSDLHLSSKAQVFEHPHI
 QDAASQLPDDESLLFFGDTGLSKNPIELVEGWFSWKSSIASFFFIIIGLIIGLFLVLRVGIHLCK
 IKLHHTKKRQIYTDIEMNRLGK

>Белок оболочки VSV-G (с лидерной последовательностью), последовательность
 ДНК (SEQ ID NO: 14):

atgaagtgccttttacttagcctttttattcattgggggtgaattgcaagttcacatagttttccacacaacccaaaaggaaactgg
 aaaaatgttcttctaattaccattattgcccgtcaagctcagatttaattggcataatgacttaataggcacagccttacaagtcaaaatgcc

cagagtcacaaggctattcaagcagacgggttgatgtgcatgcttccaaatgggtcactacttgtgatttccgctgggatggaccgaagtata
 taacacagtcctccgatccttcactccatctgtagaacaatgcaaggaaagcattgaacaaacgaaacaaggaacttggctgaatccagggc
 ttccctcctcaaaagtgtggatgcaactgtgacggatgccgaagcagtgattgtccaggtgactcctcaccatgtgctgggtgatgaataca
 caggagaatgggttgattcacagttcatcaacggaaaatgcagcaattacatatgccccactgtccataactctacaacctggcattctgacta
 taaggtaaaaggctatgtgattctaacctcatttccatggacatcaccttctctcagaggacggagagctatcatcctctgggaaaggaggg
 cacaggggtcagaagtaactactttgcttatgaaactggaggcaaggcctgcaaaatgcaatactgcaagcattggggagtcagactccat
 caggtgtctggttcagatggctgataaggatctcttctgctgcagccagattcctgaatgccagaagggtcaagatctctgctccatctca
 gacctcagtggtatgtaagtctaatcaggacgttgagaggatcttgattatcctctgccaagaaacctggagcaaaatcagagcgggtct
 tccaatctctccagtggtatcagctatcttctcctaaaaaccaggaaccggctctgcttccaccataatcaatggtaccctaaaatacttga
 gaccagatacatcagagtcgatattgctgctccaatcctctcaagaatggtcggaatgatcagtggaactaccacagaagccgaactgtggg
 atgactgggaccatataagacgtgaaatggaccatggagttctgaggaccagttcaggatataagtttctttatacatgattggaca
 tggatgttggactccgatcttcatcttagctcaaaggctcaggtgttcgaacatcctcacattcaagacgctgcttcgcaactctctgatgatga
 gagttatttttggatgactgggctatccaaaaatccaatcgagctttagaagggtggttcagtagtggaaaagctctattgcctctttttcttt
 atcatagggttaatcattggactattcttggttctccgagttggatccatcttgcattaataaagcacaccaagaaaagacagattatacag
 acatagagatgaaccgacttggaagtaa

>Белок оболочки I41L/K47Q/R354A VSV-G (с лидерной последовательностью),
 аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 15):

MKCLLYLAFLFIGVNCKFTIVFPHNQKGNWKNVPSNYHYCPSSSDLNWHNDLIG
 TALQVKMPQSHKAIQADGWMCHASKWVTTCDFRWYGPKYITQSIRSFTPSVEQCKESIE
 QTKQGTWLNPGFPPQSCGYATVTDAEAVIVQVTPHHVLVDEYTGEWVDSQFINGKCSN
 YICPTVHNSTTWHSYKVKGLCDSNLISMDITFFSEDGELSSLGKEGTGFRSNYFAYETG
 GKACKMQYCKHWGVRLPSGVWFEMADKDLFAAARFPECPEGSSISAPSQTSVDVSLIQ
 DVERILDYSLCQETWSKIRAGLPISPVDLSYLAPKNPGTGPAFTIINGTLKYFETRYIRVDI
 AAPILSRMVGMISSGTTTEAELWDDWAPYEDVEIGPNGVLRRTSSGYKFPLYMIGHGMLDS
 DLHLSSKAQVFEHPHIQDAASQLPDDESFFGDTGLSKNPIELVEGWFSWSSIASFFFII
 GLIIGLFLVLRVGIHLCKIKLHHTKKRQIYTDIEMNRLGK

>Белок оболочки I41L/K47Q/R354A VSV-G (без лидерной последовательности),
 аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 16):

KFTIVFPHNQKGNWKNVPSNYHYCPSSSDLNWHNDLIGTALQVKMPQSHKAIQ
 ADGWMCHASKWVTTCDFRWYGPKYITQSIRSFTPSVEQCKESIEQTKQGTWLNPGFPPQ
 SCGYATVTDAEAVIVQVTPHHVLVDEYTGEWVDSQFINGKCSNYICPTVHNSTTWHS
 YKVKGLCDSNLISMDITFFSEDGELSSLGKEGTGFRSNYFAYETGGKACKMQYCKHWG
 VRLPSGVWFEMADKDLFAAARFPECPEGSSISAPSQTSVDVSLIQDVERILDYSLCQETW
 SKIRAGLPISPVDLSYLAPKNPGTGPAFTIINGTLKYFETRYIRVDIAAPILSRMVGMISSG
 TTEAELWDDWAPYEDVEIGPNGVLRRTSSGYKFPLYMIGHGMLDSDLHLSSKAQVFEHP
 HIQDAASQLPDDESFFGDTGLSKNPIELVEGWFSWSSIASFFFIIIGLIIGLFLVLRVGIH
 LCKIKLHHTKKRQIYTDIEMNRLGK

>Белок оболочки K47Q/R354A VSV-G (без лидерной последовательности),
 аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 17):

KFTIVFPHNQKGNWKNVPSNYHYCPSSSDLNWHNDLIGTAIQVKMPQSHKAIQA

DGWMCHASKWVTTCDFRWYGPKYITQSIRSFTPSVEQCKESIEQTKQGTWLNPGFPPQS
 CGYATVTDAAEAVIVQVTPHHVLVDEYTGWVDSQFINGKCSNYICPTVHNSTTWHSY
 KVKGLCDSNLISMDITFFSEDGELSSLGKEGTGFRSNYFAYETGGKACKMQYCKHWGV
 RLPSGVWFEMADKDLFAAARFPECPEGSSISAPSQTSVDVSLIQDVERILDYSLCQETWS
 KIRAGLPISPVDLSYLAPKNPGTGPAFTIINGTLKYFETRYIRVDIAAPILSRMVGMISSGTT
 TEAELWDDWAPYEDVEIGPNGVLRRTSSGYKFPLYMIGHGMLDSLHLSSKAQVFEHPHI
 QDAASQLPDDESLFFGDTGLSKNPIELVEGWFWSSWKSSIASFFFIIIGLIIGLFLVLRVGIHLC
 IKLKHTKKRQIYTDIEMNRLGK

>Репрезентативный белок оболочки вируса кори дикого типа (с лидерной последовательностью), последовательность ДНК (SEQ ID NO:18):

ATGGGCAGCCGGATCGTGATCAACCGGGAGCACCTGATGATCGACCGGCCCT
 ACGTGCTGCTGGCCGTGCTGTTTCGTGATGTTCTGAGCCTGATCGGCTTGCTAGCCA
 TTGCTGGAATCCGGCTGCACAGAGCCGCCATCTACACCGCCGAGATCCACAAGAGC
 CTGAGCACCAACCTGGACGTGACCAACAGCATCGAGCATCAGGTCAAGGACGTGCT
 GACCCCTGTTAAGATCATCGGCGACGAAGTGGGCCTGCGGACCCCCAGAGAT
 TCACCGACCTGGTCAAGTTCATCAGCGACAAGATCAAGTTCCTGAACCCCGACCGG
 GAGTACGACTTCCGGGACCTGACCTGGTGCATCAACCCCCCGAGCGGATCAAGCT
 GGACTACGACCAGTACTGCGCCGATGTGGCCGCCGAGGAACTGATGAATGCATTGG
 TGAACTCAACTCTACTGGAGACCAGAACAACCAATCAGTTCCTAGCTGTCTCAAAGG
 GAAACTGCTCAGGGCCCACTACAATCAGAGGTCAATTCTCAAACATGTCGCTGTCCC
 TGTTAGACTTGTATTTAGGTTCGAGGTTACAATGTGTCATCTATAGTCACTATGACATC
 CCAGGGAATGTATGGGGGAACTTACCTAGTGGAAAAGCCTAATCTGAGCAGCAAAA
 GGTCAGAGTTGTCACAACCTGAGCATGTACCGAGTGTTTGAAGTAGGTGTTATCAGAA
 ATCCGGGTTTGGGGGCTCCGGTGTTCATATGACAAACTATCTTGAGCAACCAGTCA
 GTAATGATCTCAGCAACTGTATGGTGGCTTTGGGGGAGCTCAAACCTCGCAGCCCTTT
 GTCACGGGGAAGATTCTATCACAATTCCTATCAGGGATCAGGGAAAGGTGTCAGC
 TTCCAGCTCGTCAAGCTAGGTGTCTGGAAATCCCCAACCGACATGCAATCCTGGGTC
 CCCTTATCAACGGATGATCCAGTGATAGACAGGCTTTACCTCTCATCTCACAGAGGT
 GTTATCGCTGACAACCAAGCAAAATGGGCTGTCCCGACAACACGAACAGATGACAA
 GTTGCGAATGGAGACATGCTTCCAACAGGCGTGTAAGGGTAAAATCCAAGCACTCT
 GCGAGAATCCCGAGTGGGCACCATTGAAGGATAACAGGATTTCCTTCATACGGGGTC
 TTGTCTGTTGATCTGAGTCTGACAGTTGAGCTTAAAATCAAATGCTTCGGGATTC
 GGGCCATTGATCACACACGGTTCAGGGATGGACCTATACAAATCCAACCACAACAA
 TGTGTATTGGCTGACTATCCCGCCAATGAAGAACCTAGCCTTAGGTGTAATCAACAC
 ATTGGAGTGGATAACCGAGATTCAAGGTTAGTCCCtatCTCTTCaCaGTCCCAATTAAGG
 AAGCAGGCGGAGACTGCCATGCCCCAACATACTACCTGCGGAGGTGGATGGTGAT
 GTCAAACCTCAGTTCGAATCTGGTGATTCTACCTGGTCAAGATCTCCAATATGTTTTGG
 CAACCTACGATACTTCCcgGGTTGAACATGCTGTGGTTTATTACGTTTACAGCCCAAG
 CCGCTCATTTTCTTACTTTTATCCTTTTAGGTTGCCTATAAAGGGGGTCCCCATCGAA
 TTACAAGTGGAATGCTTCACATGGGACCAAAAACCTCTGGTGCCGTCACCTTCTGTGTG

CTTGCGGACTCAGAATCTGGTGGACATATCACTCACTCTGGGATGGTGGGCATGGGA
 GTCAGCTGCACAGTCACCCGGGAAGATGGAACCAATGACTACAAAGACGATGACGA
 CAAGTGA

>Репрезентативный белок оболочки вируса кори дикого типа (с лидерной последовательностью), аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 19):

MGSRIVINREHLMIDRPYVLLAVLFVMFLSLIGLLAIAGIRLHRAAIYTAIEIHKSL
 TNLDVTNSIEHQVKDVLTPLFKIIGDEVGLRTPQRFTDLVKFISDKIKFLNPDREYDFRDL
 TWCINPPERIKLDYDQYCADVAAEELMNALVNSTLLETRTTNQFLAVSKGNCSGPTTIR
 GQFSNMSLSLLDLYLGRGYNVSSIVTMTSQGMYGGTYLVEKPNLSSKRSELSQLSMYR
 VFEVGVIRNPGLGAPVFHMTNYLEQPVSNLNSCMVALGELKLAALCHGEDSITIPYQG
 SGKGVSFQLVKLGVWKSPTDMQSWVPLSTDDPVIDRLYLSSHRGVIADNQAQWAVPTT
 RTDDKLRMETCFQQACKGKIQALCENPEWAPLKDNRIPSYGVLSVDLSLTVELKIKIASG
 FGPLITHGSGMDLYKSNHNNVYWLTIIPMKNLALGVINTLEWIPRFKVSPLYFTVPIKEA
 GGDCHAPTYLPAEVDGDVKLSSNLVILPGQDLQYVLATYDTSRVEHAVVYVYVYSPSRS
 FSYFYFRLPIKGVPIELQVECFTWDQKLWCRHFCVLADSESGGHITHSGMVMGMVSVCT
 VTREDGTNDYKDDDDK

>Репрезентативный мутантный белок оболочки вируса кори (с лидерной последовательностью), последовательность ДНК (SEQ ID NO: 20):

ATGGGCAGCCGGATCGTGATCAACCGGGAGCACCTGATGATCGACCGGCCCT
 ACGTGCTGCTGGCCGTGCTGTTCGTGATGTTCTGAGCCTGATCGGCTTGCTAGCCA
 TTGCTGGAATCCGGCTGCACAGAGCCGCCATCTACACCGCCGAGATCCACAAGAGC
 CTGAGCACCAACCTGGACGTGACCAACAGCATCGAGCATCAGGTCAAGGACGTGCT
 GACCCCTGTTTAAGATCATCGGCGACGAAGTGGGCCTGCGGACCCCCAGAGAT
 TCACCGACCTGGTCAAGTTCATCAGCGACAAGATCAAGTTCCTGAACCCCGACCGG
 GAGTACGACTTCCGGGACCTGACCTGGTGCATCAACCCCCCGAGCGGATCAAGCT
 GGACTACGACCAGTACTGCGCCGATGTGGCCGCCGAGGAACTGATGAATGCATTGG
 TGAACTCAACTCTACTGGAGACCAGAACAACCAATCAGTTCCTAGCTGTCTCAAAGG
 GAAACTGCTCAGGGCCCACTACAATCAGAGGTCAATTCTCAAACATGTCGCTGTCCC
 TGTTAGACTTGTATTTAGGTTCGAGGTTACAATGTGTCATCTATAGTCACTATGACATC
 CCAGGGAATGTATGGGGGAACTTACCTAGTGGAAAAGCCTAATCTGAGCAGCAAAA
 GGTCAGAGTTGTCACAACTGAGCATGTACCGAGTGTTTGAAGTAGGTGTTATCAGAA
 ATCCGGGTTTGGGGGCTCCGGTGTTCATATGACAACTATCTTGAGCAACCAGTCA
 GTAATGATCTCAGCAACTGTATGGTGGCTTTGGGGGAGCTCAAACCTCGCAGCCCTTT
 GTCACGGGGAAGATTCTATCACAATTCCTATCAGGGATCAGGGAAAGGTGTCAGC
 TTCCAGCTCGTCAAGCTAGGTGTCTGGAAATCCCCAACCGACATGCAATCCTGGGTC
 CCCTTATCAACGGATGATCCAGTGATAGACAGGCTTTACCTCTCATCTCACAGAGGT
 GTTATCGCTGACAACCAAGCAAAAATGGGCTGTCCCGACAACACGAACAGATGACAA
 GTTGCGAATGGAGACATGCTTCCAACAGGCGTGTAAGGGTAAAATCCAAGCACTCT
 GCGAGAATCCCGAGTGGGCACCATTGAAGGATAACAGGATTTCCTTCATACGGGGTC
 TTGTCTGTTGATCTGAGTCTGACAGTTGAGCTTAAAATCAAATGCTTCGGGATTC

GGGCCATTGATCACACACGGTTCAGGGATGGACCTATACAAATCCAACCACAACAA
 TGTGTATTGGCTGACTATCCCGCCAATGAAGAACCTAGCCTTAGGTGTAATCAACAC
 ATTGGAGTGGATACCGAGATTCAAGGTTAGTCCCGCGCTCTTCAATGTCCAATTA
 GGAAGCAGGCGGAGACTGCCATGCCCAACATACCTACCTGCGGAGGTGGATGGTG
 ATGTCAAACCTCAGTTCCAATCTGGTGATTCTACCTGGTCAAGATCTCCAATATGTTTT
 GGCAACCTACGATACTTCCGCGGTTGAACATGCTGTGGTTTATTACGTTTACAGCCC
 AAGCCGCTCATTTTCTTACTTTTATCCTTTTAGGTTGCCTATAAAGGGGGTCCCCATC
 GAATTACAAGTGGAAATGCTTCACATGGGACCAAAAACTCTGGTGCCGTCACTTCTGT
 GTGCTTGCGGACTCAGAATCTGGTGGACATATCACTCACTCTGGGATGGTGGGCATG
 GGAGTCAGCTGCACAGTCACCCGGGAAGATGGAACCAATGACTACAAAGACGATGA
 CGACAAGTGA

>Репрезентативный мутантный белок оболочки вируса кори (с лидерной последовательностью), аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 21):

MGSRIVINREHLMIDRPYVLLAVLFVMFLSLIGLLAIAGIRLHRAAIYTAIEIHKSL
 TNLDVTNSIEHQVKDVL TPLFKIIGDEVGLRTPQRFTDLVKFISDKIKFLNPDREYDFRDL
 TWCINPPERIKLDYDQYCADVAAEELMNALVNSTLLETRTTNQLAVSKGNCSGPTTIR
 GQFSNMSLSLLDLYLGRGYNVSSIVTMTSQGMYGGTYLVEKPNLSSKRSELSQLSMYR
 VFEVGVIRNPGLGAPVFHMTNYLEQPVSNDSLNCMVALGELKLAALCHGEDSITIPYQG
 SGKGVSFQLVKLGVWKSPTDMQSWVPLSTDDPVIDRLYLSSHRGVIADNQAQWAVPTT
 RTDDKLRMETCFQQACKGKIQUALCENPEWAPLKDNRIPSYGVLSVDLSLTVELKIKIASG
 FGPLITHGSGMDLYKSNHNNVYWLTIIPMKNLALGVINTLEWIPRFKVPALFNVPIKEA
 GGDCHAPTYLPAEVDGDVKLSSNLVILPGQDLQYVLATYDTSAVEHAVVYVYVYSPSRS
 FSYFYFRLPIKGVPIELQVECFTWDQKLWCRHFCVLADSESGGHITHSGMVMGMVSVCT
 VTREDGTNDYKDDDDK

>Репрезентативный мутантный белок оболочки вируса Nipah, последовательность ДНК (SEQ ID NO: 22):

ATGAAGAAGATCAACGAGGGCCTGCTGGACAGCAAGATCCTGAGCGCCTTCA
 ACACCGTGATTGCCCTGCTGGGCTCTATCGTGATCATCGTGATGAACATCATGATCA
 TCCAGAACTACACCCGGTCCACCGACAACCAGGCCGTGATTAAGGATGCTCTGCAG
 GGAATCCAGCAGCAGATCAAAGGCCTGGCCGACAAGATCGGCACAGAGATCGGCCC
 TAAGGTGTCCCTGATCGACACCAGCAGCACCATACAATCCCGCCAATATCGGACT
 GCTGGGAAGCAAGATCAGCCAGAGCACCGCCAGCATCAACGAGAACGTGAACGAG
 AAGTGCAAGTTCACCCTGCCTCCACTGAAGATCCACGAGTGCAACATCAGCTGCCCC
 AATCCTCTGCCATTCAGAGAGTACAGACCCAGACAGAGGGCGTGTCCAATCTCGT
 GGGCCTGCCTAACAACATCTGCCTGCAGAAAACCAGCAACCAGATCCTGAAGCCTA
 AGCTGATCTCCTACACACTGCCCGTCGTGGGCCAGAGCGGCACCTGTATTACAGATC
 CTCTGCTGGCCATGGACGAGGGCTACTTTGCCTACAGCCACCTGGAAAGAATCGGC
 AGCTGTAGCCGGGGAGTGTCCAAGCAGAGAATCATCGGCGTGGGCGAAGTGCTGGA
 TAGAGGCGACGAAGTGCCAGCCTGTTTCATGACCAATGTGTGGACCCCTCCTAATCC
 TAACACCGTGTACCACTGCAGCGCCGTGTACAACAACGAGTTCTACTACGTGCTGTG

CGCCGTGTCCACAGTGGGCGACCCTATCCTGAACAGCACCTATTGGAGCGGCAGCCT
 GATGATGACCAGACTGGCCGTGAAGCCCAAGAGCAATGGCGGCGGATAACAACCAGC
 ATCAGCTGGCCCTGCGGTCCATCGAGAAGGGCAGATACGACAAAGTGATGCCTTAC
 GGCCCCAGCGGCATCAAGCAAGGCGATACCCTGTACTTTCCCGCCGTGGGATTTCTC
 GTGCGGACCGAGTTCAAGTACAACGACAGCAACTGCCCCATCACCAAGTGCCAGTA
 CAGCAAGCCCCGAGAACTGCAGACTGAGCATGGGCATCAGACCCAACAGCCACTACA
 TCCTGAGAAGCGGCCTGCTGAAGTACAACCTGAGCGACGGCGAGAACCCCAAGGTG
 GTGTTTCATCGAGATCAGCGACCAGCGGCTGTCTATCGGCAGCCCCTCCAAGATCTAC
 GACTCTCTGGGCCAGCCAGTGTTCTACCAGGCCAGCTTTAGCTGGGACACCATGATC
 AAGTTCGGCGACGTGCTGACCGTGAATCCCCTGGTGGTCAACTGGCGGAACAATAC
 CGTGATCAGCCGGCCTGGCCAGTCTCAGTGCCCCAGATTCAATACCTGTCCTGCCAT
 TTGCGCCGAAGGCGTGTACAATGACGCCTTCTGATCGATCGGATCAACTGGATCTC
 TGCCGGCGTGTTCCTGGACTCTAATGCCACAGCCGCCAATCCTGTGTTACCCGTGTT
 CAAGGACAATGAGATCCTGTATCGGGCCCAGCTGGCCTCCGAGGACACAAATGCCC
 AGAAAACAATCACCAACTGCTTTCTGCTCAAGAACAAGATCTGGTGCATCAGCCTG
 GTGGAATCTACGACACCGGCGACAACGTGATCAGGCCCAAGCTGTTCCGCCGTGAA
 GATCCCTGAGCAGTGTACAGGCGGCGGAGGATCTGGCGGAGGTGGAAGCGGAGGC
 GGTGGATCTGCTAGCGATTACAAGGATGACGACGATAAGTGA

>Репрезентативный мутантный белок оболочки вируса Nipah, аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 23):

MKKINEGLLDKILSAFNTVIALLGSIIVMNMIIQNYTRSTDNQAIVIKDALQGI
 QQQIKGLADKIGTEIGPKVSLIDTSSTITIPANIGLLGSKISQSTASINENVNEKCKFTLPL
 KIHECNISCPNPLPFREYRPQTEGVSNLVGLPNNICLQKTSNQILKPKLISYTLPPVVGQSGT
 CITDPLLAMDEGYFAYSHLERIGSCSRGVSKQRIIGVGEVLDRGDEVPSLFMTNVWTPPN
 PNTVYHCSAVYNNEFYVLCVSTVGDPILNSTYWSGSLMMTRLAVKPKSNGGGYNQ
 HQLALRSIEKGRYDKVMPYGPSGIKQGDLYFPAVGFLVRTEFKYNDNSNCPITKCQYSK
 PENCRLSMGIRPNSHYILRSGLLKYNLSDGENPKVVFIEISDQRLSIGSPSKIYDSLQGPVF
 YQASFSWDTMIKFGDVLTVNPLVVNWRNNTVISRPGQSQCPRFNTCPAICAEGVYNDAF
 LIDRINWISAGVFLDSNATAANPVFTVFKDNEILYRAQLASEDTNAQKTITNCFLLKNKI
 WCISLVEIYDTGDNVIRPKLFAVKIPEQCTGGGGSGGGGSGGGGSASDYKDDDDK

>Гликопротеин вируса Socal, аминокислотная последовательность: (SEQ ID NO: 24):

MNLLLLTFIVLPLCSHAKFSIVFPQSQKGNWKNVPSSYHYCPSSSDQNWHNDLLGITMK
 VKMPKTHKAIQADGWMCHAAKWITTCDFRWYGPKYITHSIHSIQPTSEQCKESIKQTKQ
 GTWMSPGFPPQNCGYATVTDSVAVVVQATPHHVLVDEYTG EWIDSQFPNGKCETEECE
 TVHNSTVWYSYKVTGLCDATLVDTEITFFSEDGKKESIGKPNTGYRSNYFAYEKGDK
 VCKMNYCKHAGVRLPSGVWFEFVDQDVYAAAKLPECPVGATISAPTQTSVDVSLILDV
 ERILDYSLCQETWSKIRSKQPVSPVDLSYLAPKNPGTGPAFTIINGTLKYFETRYIRIDIDN
 PIISKMVGKISGSQTERELWTEWFPYEGVEIGPNGILKTPTGYKFLPLMIGHGMLDSDLH
 KTSQAEVFEHPLAEAPKQLPEEETLFFGDTGISKNPVELIEGWFSWKSTVVVTTFFAIGV

FILLYVVARIVIAVRYRYQGSNNKRIYNDIEMSRFRK*

>Гликопротеин вируса Сосал, последовательность ДНК: (SEQ ID NO: 25):

ATGAACTTTCTGCTGCTCACGTTTATCGTACTCCCCTTGTGCTCTCATGCGAA
 ATTTTCAATAGTCTTTCTCAGTCCCAGAAAGGGAATTGGAAAAATGTTCCCTCCAG
 TTACCACTATTGTCCCTCCTCCTCTGACCAAAACTGGCACAATGACTTGCTCGGGATT
 ACAATGAAAGTAAAGATGCCGAAAACCCATAAAGCCATACAGGCGGATGGGTGGA
 TGTGTCACGCTGCGAAGTGGATCACTACATGCGATTTCCGGTGGTATGGCCCTAAGT
 ACATTACACACTCTATCCATAGCATAACAGCCGACATCAGAGCAATGCAAAGAGAGT
 ATTAAACAGACCAAACAAGGGACATGGATGAGCCCTGGCTTTCCACCTCAGAATTG
 TGGGTACGCGACCGTCACGGATAGTGTGCTGTTGTGGTGCAGGCCACGCCACATCA
 CGTACTCGTAGATGAATATACTGGTGAATGGATCGACTCCCAATTCCTCGAATGGGAA
 ATGTGAGACGGAAGAGTGCGAAACAGTGCATAACTCAACCGTTTGGTATTCCGATT
 ACAAGGTTACTGGTCTTTGCGACGCCACCCTCGTGGATACCGAGATCACGTTTTTTA
 GTGAGGATGGCAAGAAAGAGTCAATAGGCAAACCTAATACTGGCTACCGGAGTAAC
 TATTTTCGTTACGAGAAGGGTGACAAGGTATGTAATAATGAACTATTGCAAGCATGC
 GGGAGTGCGACTCCCCAGTGGGGTATGGTTCGAATTTGTTGACCAAGACGTATACGC
 CGCTGCGAAGTTGCCAGAATGCCCGTAGGCGCGACCATTTACGCACCTACCCAAA
 CGTCCGTTGACGTCTCCTTGATACTGGATGTAGAGCGAATCCTGGACTACAGTCTCT
 GCCAGGAAACGTGGTCAAAAATAAGAAGTAAGCAGCCAGTTTCACCCGTGGATCTG
 TCTTATCTGGCGCCAAAAAACCCGGGCACGGGCCCTGCTTTTACCATAATTAACGGA
 ACGCTTAAATACTTCGAAACCCGCTACATTAGAATCGATATAGACAATCCTATTATC
 AGCAAGATGGTAGGGAAGATATCTGGGTCTCAAACGGAGCGAGAATTGTGGACGGA
 GTGGTTCCTTATGAGGGAGTGGAAATTGGGCCAACGGGATCCTCAAGACCCCAA
 CGGGTTACAAGTTCCTCTGTTTATGATCGGCCATGGCATGTTGGACAGTGACTIONTGC
 AAAAAACATCTCAGGCAGAGGTTTTTCGAACATCCACATTTGGCGGAGGCGCCCAA
 CAACTTCCAGAAGAAGAACTCTCTTTTGGAGATACAGGCATTTCAAAAAATCCT
 GTAGAACTGATAGAAGGGTGGTTCTCTTCTGAAATCAACGGTTGTCACGTTTTTC
 TTTGCAATAGGCGTATTTATACTCCTGTACGTCGTAGCCCGCATTGTGATCGCAGTA
 CGATACAGATACCAGGGCAGTAACAATAAACGCATATATAATGACATCGAAATGTC
 AAGGTTCCGAAAGtga

>Инактивированная по Сосал (мутации для удаления нативного тропизма выделены жирным шрифтом в последовательности белка; этими мутациями являются K64Q и R371A, начиная от старт-кодона), аминокислотная последовательность: (SEQ ID NO: 26):

MN**F**LL**L**TFIVLPLCSHAKFSIVFPQSQKGNWKNVPSSYH**Y**CPSSSDQNWHNDLLGITMK
 VKMPQ
 THKAIQADGWMCHAAKWITTCDFRWYGPKYITHSIHSIQPTSEQCKESIKQTKQGTWMS
 PGFPPQ**N**CGYATVTDSVAVVVQATPHHVLVDEY**T**GEWIDSQFPNGKCETEECETVHNS
 TVWYSDYKVTGLCDATLVDTEITFFSEDGK**K**ESIGKPNTGYRSNYFAYEKGDKVCKMN
 YCKHAGVRLPSGVWFEFVDQDVYAAAKLPECPVGATISAPTQTSVDVSLILDVERILDY
 SLCQETWSKIRSKQPVSPVDLSYLA**P**KNPGTGPAFTIINGTLKYFETRYIRIDIDNPIISKM

VGKISGSQTEAELWTEWFPYEGVEIGPNGILKTPTGYKFPLFMIGHGMLDSDLHKTSQAE
 VFEHPLAEAPKQLPEEETLFFGDTGISKNPVELIEGWFSWKSTVVTFFFAIGVFILLYV
 VARIVIAVRYRYQGSNNKRIYNDIEMSRFRK

>Инактивированная по Cocal (мутации для устранения нативного тропизма),
 последовательность ДНК: (SEQ ID NO: 27):
 ATGAACTTTCTGCTGCTCACGTTTATCGTACTCCCGTTGTGCTCTCATGCGAAATTTT
 CAATAGTCTTTTCTCAGTCCCAGAAAGGGAATTGGAAAAATGTTCCCTCCAGTTACC
 ACTATTGTCCCTCCTCCTCTGACCAAACTGGCACAATGACTTGCTCGGGATTACAA
 TGAAAGTAAAGATGCCGcagACCCATAAAGCCATACAGGCGGATGGGTGGATGTGTC
 ACGCTGCGAAGTGGATCACTACATGCGATTTCCGGTGGTATGGCCCTAAGTACATTA
 CACACTCTATCCATAGCATAACAGCCGACATCAGAGCAATGCAAAGAGAGTATTTAAA
 CAGACCAAACAAGGGACATGGATGAGCCCTGGCTTTCCACCTCAGAATTGTGGGTA
 CGCGACCGTCACGGATAGTGTGCTGTTGTGGTGCAGGCCACGCCACATCACGTACT
 CGTAGATGAATATACTGGTGAATGGATCGACTCCCAATTCCCGAATGGGAAATGTG
 AGACGGAAGAGTGCGAAACAGTGCATAACTCAACCGTTTGGTATTCCGATTACAAG
 GTTACTGGTCTTTGCGACGCCACCCTCGTGGATACCGAGATCACGTTTTTTAGTGAG
 GATGGCAAGAAAGAGTCAATAGGCAAACCTAATACTGGCTACCGGAGTAACTATTT
 CGCTTACGAGAAGGGTGACAAGGTATGTAAAATGAACTATTGCAAGCATGCGGGAG
 TGCGACTCCCCAGTGGGGTATGGTTCGAATTTGTTGACCAAGACGTATACGCCGCTG
 CGAAGTTGCCAGAATGCCCCGTAGGCGCGACCATTTACGCACCTACCCAAACGTCC
 GTTGACGTCTCCTTGATACTGGATGTAGAGCGAATCCTGGACTACAGTCTCTGCCAG
 GAAACGTGGTCAAAAATAAGAAGTAAGCAGCCAGTTTCACCCGTGGATCTGTCTTA
 TCTGGCGCCAAAAAACC CGGGCACGGGCCCTGCTTTTACCATAATTAACGGAACGCT
 TAAATACTTCGAAACCCGCTACATTAGAATCGATATAGACAATCCTATTATCAGCAA
 GATGGTAGGGAAGATATCTGGGTCTCAAACGGAGgccGAATTGTGGACGGAGTGGTT
 CCCTTATGAGGGAGTGGAATTGGGCCAACGGGATCCTCAAGACCCCAACGGGTT
 ACAAGTTCCTCTGTTTATGATCGGCCATGGCATGTTGGACAGTGA CTTGACAAAA
 CATCTCAGGCAGAGGTTTTCGAACATCCACATTTGGCGGAGGCGCCCAAGCAACTTC
 CAGAAGAAGAACTCTCTTTTGGAGATACAGGCATTTCAAAAAATCCTGTAGAA
 CTGATAGAAGGGTGGTTCTCTCCTGGAAATCAACGGTTGTCACGTTTTTTCTTTGCAA
 TAGGCGTATTTATACTCCTGTACGTCGTAGCCCGCATTGTGATCGCAGTACGATACA
 GATACCAGGGCAGTAACAATAAACGCATATATAATGACATCGAAATGTCAAGGTTTC
 CGAAAGtga

>mS4-3a-trunc-pStalk-PDGFR, аминокислотная последовательность: (SEQ ID NO:
 28):

MKKTQTWIITCIYLQLLLFNPLVKTKEICGDPVTDNVKDITKLVANLPNDYMITL
 NYVAGMDVLP SHCWL RDMVIQLSLSL TLLDKFSNISEGLSNYSIIHKLGIIVDDLFFCME
 ENAPKNIKEFPKRPETRSFTPEEFFSIFNRSIDAFKDFMVASDTSDCVLSYPYDVPDYAAS
 AVGQDTQEVI VVPHSLP FKVVISAILALVVLTIISLILIMLWQKKPR

>mS4-3a-trunc-pStalk-PDGFR, последовательность ДНК: (SEQ ID NO: 29):

tgtgtgctggcccatcactttggcaagcacgtgagatctgaattctgacactATGAAAAAACACAAACTTG
 GATCATTACTTGCATATACCTGCAACTTCTCCTTTTCAACCCACTCGTCAAGACCAAA
 GAAATATGCGGCGACCCCGTCACTGATAACGTGAAGGATATCACCAAACCTCGTTGC
 TAACCTTCCAAATGACTACATGATTACATTGAACTATGTAGCAGGAATGGACGTTCT
 TCCATCACATTGCTGGCTCCGGGACATGGTAATCCAGCTTAGCCTCAGCCTTACTAC
 CTTGCTGGACAAGTTTAGCAACATTTCCGAAGGGTTGAGTAACTATAGTATTATTCA
 CAAGCTCGGTATCATAGTTGACGACTTGTTCTTCTGTATGGAAGAGAATGCACCCAA
 AAATATCAAAGAATTCCCCAAAAGGCCCGAAACCAGGTCATTTACCCAGAGAAGAT
 TTTTCAGTATTTTAAATCGCTCAATAGACGCATTCAAGGATTTTCATGGTTGCTTCTGA
 CACATCTGACTGCGTATTGTCCTATCCTTACGATGTCCCGGACTATGCTGCTAGCGCT
 GTGGGCCAGGACACGCAGGAGGTCATCGTGGTGCCACACTCCTTGCCCTTTAAGGTG
 GTGGTGATCTCAGCCATCCTGGCCCTGGTGGTGCTCACCATCATCTCCCTTATCATCC
 TCATCATGCTTTGGCAGAAGAAGCCACGTtga

>mFLT3LG-pStalk-PDGFR, аминокислотная последовательность: (SEQ ID NO: 30):

MTVLAPAWSPNSSLLLLLLLLSPCLRGTPDCYFSPHSHPISSNFKVKFRELTDHLLKD
 YPVTVAVNLQDEKHCKALWSLFLAQRWIEQLKTVAGSKMQTLLEDVNTEIHFVTSCTF
 QPLPECLRFVQTNISHLLKDTCTQLLALKPCIGKACQNFRCLEVQCQPDSSTLLPPRSPI
 ALEATELPEPRPRQYPYDVPDYAASAVGQDTQEVIIVPHSLPFKVVVISAILALVVLTIIS
 LIILIMLWQKKPR

>mFLT3LG-pStalk-PDGFR, последовательность ДНК: (SEQ ID NO: 31):

ATGACCGTACTTGCTCCAGCTTGGAGCCCTAACTCCTCTCTCCTTCTGCTGTTG
 CTGCTTCTGTCCCATGTCTGCGGGGTACCCCGACTGTTATTTTTCTCATAGCCCAA
 TATCTAGCAATTTCAAAGTTAAGTTTCGGGAGCTTACCGATCATTGCTTAAGGATT
 ATCCAGTAACAGTAGCAGTTAATCTCCAAGACGAGAAACACTGTAAGGCCTTGTGG
 TCCCTCTTTCTTGCCCAACGCTGGATTGAGCAGCTTAAGACCGTAGCTGGCTCAAAA
 ATGCAAACCTCTCCTGGAGGATGTCAACACAGAGATTCATTTTGTACCTCCTGCACC
 TTTCAACCTCTCCCTGAGTGCCTTAGATTCGTTGAGACTAACATTTCTCACCTCCTGA
 AGGACACCTGCACCCAGCTGCTTGTCTGAAACCTTGCATCGGCAAGGCATGTCAAA
 ATTTCTCACGGTGTCTCGAAGTCCAGTGCCAGCCTGATAGTTCCACATTGCTCCCCC
 AAGGTCACCCATAGCACTGGAAGCCACTGAACTCCCGAACCACGCCCTCGGCAGT
 ATCCTTACGATGTCCCGGACTATGCTGCTAGCGCTGTGGGCCAGGACACGCAGGAG
 GTCATCGTGGTGCCACACTCCTTGCCCTTTAAGGTGGTGGTGATCTCAGCCATCCTG
 GCCCTGGTGGTGCTCACCATCATCTCCCTTATCATCCTCATCATGCTTTGGCAGAAGA
 AGCCACGTtga

>mSCFa-trunc-pStalk-PDGFR, аминокислотная последовательность (SEQ ID NO:32):

MKKTQTWIITCIYLQLLLFNPLVKTKEICGNPVTDNVKDITKLVANLPNDYMITL
 NYVAGMDVLP SHCWL RDMVIQLSLSL TLLDKFSNISEGLSNYSIIDKLGKIVDDL VLCM
 EENAPKNIKESPKRPETRSFTPEEFFSIFNRSIDAFKDFMVA SDTSDCVLSYPYDVPDYAA
 SAVGQDTQEVIIVPHSLPFKVVVISAILALVVLTIISLIILIMLWQKKPR

>mSCFa-trunc-pStalk-PDGFR, последовательность ДНК (SEQ ID NO: 33):

atgaaaaaaaccagacctggattattacctgcatttatctgcagctgctgctgtttaacccgctggtgaaaaccaagaatttgc
 ggcaaccggtgaccgataacgtgaaagatattaccaaactggtggcgaaacctgccgaacgattatatgattaccctgaactatgtggcgg
 gcatggatgtgctgccgagccattgctggctgctgcgatatggtgattcagctgagcctgagcctgaccacctgctggataaatttagcaac
 attagcgaaggcctgagcaactatagcattattgataaactgggcaaaattgtggatgatctggtgctgcatggaagaaaacgcgcccga
 aacattaagaaagcccgaacgcccggaaaccgcagctttaccccggaagaatttttagcattttaaccgcagcattgatgctgta
 agatttatggtggcgagcgataaccagcgattgctgctgagctatccgatgatgtgccggattatgcggcgagcgcggtggccaggat
 acccggaagtgtgtggcgcgatagcctgccgttaagtgggtgattagcgcgattctggcgctggtggtgctgaccattattagc
 ctgattattctgattatgctgtggcagaaaaaccgcg

>mTPO-trunc-pStalk-PDGFR, аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 34):

MELTDLLLAAMLLAVARLTLSSPVAPACDPRLLNKLLRDSHLLHSRLSQCPDVD
 PLSIPVLLPAVDFSLGEWKTQTEQSKAQDILGAVSLLLEGVMAARGQLEPSCLSSLLGQL
 SGQVRLLL GALQGLLGTQLPLQGRTHKDPNALFLSLQQLLRGKVRLLLLVEGPTLCV
 RYPYDVPDYAASAVGQDTQEVIVVPHSLPFKVVVISAILALVVLTIISLIILIMLWQKKPR

>mTPO-trunc-pStalk-PDGFR, последовательность ДНК (SEQ ID NO: 35):

ATGGAATTGACTGACCTGCTGTTGGCTGCCATGCTTCTTGCCGTCGCCCGCTT
 GACACTCAGCTCTCCAGTTGCTCCCGCCTGCGATCCCAGGTTGCTTAACAAACTGCT
 TCGAGACTCTCATCTGCTTACAGCAGGTTGTCTCAATGTCCAGACGTGGATCCACT
 TTCTATTCTGTCCTGCTGCCCGCAGTTGACTTCTCATTGGGAGAGTGGAAAAC TCA
 GACCGAACAATCTAAGGCACAAGACATATTGGGCGCTGTGTCTCTGTTGCTCGAAG
 GCGTCATGGCTGCCCGGGGGCAGCTTGAACCCTCATGTCTCTCCTCCTTGCTGGGTC
 AGCTTTCTGGACAAGTTAGATTGCTGCTGGGAGCTTTGCAAGGGTTGTTGGGTACAC
 AACTCCC ACTTCAGGGTCGCACTACCGCTCACAAAGATCCAAATGCCCTTTTTCTTA
 GTCTTCAACAATTGCTGCGGGGAAAAGTGAGATTTTTGTTGCTGGTTGAAGGACCAA
 CATTGTGCGTTCGATATCCTTACGATGTCCCGGACTATGCTGCTAGCGCTGTGGGCC
 AGGACACGCAGGAGGTCATCGTGGTGCCACACTCCTTGCCCTTAAAGGTGGTGGTGA
 TCTCAGCCATCCTGGCCCTGGTGGTGCTCACCATCATCTCCCTTATCATCCTCATCAT
 GCTTTGGCAGAAGAAGCCACGTga

>mS4-3a-IgG4hinge-PDGFR, аминокислотная (SEQ ID NO: 36)

MKKTQTWIITCIYLQLLLFNPLVKTKEICGDPVTDNVKDITKLVANLPNDYMITL
 NYVAGMDVLP SHCWL RDMVIQLSLSL TLLDKFSNISEGLSNYSIIHKLGIIVDDLFFCME
 ENAPKNIKEFPKRPETRSFTPEEFFSIFNRSIDAFKDFMVASDTSDCVLSYPYDVPDYAAS
 ESKYGPPCPPCPAVGQDTQEVIVVPHSLPFKVVVISAILALVVLTIISLIILIMLWQKKPR*

>mS4-3a-IgG4hinge-PDGFR, ДНК (SEQ ID NO: 37)

ATGAAAAAAACACAAACTTGGATCATTACTTGCATATACCTGCAACTTCTCCTTTTC
 AACCCACTCGTCAAGACCAAAGAAATATGCGGCGACCCCGTCACTGATAACGTGAA
 GGATATCACCAA ACTCGTTGCTAACCTTCCAAATGACTACATGATTACATTGAACTA
 TGTAGCAGGAATGGACGTTCTTCCATCACATTGCTGGCTCCGGGACATGGTAATCCA
 GCTTAGCCTCAGCCTTACTACCTTGCTGGACAAGTTTAGCAACATTTCCGAAGGGTT
 GAGTAACTATAGTATTATTCACAAGCTCGGTATCATAGTTGACGACTTGTTCTTCTGT
 ATGGAAGAGAATGCACCCAAAAATATCAAAGAATCCCCAAAAGGCCCGAAACCA

GGTCATTTACCCAGAAAGAAATTTTTCAGTATTTTAAATCGCTCAATAGACGCATTCA
 AGGATTTTCATGGTTGCTTCTGACACATCTGACTGCGTATTGTCCTATCCTTACGATGT
 CCCGGACTATGCTGCTAGCGAAAGCAAGTATGGTCCTCCCTGCCCCCGTGCCAGC
 TGTGGGCCAGGACACGCAGGAGGTCATCGTGGTGCCACACTCCTTGCCCTTTAAGGT
 GGTGGTGATCTCAGCCATCCTGGCCCTGGTGGTGCTCACCATCATCTCCCTTATCATC
 CTCATCATGCTTTGGCAGAAGAAGCCACGTtga

>mFLT3LG-IgG4hinge-PDGFR, аминокислотная (SEQ ID NO: 38)

MTVLAPAWSPNSSLLLLLLLLSPCLRGTPDCYFSHSPISSNFKVKFRELTDHLLKD
 YPVTVAVNLQDEKHCKALWSLFLAQRWIEQLKTVAGSKMQTLLEDVNTEIHFVTSCTF
 QPLPECLRFVQTNISHLLKDTCTQLLALKPCIGKACQNFSRCLEVQCQPDSSTLLPPRSPI
 ALEATELPEPRPRQYPYDVPDYAASESKYGPCCPPCPAVGQDTQEVIIVPHSLPFKVVVI
 SAILALVVLTIISLIILMLWQKKPR*

>mFLT3LG-IgG4hinge-PDGFR, ДНК (SEQ ID NO: 39)

ATGACCGTACTTGCTCCAGCTTGGAGCCCTAACTCCTCTCCTTCTGCTGTTG
 CTGCTTCTGTCCCATGTCTGCGGGGTACCCCGACTGTTATTTTTCTCATAGCCCAA
 TATCTAGCAATTTCAAAGTTAAGTTTCGGGAGCTTACCGATCATTGCTTAAGGATT
 ATCCAGTAACAGTAGCAGTTAATCTCCAAGACGAGAAACACTGTAAGGCCTTGTGG
 TCCCTCTTTCTTGCCCAACGCTGGATTGAGCAGCTTAAGACCGTAGCTGGCTCAAAA
 ATGCAAACCTCTCCTGGAGGATGTCAACACAGAGATTCATTTTGTACCTCCTGCACC
 TTTCAACCTCTCCCTGAGTGCCTTAGATTCGTTCACTAACATTTCTCACCTCCTGA
 AGGACACCTGCACCCAGCTGCTTGTCTGAAACCTTGCATCGGCAAGGCATGTCAAA
 ATTTCTCACGGTGTCTCGAAGTCCAGTGCCAGCCTGATAGTTCCACATTGCTCCCCC
 AAGGTCACCCATAGCACTGGAAGCCACTGAACTTCCCGAACCACGCCCTCGGCAGT
 ATCCTTACGATGTCCCGACTATGCTGCTAGCGAAAGCAAGTATGGTCCTCCCTGCC
 CCCCCTGCCCAGCTGTGGGCCAGGACACGCAGGAGGTCATCGTGGTGCCACACTCC
 TTGCCCTTTAAGGTGGTGGTGATCTCAGCCATCCTGGCCCTGGTGGTGCTCACCATC
 ATCTCCCTTATCATCCTCATCATGCTTTGGCAGAAGAAGCCACGTtga

>mTPO-trunc-IgG4hinge-PDGFR, аминокислотная (SEQ ID NO: 40)

MELTDLLLAAMLLAVARLTLSSPVAPACDPRLLNKLLRDSHLLHSRLSQCPDVD
 PLSIPVLLPAVDFSLGEWKTQTEQSKAQDILGAVSLLLEGVMAARGQLEPSCLSSLLGQL
 SGQVRLLLGALQGLLGTQLPLQGRTHKDPNALFLSLQQLLRGKVRFLLLVEGP TLCV
 RYPYDVPDYAASESKYGPCCPPCPAVGQDTQEVIIVPHSLPFKVVVISAILALVVLTIISLI
 ILIMLWQKKPR*

>mTPO-trunc-IgG4hinge-PDGFR, ДНК (SEQ ID NO: 41)

ATGGAATTGACTGACCTGCTGTTGGCTGCCATGCTTCTTGCCGTCGCCCGCTT
 GACACTCAGCTCTCCAGTTGCTCCCGCCTGCGATCCCAGGTTGCTTAACAAACTGCT
 TCGAGACTCTCATCTGCTTACAGCAGGTTGTCTCAATGTCCAGACGTGGATCCACT
 TTCTATTCTGCTCCTGCTGCCCCGAGTTGACTTCTCATTGGGAGAGTGGAACAACTCA
 GACCGAACAATCTAAGGCACAAGACATATTGGGCGCTGTGTCTCTGTTGCTCGAAG
 GCGTCATGGCTGCCCGGGGGCAGCTTGAACCCTCATGTCTCTCCTCCTTGCTGGGTC

AGCTTTCTGGACAAGTTAGATTGCTGCTGGGAGCTTTGCAAGGGTTGTTGGGTACAC
 AACTCCCACTTCAGGGTTCGCACTACCGCTCACAAAGATCCAAATGCCCTTTTTCTTA
 GTCTTCAACAATTGCTGCGGGGAAAAGTGAGATTTTTGTTGCTGGTTGAAGGACCAA
 CATTGTGCGTTCGATATCCTTACGATGTCCCGGACTATGCTGCTAGCGAAAGCAAGT
 ATGGTCCTCCCTGCCCCCGTGCCAGCTGTGGGCCAGGACACGCAGGAGGTCATCG
 TGGTGCCACACTCCTTGCCCTTTAAGGTGGTGGTGTATCTCAGCCATCCTGGCCCTGG
 TGGTGCTCACCATCATCTCCCTTATCATCCTCATCATGCTTTGGCAGAAGAAGCCAC
 GTga

>mSCFa-IgG4hinge-PDGFR, аминокислотная (SEQ ID NO: 42)

MKKTQTWIITCIYLQLLLFNPLVKTEICGNPVTDNVKDITKLVANLPNDYMITL
 NYVAGMDVLP SHCWL RDMVIQLSLSL TLLDKFSNISEGLSNYSIIDKLGKIVDDL VLCM
 EENAPKNIKESPKRPETRSFTPEEFFSIFNRSIDAFKDFMVASDTSDCVLSYPYDVPDYAA
 SESKYGPPCPPCPAVGQDTQEIVVPHSLPFKVVVISAILALVVLTHIILIMLWQKKPR*

>mSCFa-IgG4hinge-PDGFR, ДНК (SEQ ID NO: 43)

ATGAAAAAACACAAACTTGGATCATTACTTGCATATACCTGCAACTTCTCCT
 TTTCAACCCACTCGTCAAGACCAAAGAAATATGCGGCAACCCCGTCACTGATAACGT
 GAAGGATATCACAAACTCGTTGCTAACCTTCCAAATGACTACATGATTACATTGAA
 CTATGTAGCAGGAATGGACGTTCTTCCATCACATTGCTGGCTCCGGGACATGGTAAT
 CCAGCTTAGCCTCAGCCTTACTACCTTGCTGGACAAGTTTAGCAACATTTCCGAAGG
 GTTGAGTAACTATAGTATTATTGATAAGCTCGGTAAGATAGTTGACGACTTGGTTCT
 CTGTATGGAAGAGAATGCACCCAAAAATATCAAAGAATCCCCCAAAGGCCCGAAA
 CCAGGTCATTTACCCAGAGAATTTTTTCAGTATTTTAATCGCTCAATAGACGCATT
 CAAGGATTTTCATGGTTGCTTCTGACACATCTGACTGCGTATTGTCCTATCCTTACGAT
 GTCCCGGACTATGCTGCTAGCGAAAGCAAGTATGGTCCTCCCTGCCCCCGTGCCCA
 GCTGTGGGCCAGGACACGCAGGAGGTCATCGTGGTGCCCACTCCTTGCCCTTTAAG
 GTGGTGGTGTATCTCAGCCATCCTGGCCCTGGTGGTGTCTCACCATCATCTCCCTTATCA
 TCCTCATCATGCTTTGGCAGAAGAAGCCACGTga

>hSCFa-trunc-pStalk-PDGFR, аминокислотная (SEQ ID NO: 44)

MKKTQTWILTICIYLQLLLFNPLVKTEGICRNRVTNNVKDVTKLVANLPKDYMIT
 LKYVPGMDVLP SHCWISEMVVQLSDSLTDLLDKFSNISEGLSNYSIIDKLVNIVDDL VEC
 VKENSSKDLKKSFKSPEPRLFTPEEFFRIFNRSIDAFKDFVVASETSDCVVSYPYDVPDYA
 ASAVGQDTQEIVVPHSLPFKVVVISAILALVVLTHIILIMLWQKKPR*

>hSCFa-trunc-pStalk-PDGFR, ДНК (SEQ ID NO: 45)

TGAAGAAGACTCAGACCTGGATTCTGACGTGCATATATCTCCAACCTTTGCTT
 TTTAATCCCTTGGTTAAGACCGAGGGGATTTGTTCGGAACAGGGTGACTAACAAACGTG
 AAAGATGTGACCAAACCTGGTGGCAAACCTCCCGAAGGACTACATGATTACACTCAA
 ATATGTGCCGGGCATGGATGTCTTGCCAAGCCACTGTTGGATCTCCGAAATGGTTGT
 CCAGTTGTCCGACAGCCTTACGGATCTCCTGGATAAATTTAGCAACATTAGCGAAGG
 TCTTTCTAATTATTCCATTATAGATAAACTCGTTAATATTGTAGATGACCTCGTCGAA
 TGTGTGAAGGAAAATTCTAGCAAGGATTTGAAAAATCCTTTAAGTCACCGGAACC

CCGACTTTTCACCCCCGAAGAATTTTTCCGAATATTCAACAGGAGCATAGATGCTTT
 CAAAGACTTCGTAGTGGCCAGCGAAACAAGTGA CTGCGTGGTTTCCTATCCTTACGA
 TGTCCCGGACTATGCTGCTAGCGCTGTGGGCCAGGACACGCAGGAGGTCATCGTGG
 TGCCACACTCCTTGCCCTTTAAGGTGGTGGTGATCTCAGCCATCCTGGCCCTGGTGG
 TGCTCACCATCATCTCCCTTATCATCCTCATCATGCTTTGGCAGAAGAAGCCACGTga

>hSCFa-trunc-IgG4hinge-PDGFR, аминокислотная (SEQ ID NO: 46)

MKKTQWILTCIYLQLLLFNPLVKTEGICRNRVTNNVKDVTKLVANLPKDYMIT
 LKYVPGMDVLP SHCWISEMVVQLSDSLDLLDKFSNISEGLSNYSIIDKLVNIVDDLVEC
 VKENSSKDLKKSFKSPEPRLFTPEEFFRIFNRSIDAFKDFVVASETSDCVVSYPYDVPDYA
 ASES KYGPPCPPCPAVGQDTQE VIVVPHSLPFKVVVISAILALVVLTHLSLILIMLWQKKP
 R*

>hSCFa-trunc-IgG4hinge-PDGFR, ДНК (SEQ ID NO: 47)

ATGAAGAAGACTCAGACCTGGATTCTGACGTGCATATATCTCCA ACTCTTGCT
 TTTTAATCCCTTGGTTAAGACCGAGGGGATTTGTCGGAACAGGGTGACTAACAACGT
 GAAAGATGTGACCAA ACTGGTGGCAAACCTCCCGAAGGACTACATGATTACACTCA
 AATATGTGCCGGGCATGGATGTCTTGCCAAGCCACTGTTGGATCTCCGAAATGGTTG
 TCCAGTTGTCCGACAGCCTTACGGATCTCCTGGATAAATTTAGCAACATTAGCGAAG
 GTCTTTCTAATTATTCCATTATAGATAAACTCGTTAATATTGTAGATGACCTCGTCGA
 ATGTGTGAAGGAAAATTCTAGCAAGGATTTGAAAAAATCCTTTAAGTCACCGGAAC
 CCCGACTTTTCACCCCCGAAGAATTTTTCCGAATATTCAACAGGAGCATAGATGCTT
 TCAAAGACTTCGTAGTGGCCAGCGAAACAAGTGA CTGCGTGGTTTCCTATCCTTACG
 ATGTCCCGGACTATGCTGCTAGCGAAAGCAAGTATGGTCCTCCCTGCCCCCGTGCC
 CAGCTGTGGGCCAGGACACGCAGGAGGTCATCGTGGTGCCACACTCCTTGCCCTTTA
 AGGTGGTGGTGATCTCAGCCATCCTGGCCCTGGTGGTGCTCACCATCATCTCCCTTA
 TCATCCTCATCATGCTTTGGCAGAAGAAGCCACGTga

>hFLT3LG-trunc-IgG4hinge-PDGFR, аминокислотная (SEQ ID NO: 48)

MTVLAPAWSPTTYLLLLLLLLSSGLSGTQDCSFQHSPISDFAVKIRELSDYLLQDY
 PVTVASNLQDEELCGGLWRLVLAQRWMERLKT VAGSKMQGLLERVNT EIH FVTKCAF
 QPPPSCLRFVQTNISRLLQETSEQLVALKPWITRQNF SRCLELQCQPDSSTLPPPWSPRPLE
 ATAPTAPQPYPYDVPDYA ASES KYGPPCPPCPAVGQDTQE VIVVPHSLPFKVVVISAILA
 LVVLTHLSLILIMLWQKKPR*

>hFLT3LG-trunc-IgG4hinge-PDGFR, ДНК (SEQ ID NO: 49)

ATGACAGTGCTGGCCCCAGCCTGGAGTCCAACAACCTACCTTCTCTTGCTCTT
 GCTTCTTTCCAGTGGCCTGTCAGGCACGCAAGATTGTTCA TTTCAACATTCACCCATC
 AGTTCAGACTTTGCTGTTAAAATTAGGGAGTTGAGCGATTACCTCCTGCAAGATTAT
 CCTGTGACTGTTGCAAGCAACCTTCAGGATGAAGAGCTTTGCGGGGGGCTCTGGCGC
 CTCGTGTTGGCTCAGCGGTGGATGGAACGCCTCAAAACGGTGGCGGGTAGTAAGAT
 GCAGGGTCTGTTGGAGAGAGTTAACACGGAGATCCATTT CGTAACCAAGTGTGCATT
 TCAACCGCCACCCTCTTGCCCTTAGATTTGTCCAAACCAATATCAGCCGACTTCTCCA
 AGAGACATCTGAACAGCTTGTTGCCCTGAAACCGTGGATTACAAGGCAAAACTTTTC

ACGCTGCTTGGAGCTTCAATGTCAACCTGACAGTAGTACCCTTCCGCCTCCTTGGTCT
 CCTAGACCGCTTGAAGCTACGGCTCCTACGGCACCACAACCCTATCCTTACGATGTC
 CCGGACTATGCTGCTAGCGAAAGCAAGTATGGTCCTCCCTGCCCGCCGTCGCCAGCT
 GTGGGCCAGGACACGCAGGAGGTCATCGTGGTGCCACACTCCTTGCCCTTTAAGGTG
 GTGGTGATCTCAGCCATCCTGGCCCTGGTGGTGCTCACCATCATCTCCCTTATCATCC
 TCATCATGCTTTGGCAGAAGAAGCCACGTtga

>hFLT3LG-pStalk-PDGFR, аминокислотная (SEQ ID NO: 50)

MTVLAPAWSPTTYLLLLLLLSSGLSGTQDCSFQHSPISDFAVKIRELSDYLLQDY
 PVTVASNLQDEELCGGLWRLVLAQRWMERLKTVAGSKMQGLLERVNTIHFVTKCAF
 QPPPSCLRFVQTNISRLQETSEQLVALKPWITRQNF SRCLELQCQPDSSTLPPPWSRPLE
 ATAPTAPQYPYDVPDYAASAVGQDTQEIVVPHSLPFKVVVISAILALVVLTIISLILIM
 LWQKKPR*

>hFLT3LG-pStalk-PDGFR, ДНК (SEQ ID NO: 51)

ATGACAGTGCTGGCCCCAGCCTGGAGTCCAACAACCTACCTTCTCTTGCTCTT
 GCTTCTTTCCAGTGGCCTGTCAGGCACGCAAGATTGTTTCATTTCAACATTCACCCATC
 AGTTCAGACTTTGCTGTAAAATTAGGGAGTTGAGCGATTACCTCCTGCAAGATTAT
 CCTGTGACTGTTGCAAGCAACCTTCAGGATGAAGAGCTTTGCGGGGGGCTCTGGCGC
 CTCGTGTTGGCTCAGCGGTGGATGGAACGCCTCAAACGGTGGCGGGTAGTAAGAT
 GCAGGGTCTGTTGGAGAGAGTTAACACGGAGATCCATTTTCGTAACCAAGTGTGCATT
 TCAACCGCCACCCTCTTGCCTTAGATTTGTCCAAACCAATATCAGCCGACTTCTCCA
 AGAGACATCTGAACAGCTTGTTCGCCCTGAAACCGTGGATTACAAGGCAAACTTTTC
 ACGCTGCTTGGAGCTTCAATGTCAACCTGACAGTAGTACCCTTCCGCCTCCTTGGTCT
 CCTAGACCGCTTGAAGCTACGGCTCCTACGGCACCACAACCCTATCCTTACGATGTC
 CCGGACTATGCTGCTAGCGCTGTGGGCCAGGACACGCAGGAGGTCATCGTGGTGCC
 ACACTCCTTGCCCTTTAAGGTGGTGGTGATCTCAGCCATCCTGGCCCTGGTGGTGCT
 CACCATCATCTCCCTTATCATCCTCATCATGCTTTGGCAGAAGAAGCCACGTtga

>мышинная mS4-3a-усеченная (SEQ ID NO: 54)

KEICGDPVTDNVKDITKLVANLPNDYMITLNYVAGMDVLP SHCWLRDMVIQLSL
 SLTLLDKFSNISEGLSNYSIIHKLGIIVDDLFFCMEENAPKNIKEFPKRPETRSFTPEEFFSI
 FNRSIDAFKDFMVASDTSDCVLS

>мышинный лиганд FLT3 (SEQ ID NO: 55)

GTPDCYFSHSPISNFKVKFRELTDHLLKDYPVTVAVNLQDEKHCKALWSLFLAQRWIE
 QLKTVAGSKMQTLLEDVNTIHFVTSCTFQPLPECLRFVQTNISHLLKDTCTQLLALKPCI
 GKACQNF SRCLEVQCQPDSSTLPPRSPIALEATELPEPRPRQ

>мышинная SCFa-усеченная (SEQ ID NO: 56)

KEICGNPVDNVKDITKLVANLPNDYMITLNYVAGMDVLP SHCWLRDMVIQLSL
 SLTLLDKFSNISEGLSNYSIIDKLGKIVDDLVL CMEENAPKNIKESPKRPETRSFTPEEFFS
 IFNRSIDAFKDFMVASDTSDCVLS

>мышинная TPO-усеченная (SEQ ID NO: 57)

SPVAPACDPRLLNKLLRDSHLLHSRLSQCPDVDPLSIPVLLPAVDFSLGEWKTQT

EQSKAQDILGAVSLLLEGVMAARGQLEPSCLSSLLGQLSGQVRLLL GALQGLLGTQLPL
QGRTTAHKDPNALFSLQQLLRGKVRFLLLVEGPTLCVR

>человеческая SCFa-усеченная (SEQ ID NO: 58)

EGICRNRVTNNVKDVTCLVANLPKDYMITLKYVPGMDVLP SHCWISEM VVQLS
DSLTDLLDKFSNISEGLSNYSIIDKLVNIVDDLVECVKENS SKDLKKSFKSPEPRLFTPEEF
FRIFNRSIDAFKDFVVASETSDCVVS

>Лиганд человеческого FLT3 (SEQ ID NO: 59)

QDCSFQHSPISDFAVKIRELSDYLLQDYPVTVASNLQDEELCGGLWRLVLAQRWMERL
KTVAGSKMQGLLERVNTEIHFVTKCAFQPPPSCLRFVQTNISRLLQETSEQLVALKPWIT
RQNF SRCLELQCQPDSS TLPPPWS PRPLEATAPTAPQP

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ доставки одной или нескольких нуклеиновых кислот в гемопоэтическую стволовую клетку (ГСК), где указанный способ включает:

(i) получение ретровируса, содержащего одну или более нуклеиновых кислот, белок вирусной оболочки, содержащий по меньшей мере одну мутацию, которая уменьшает его нативную функцию, и невирусный мембраносвязанный белок, содержащий внеклеточный нацеливающий домен, который связывается с белком на поверхности HSC; и

(ii) контактирование ретровируса с HSC, и

таким образом, доставку одной или более нуклеиновых кислот в HSC.

2. Способ по п. 1, где внеклеточным нацеливающим доменом является фактор стволовых клеток (SCF), лиганд FMS-подобной тирозинкиназы 3 (FLT3L) или тромбопоэтин (TPO).

3. Способ по п. 1 или 2, где белком на поверхности HSC является CD34, CD90, CD133, CD49f, CD201, c-Kit, FMS-подобная тирозинкиназа 3 (FLT3) или рецептор тромбопоэтина.

4. Способ по любому из пп. 1-3, где внеклеточный нацеливающий домен содержит аминокислотную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 54-59.

5. Способ по любому из пп. 1-4, где по меньшей мере одна или более нуклеиновых кислот кодируют представляющий интерес ген, и необязательно где представляющий интерес ген кодирует представляющий интерес белок.

6. Способ по п. 5, где представляющий интерес белок представляет собой белок, редактирующий ген.

7. Способ по п. 6, где белком, редактирующим ген, является Cas-эндонуклеаза, нуклеаза «цинковые пальцы», эффекторная нуклеаза, подобная активатору транскрипции (TALEN), или мегануклеаза, необязательно при этом Cas-эндонуклеаза представляет собой Cas9-эндонуклеазу.

8. Способ по любому из пп. 1-5, где по меньшей мере одна или более нуклеиновых кислот представляют собой направляющую РНК.

9. Способ по любому из пп. 1-6, где ретровирус проникает в клетку или инфицирует ее на стадии (ii).

10. Способ по любому из пп. 1-9, где ретровирус является лентивирусом.

11. Способ по любому из пп. 1-10, где белок оболочки вируса представляет собой белок оболочки VSV-G, белок оболочки вируса кори, белок оболочки вируса *parv* или G-белок вируса *sosal*.

12. Способ по п. 11, где по меньшей мере одна мутация белка оболочки VSV-G представляет собой мутацию, выбранную из группы, состоящей из H8, I41, K47, Y209 и R354.

13. Способ по п. 11, где белок оболочки вируса включает белок оболочки VSV-G, содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:16 или SEQ ID NO:17.

14. Способ по п. 11, где по меньшей мере одна мутация белка оболочки вируса кори представляет собой мутацию, выбранную из группы, состоящей из Y481, R533, S548 и F549.

15. Способ по п. 11, где белок оболочки вируса включает белок оболочки вируса кори, содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 21.

16. Способ по п. 11, где по меньшей мере одна мутация белка оболочки вируса *pirah* представляет собой мутацию, выбранную из группы, состоящей из E501, W504, Q530 и E533.

17. Способ по п. 11, где белок оболочки вируса включает белок оболочки вируса *pirah*, содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 23.

18. Способ по п. 11, где по меньшей мере одна мутация G-белка вируса *socal* представляет собой мутацию, выбранную из группы, состоящей из K64 и R371.

19. Способ по п. 11, где белок вирусной оболочки содержит G-белок вируса *socal*, содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:26.

20. Способ по любому из пп. 1-19, где линкер расположен между мембраносвязанным доменом и внеклеточным нацеливающим доменом.

21. Способ по п. 20, где линкер представляет собой жесткий линкер, необязательно содержащий стебель PDGFR или стебель CD8 α .

22. Способ по п. 20, где линкер представляет собой гибкий линкер, необязательно содержащий аминокислотную последовательность, включающую GAPGAS (SEQ ID NO: 5) или GGGGS (SEQ ID NO:7).

23. Способ по п. 20, где линкер представляет собой олигомеризованный линкер, необязательно содержащий IgG4-шарнир или аминокислотную последовательность, которая может образовывать тетрамерную суперспирализованную спираль.

24. Способ по любому из пп. 1-23, где HSC представляет собой HSC мыши или HSC человека.

25. Способ по любому из пп. 1-23, где одна или более нуклеиновых кислот кодируют химерный антигенный рецептор.

26. Способ редактирования гена в гемопоэтической стволовой клетке (HSC), где указанный способ включает:

(i) получение ретровируса, содержащего одну или более нуклеиновых кислот, кодирующих композицию для редактирования генов, вирусный белок оболочки, содержащий по меньшей мере одну мутацию, которая уменьшает его нативную функцию, и невирусный мембраносвязанный белок, содержащий внеклеточный нацеливающий домен, который связывается с белком на поверхности HSC; и

(ii) контактирование ретровируса с HSC таким образом, что одна или более нуклеиновых кислот, кодирующих композицию для редактирования генов, доставляются в HSC,

где композиция для редактирования генов специфически нацелена на участок хромосомной ДНК HSC и вызывает генетическую модификацию.

27. Способ по п. 26, где внеклеточным нацеливающим доменом является фактор

стволовых клеток (SCF), лиганд FMS-подобной тирозинкиназы 3 (FLT3L) или тромбопоэтин (TPO).

28. Способ по п. 26 или 27, где белком на поверхности HSC является CD34, CD90, CD133, CD49f, CD201, c-Kit, FMS-подобная тирозинкиназа 3 (FLT3) или рецептор тромбопоэтина.

29. Способ по любому из пп. 26-28, где внеклеточный нацеливающий домен содержит аминокислотную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 54-59.

30. Способ по любому из пп. 26-29, где композиция для редактирования генов содержит одну или более нуклеиновых кислот, где одна или более нуклеиновых кислот кодируют белок для редактирования генов и/или направляющую РНК.

31. Способ по п. 30, где белком, редактирующим ген, является Cas-эндонуклеаза, нуклеаза «цинковые пальцы», эффекторная нуклеаза, подобная активатору транскрипции (TALEN) или мегануклеаза, необязательно при этом Cas-эндонуклеаза представляет собой Cas9-эндонуклеазу.

32. Способ по любому из пп. 26-31, где ретровирус проникает в клетку или инфицирует ее на стадии (ii).

33. Способ по любому из пп. 26-32, где ретровирус является лентивирусом.

34. Способ по любому из пп. 26-33, где белок оболочки вируса представляет собой белок оболочки VSV-G, белок оболочки вируса кори, белок оболочки вируса *parah* или G-белок вируса *sosal*.

35. Способ по п. 34, где по меньшей мере одна мутация белка оболочки VSV-G представляет собой мутацию, выбранную из группы, состоящей из H8, I41, K47, Y209 и R354.

36. Способ по п. 34, где белок оболочки вируса включает белок оболочки VSV-G, содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:16 или SEQ ID NO:17.

37. Способ по п. 34, где по меньшей мере одна мутация белка оболочки вируса кори представляет собой мутацию, выбранную из группы, состоящей из Y481, R533, S548 и F549.

38. Способ по п. 34, где белок оболочки вируса включает белок оболочки вируса кори, содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:21.

39. Способ по п. 34, где по меньшей мере одна мутация белка оболочки вируса *parah* представляет собой мутацию, выбранную из группы, состоящей из E501, W504, Q530 и E533.

40. Способ по п. 34, где белок оболочки вируса включает белок оболочки вируса *parah*, содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:23.

41. Способ по п. 34, где по меньшей мере одна мутация G-белка вируса *sosal* представляет собой мутацию, выбранную из группы, состоящей из K64 и R371.

42. Способ по п. 34, где белок вирусной оболочки содержит G-белок вируса *sosal*, содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:26.

43. Способ по любому из пп. 26-42, где линкер расположен между

мембраносвязанным доменом и внеклеточным нацеливающим доменом.

44. Способ по п. 43, где линкер представляет собой жесткий линкер, необязательно содержащий стебель PDGFR или стебель CD8 α .

45. Способ по п. 43, где линкер является гибким линкером, необязательно содержащим аминокислотную последовательность, включающую GAPGAS (SEQ ID NO:5) или GGGGS (SEQ ID NO:7).

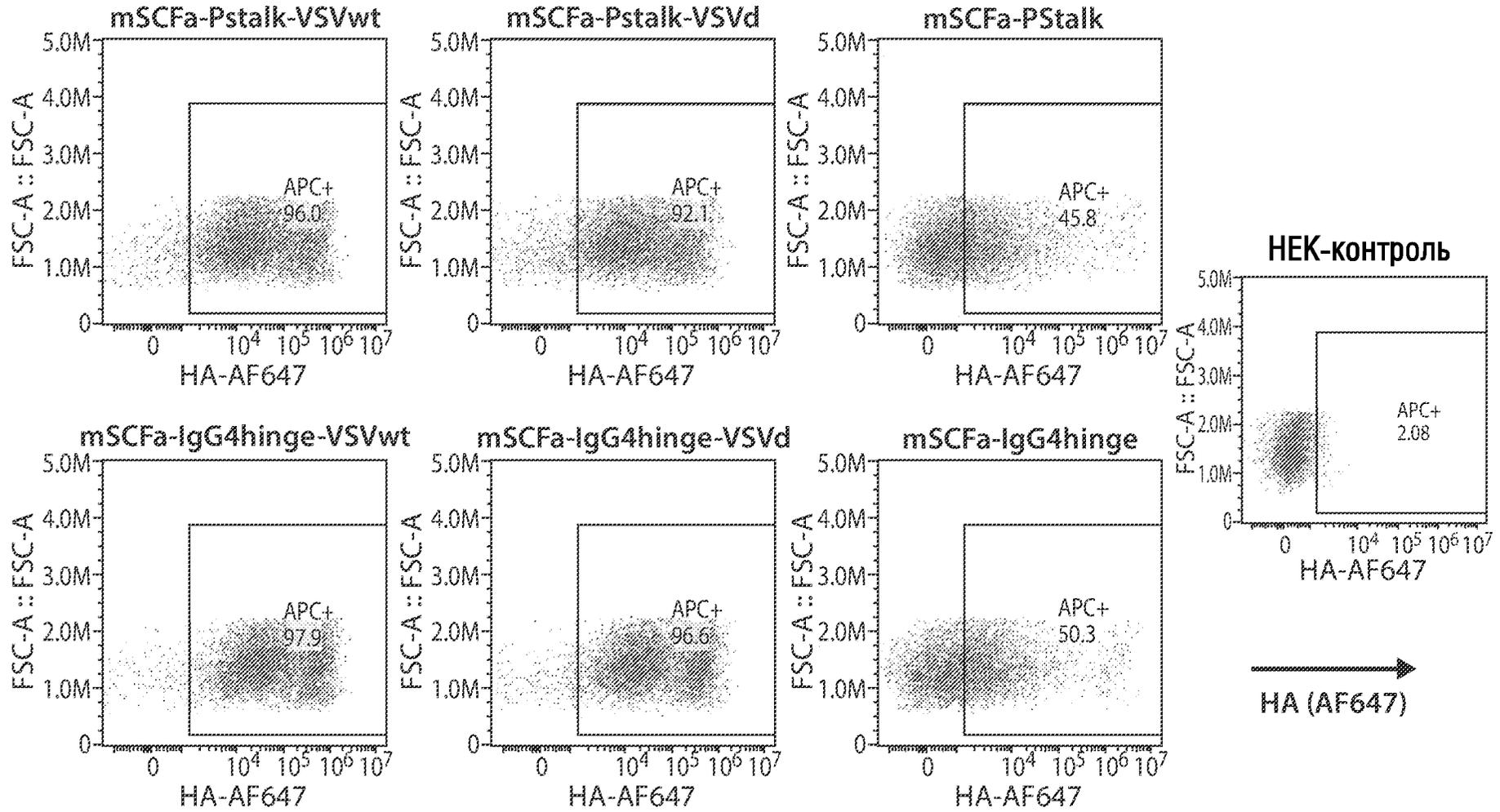
46. Способ по п. 43, где линкер представляет собой олигомеризованный линкер, необязательно содержащий IgG4-шарнир или аминокислотную последовательность, которая может образовывать тетрамерную суперспирализованную спираль.

47. Способ по любому из пп. 26-46, где HSC представляет собой HSC мыши или HSC человека.

48. Способ по любому из пп. 26-46, дополнительно включающий доставку одной или более нуклеиновых кислот, кодирующих химерный антигенный рецептор, в HSC.

По доверенности

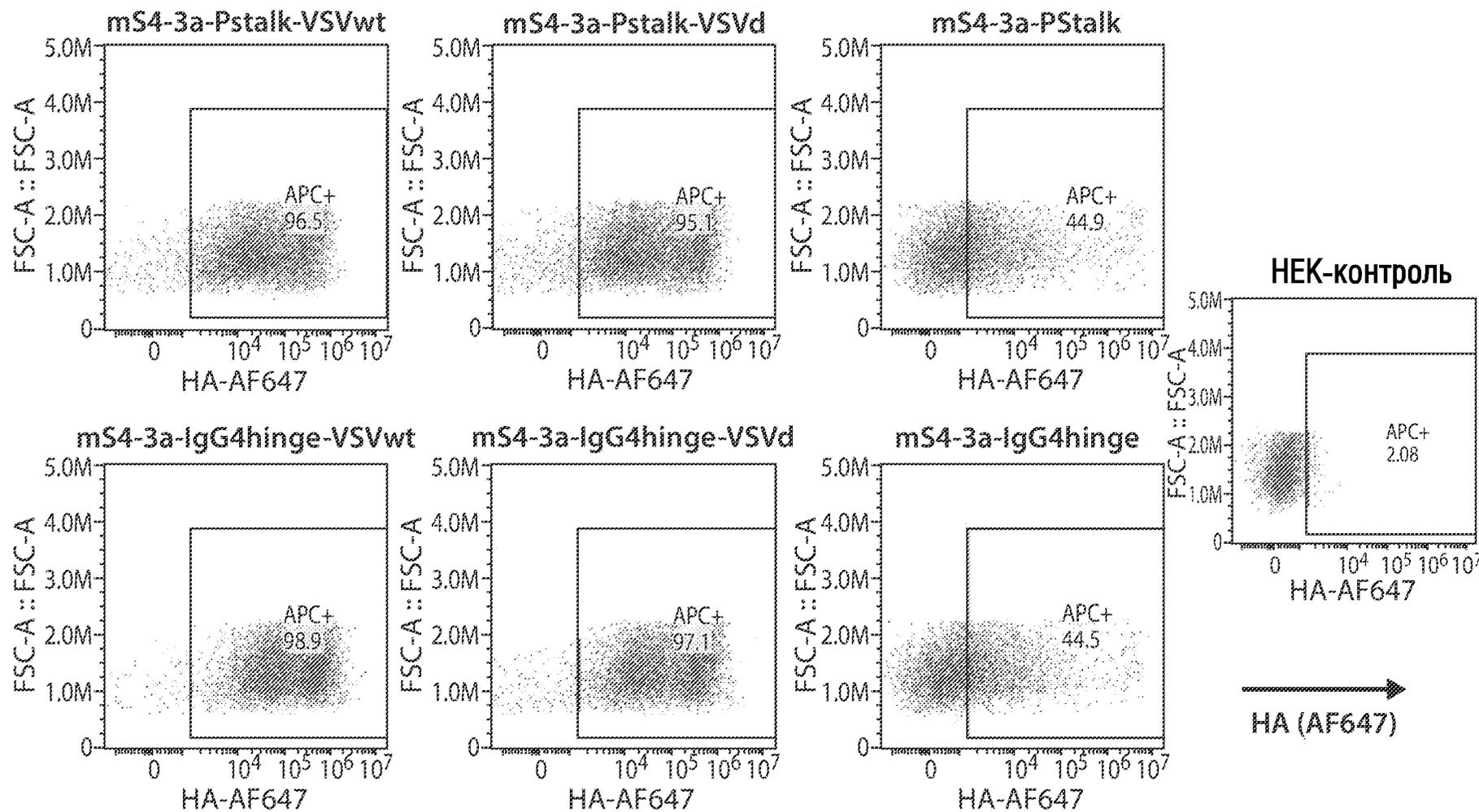
Фиг.1



1/22

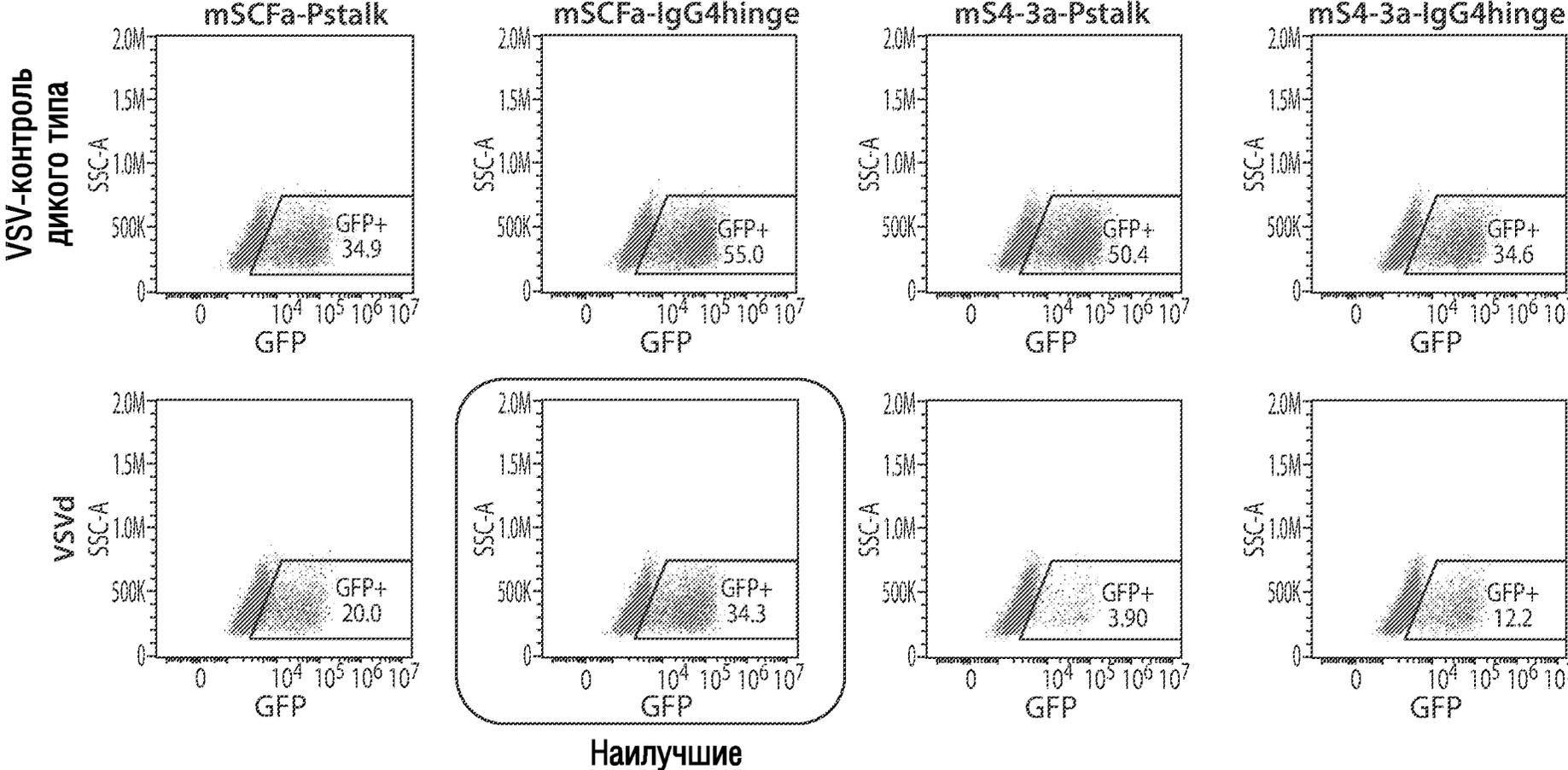
579452

ФИГ.2

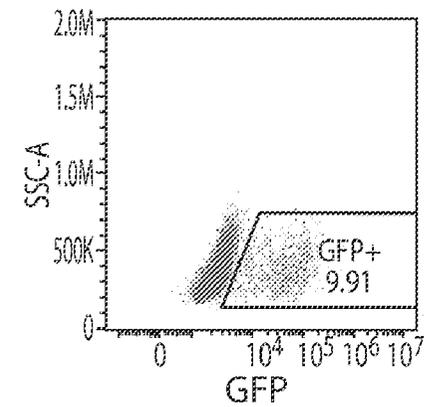
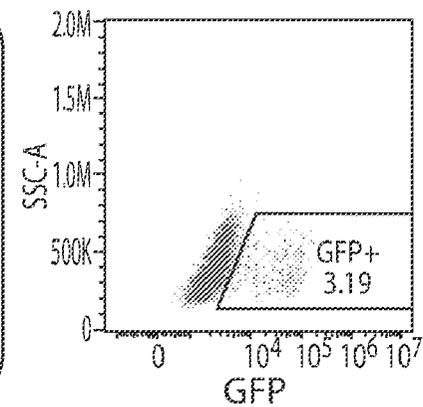
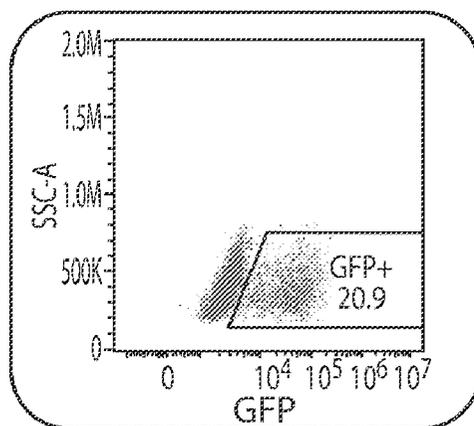
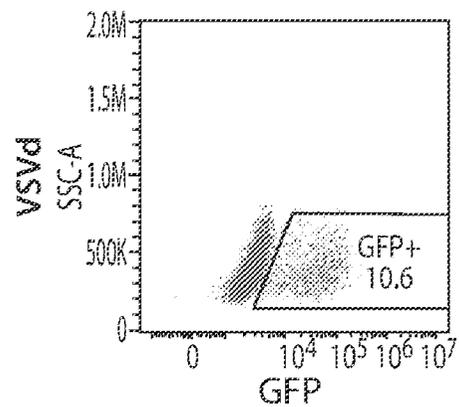
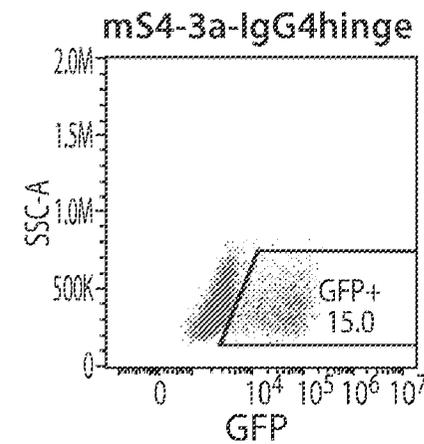
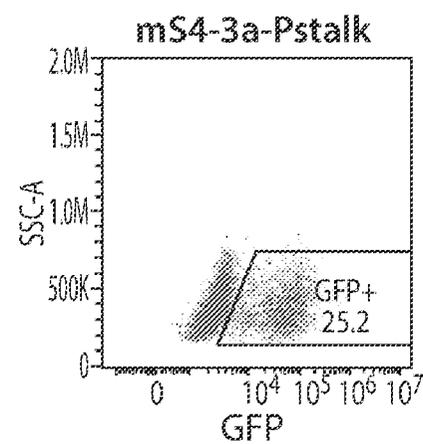
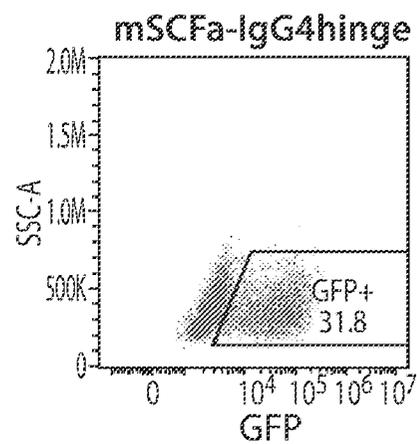
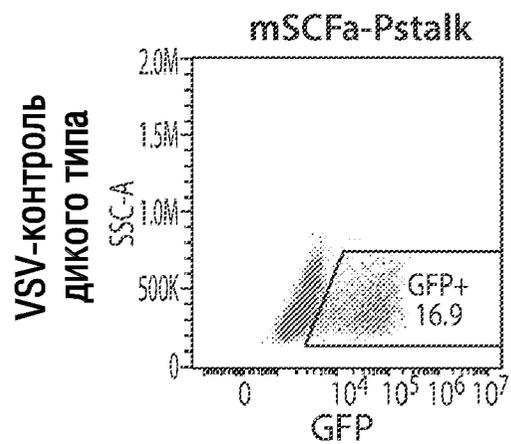


HA (AF647)

ФИГ.3

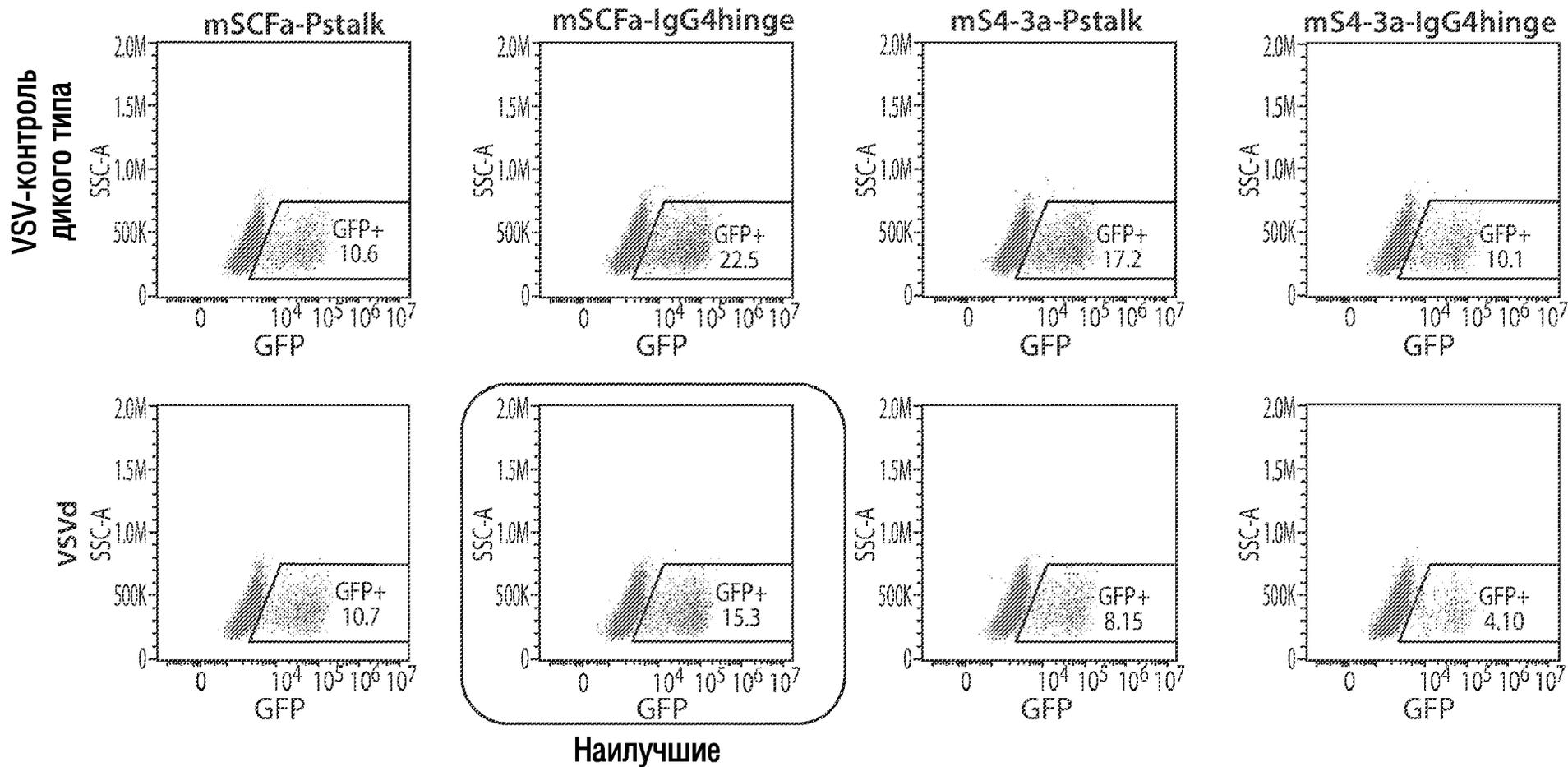


ФИГ.4



Наилучшие

ФИГ.5

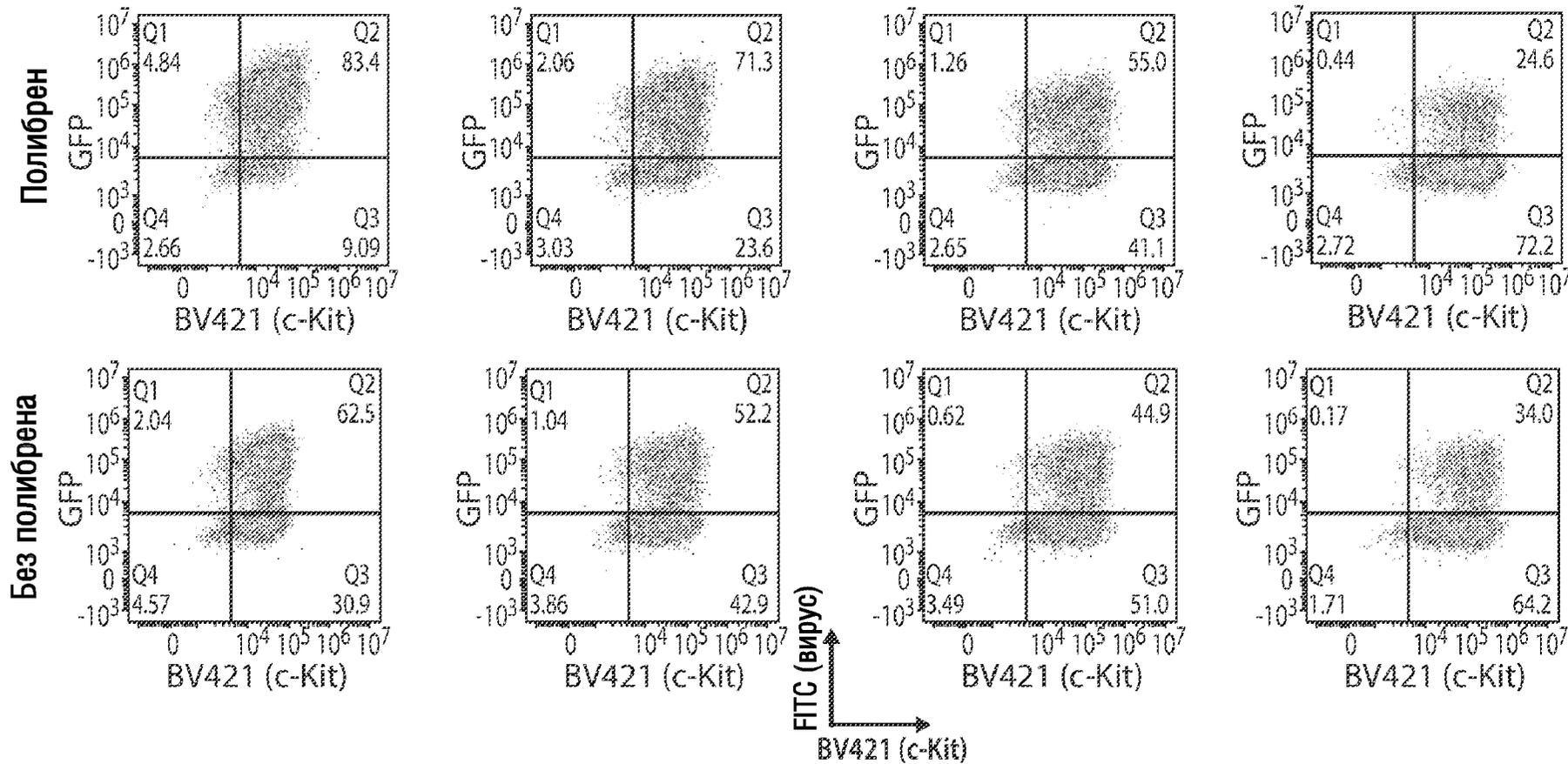


ФИГ.6

Клетки MC9: вирус mSCFa-IgG4Hinge-VSVd титруемая доза +/- полибрен

Объем вируса: 5 мкл

0.625 мкл

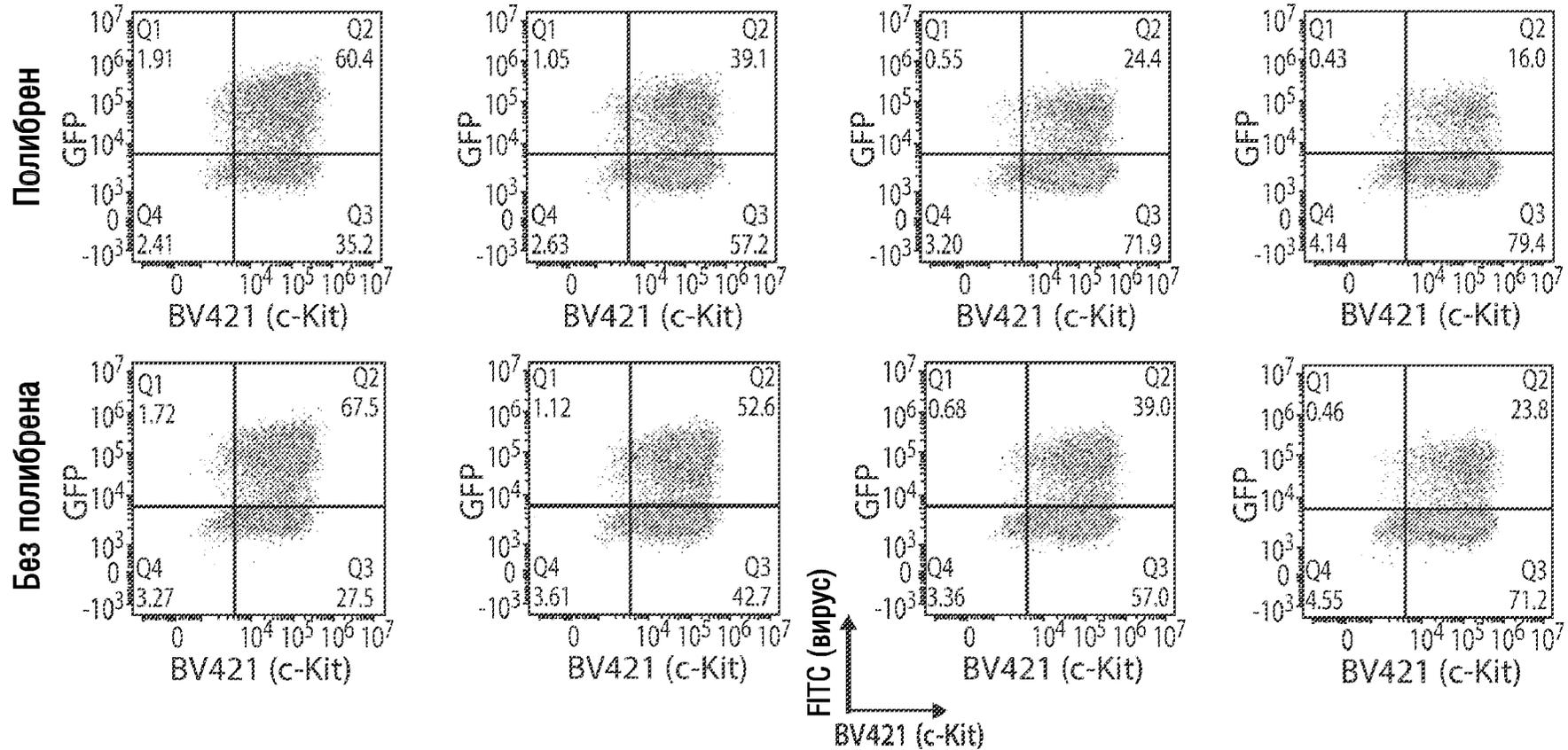


ФИГ.7

Клетки MC9: вирус m4-3a-IgG4Hinge-VSVd, титруемая доза +/- полибрен

Объем вируса: 5 мкл

0.625 мкл



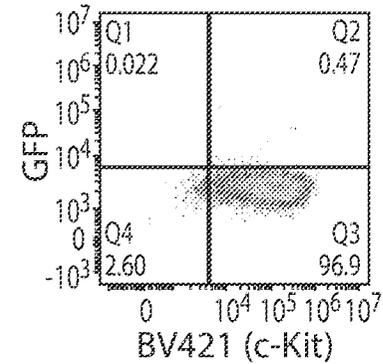
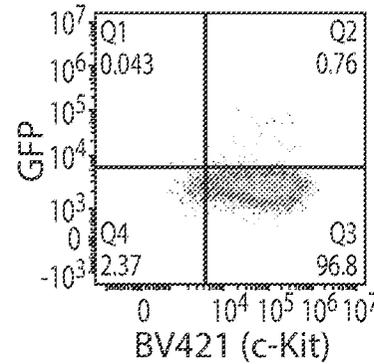
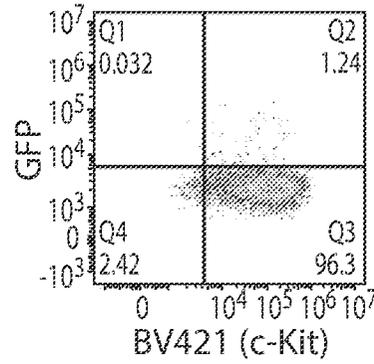
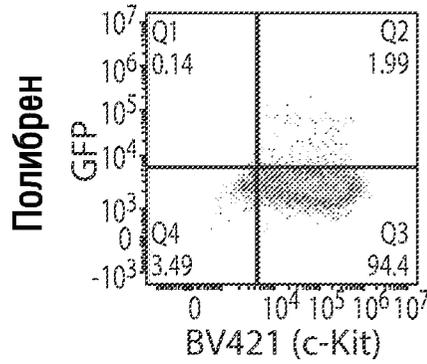
ФИГ.8

Контроль

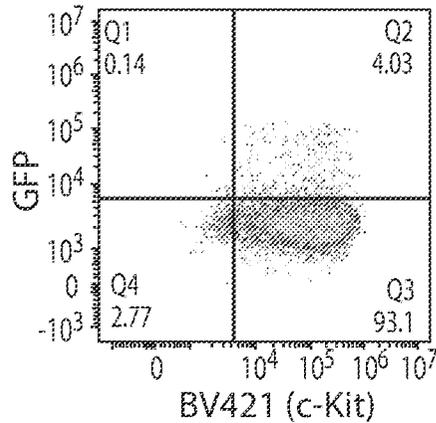
Клетки MC9: вирус mFLT3LG-IgG4Hinge-VSVd (нецелевой вирусный контроль),
титруемая доза +/- полибрен

Объем вируса: 5 мкл

0.625 мкл



Клетки MC9: вирус VSVd

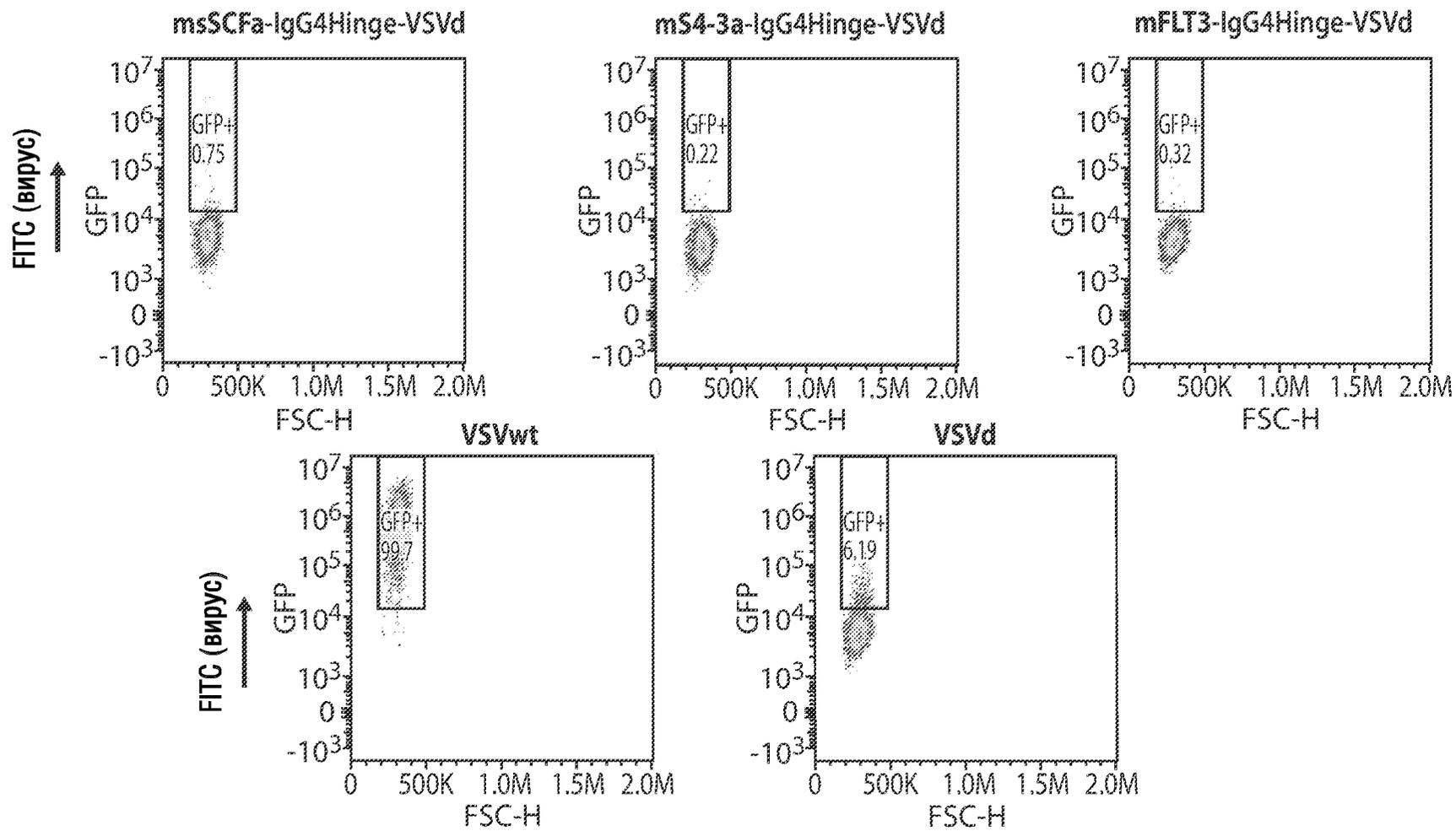


FITC (вирус)
BV421 (c-Kit)

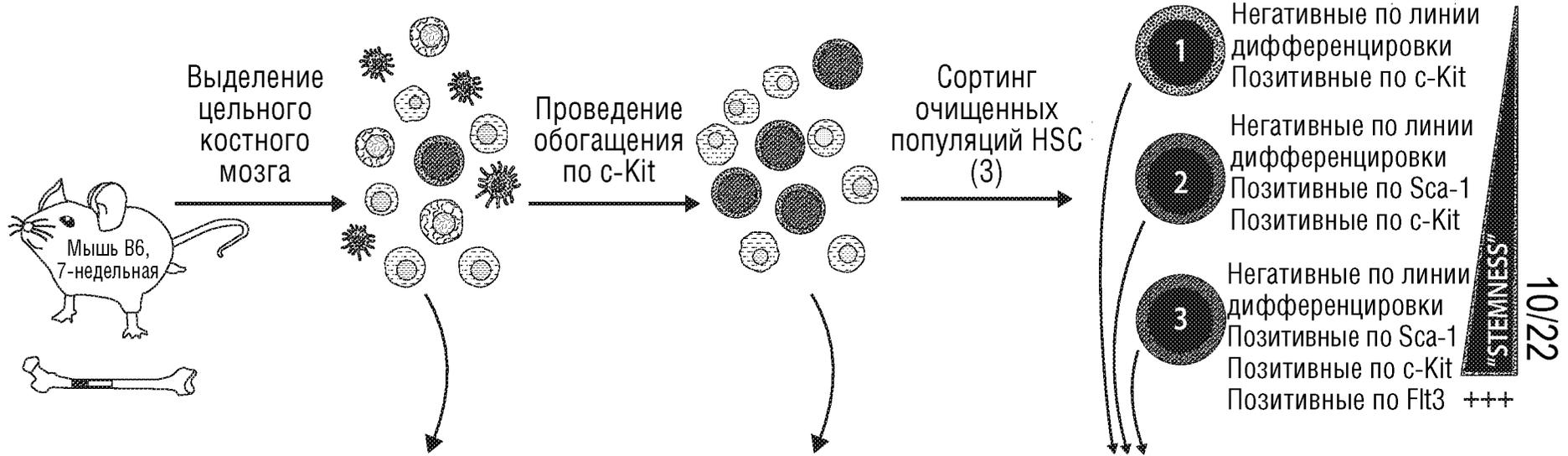
ФИГ.9

Контроль

Клетки J76 (VhCm): клетки, не экспрессирующие c-Kit



ФИГ.10



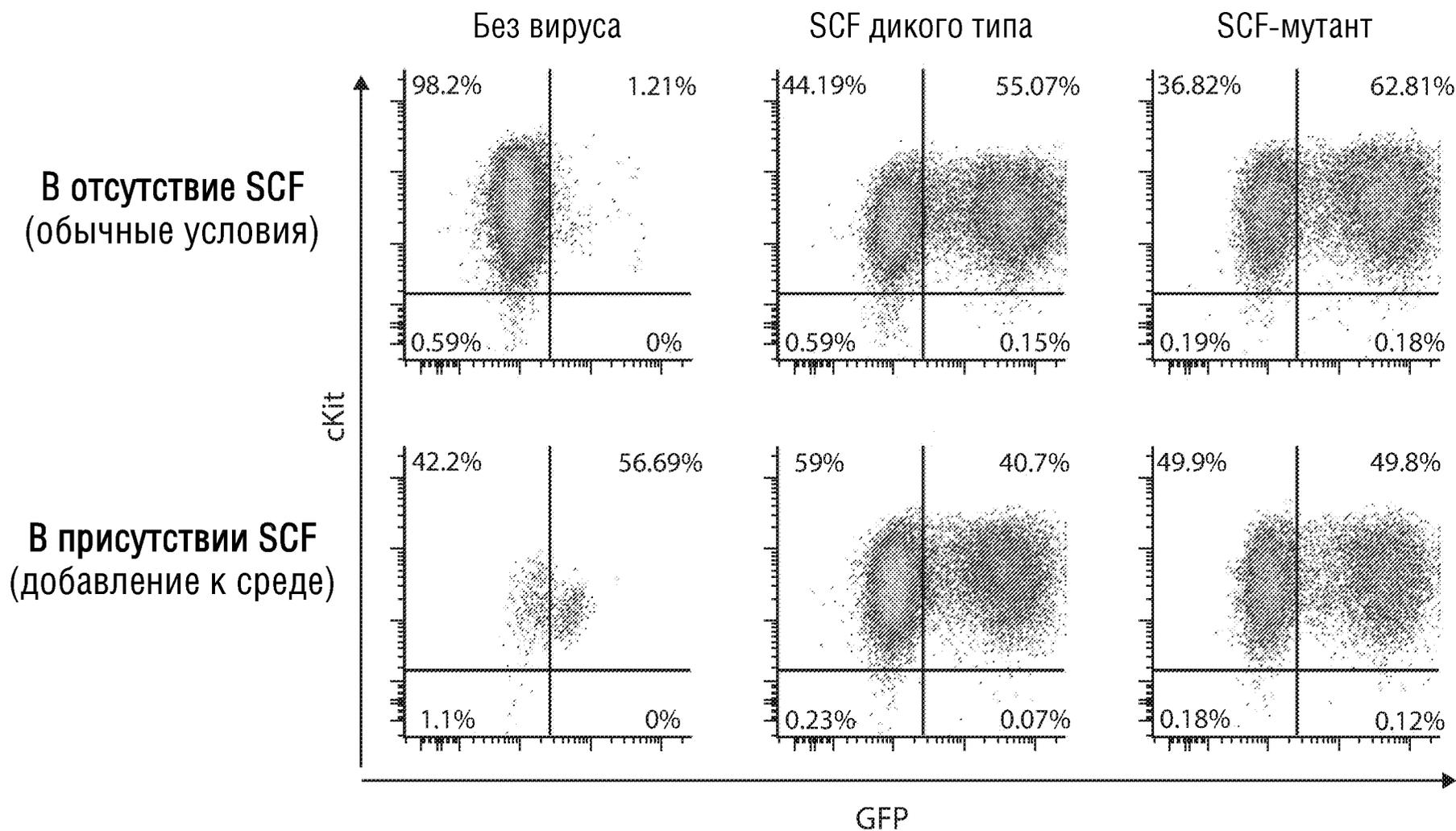
STEMCELLS
10/22

Условия культивирования

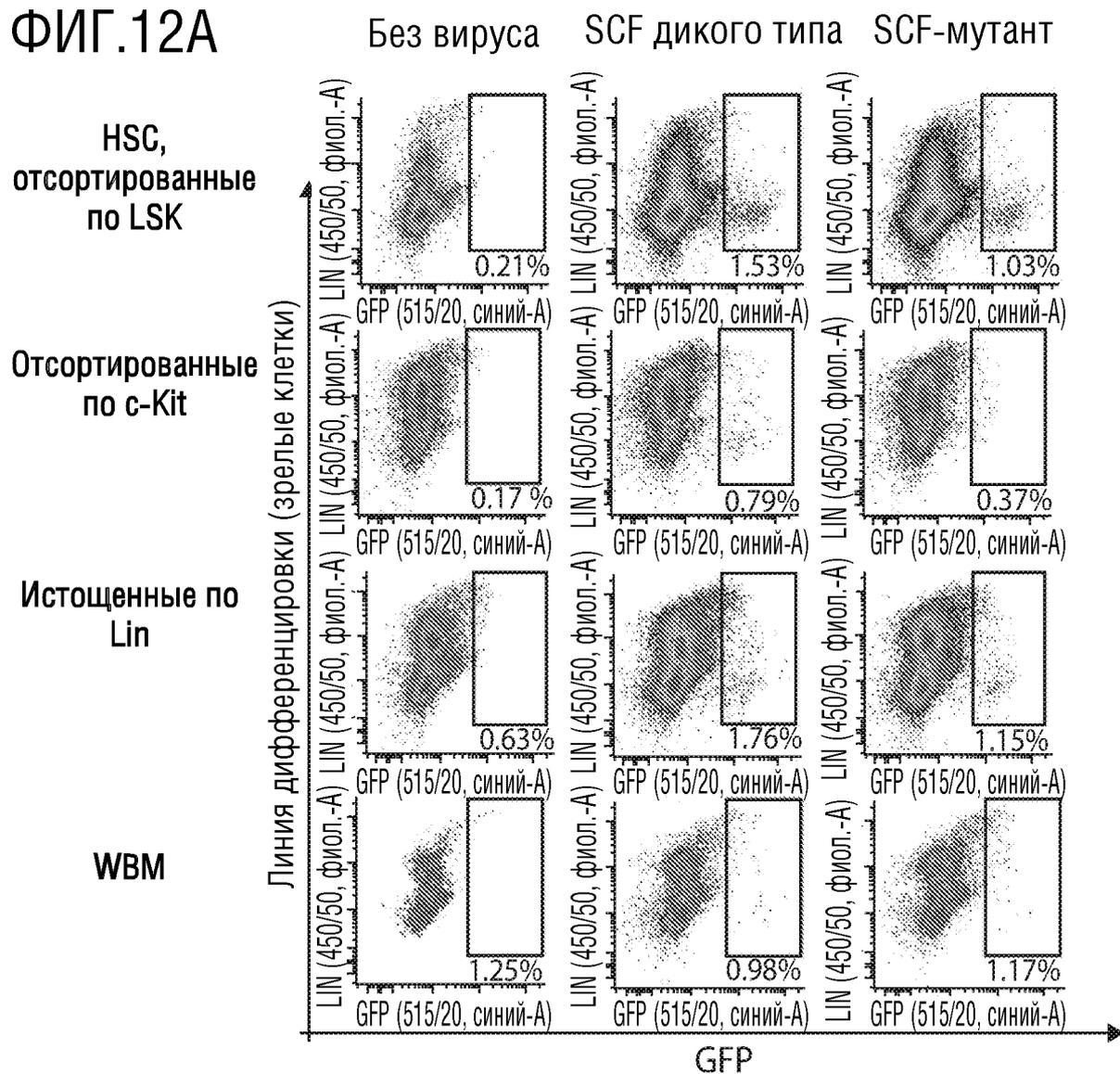
- 1) с полной средой, содержащей набор цитокинов
- 2) со средой, не содержащей одного цитокина

	Взятие аликвоты для тестирования на специфичность в WBM, клетки «HSC»:BM = 1:2000	Взятие аликвоты для тестирования на специфичность в популяции, обогащенной по c-Kit	Очищенные популяции для тестирования на эффективность
→			
→			

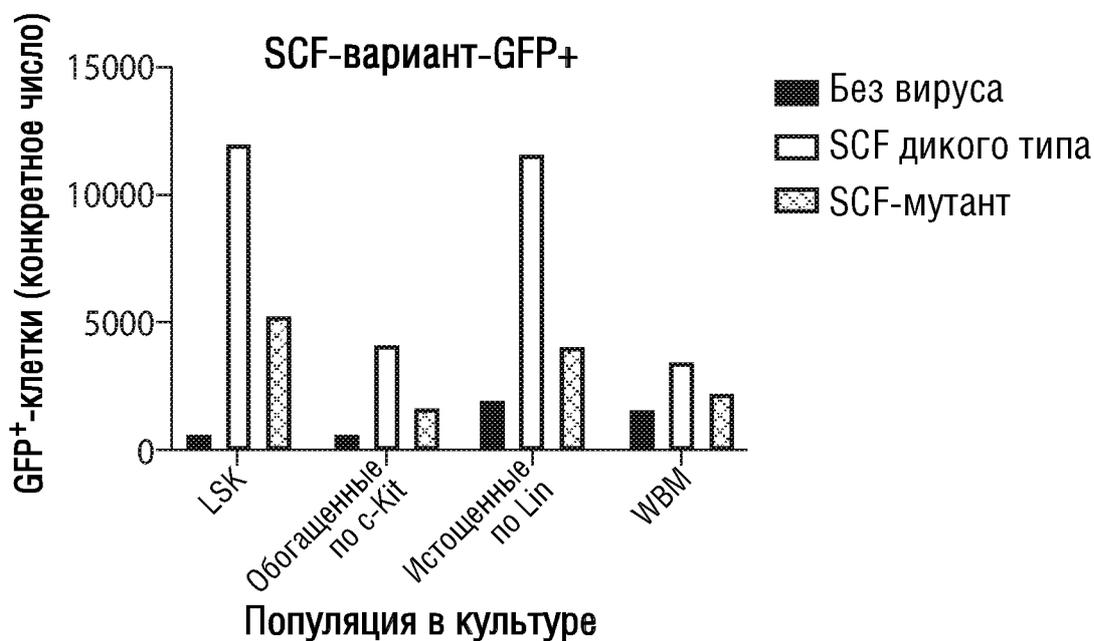
ФИГ.11



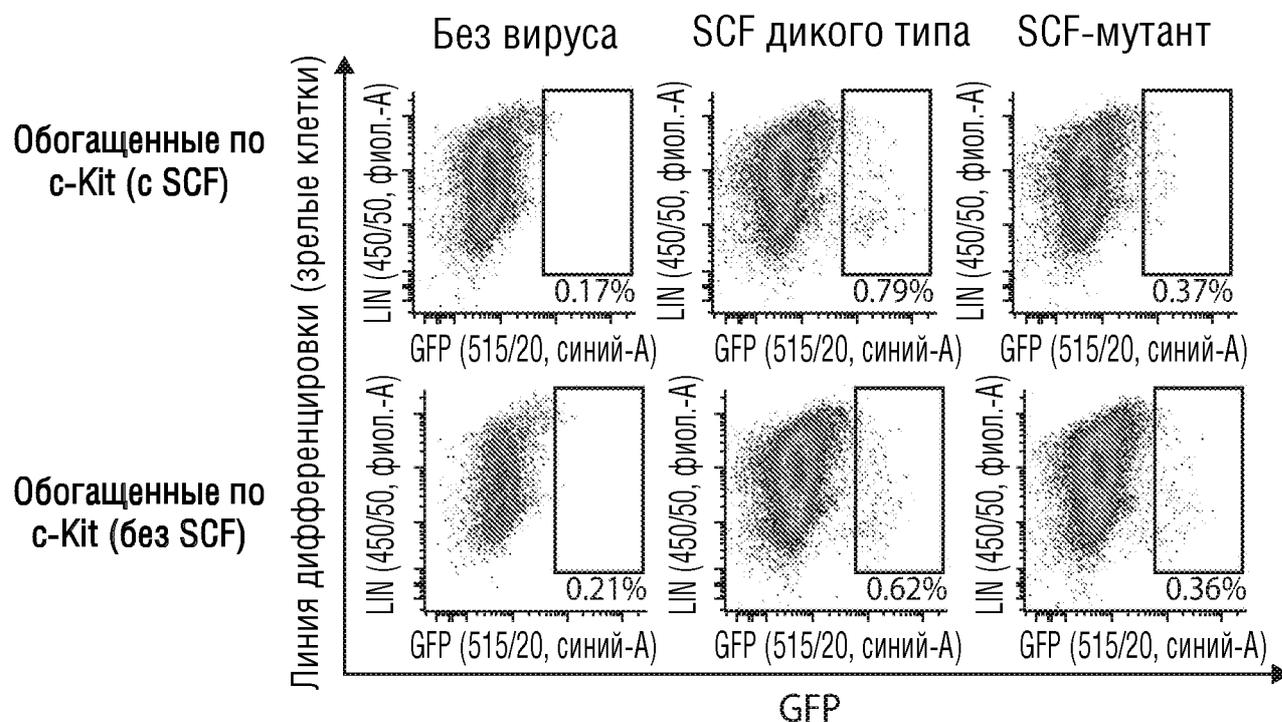
ФИГ.12А



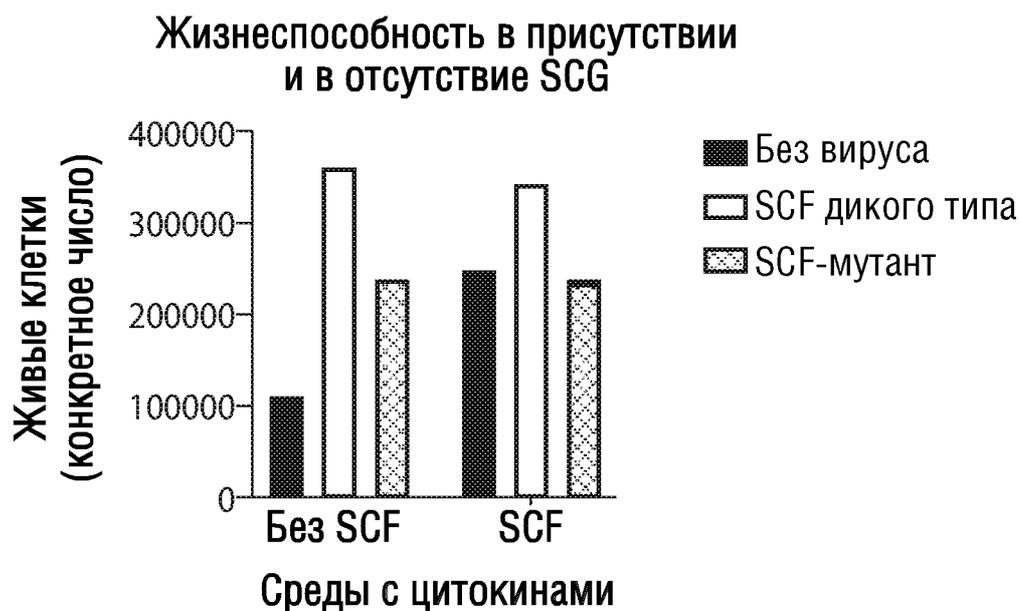
ФИГ.12В



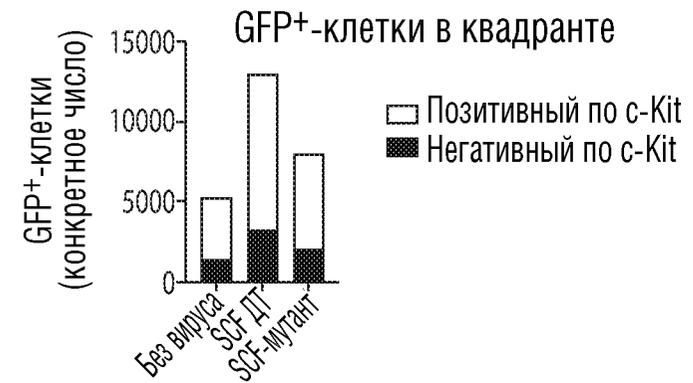
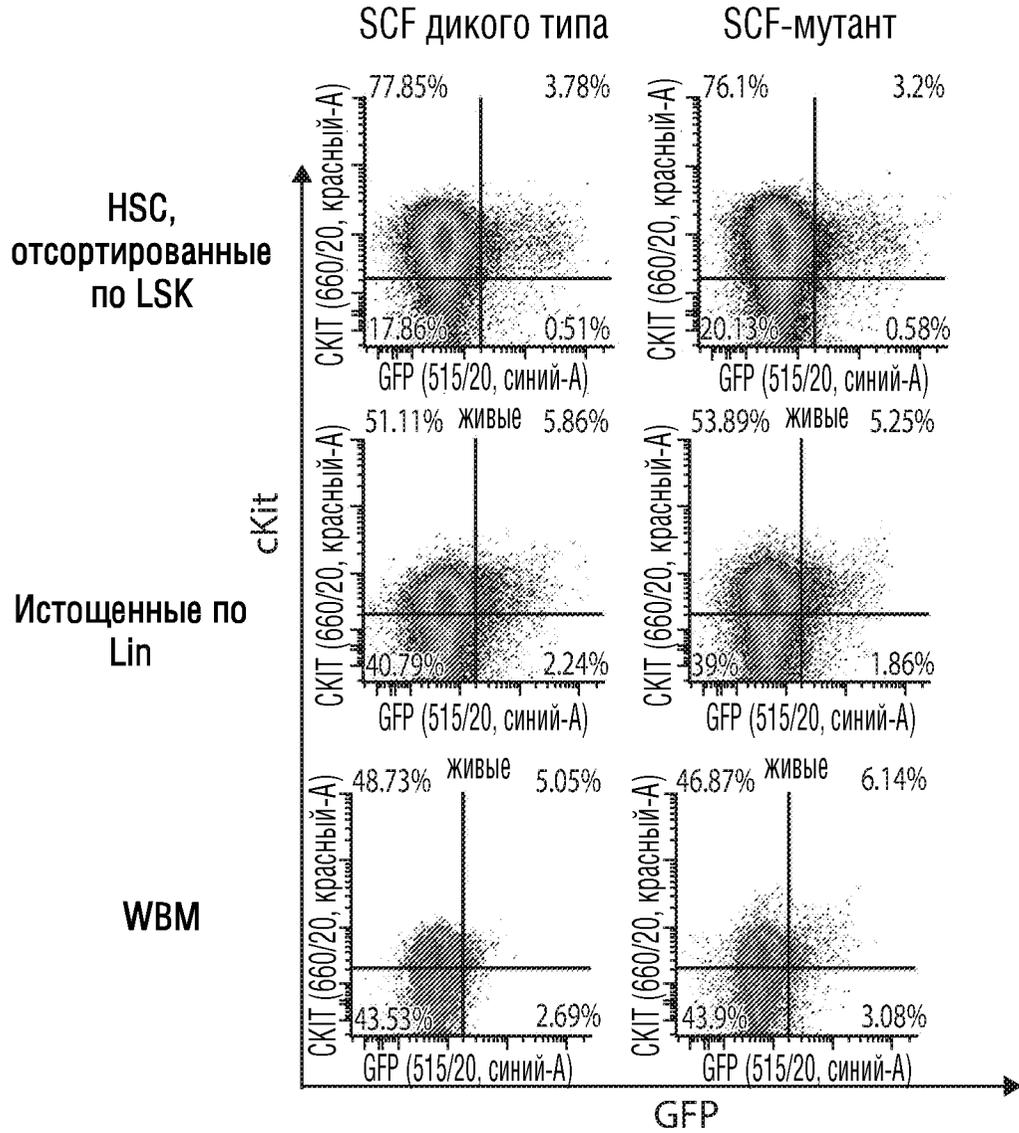
ФИГ.13А



ФИГ.13В

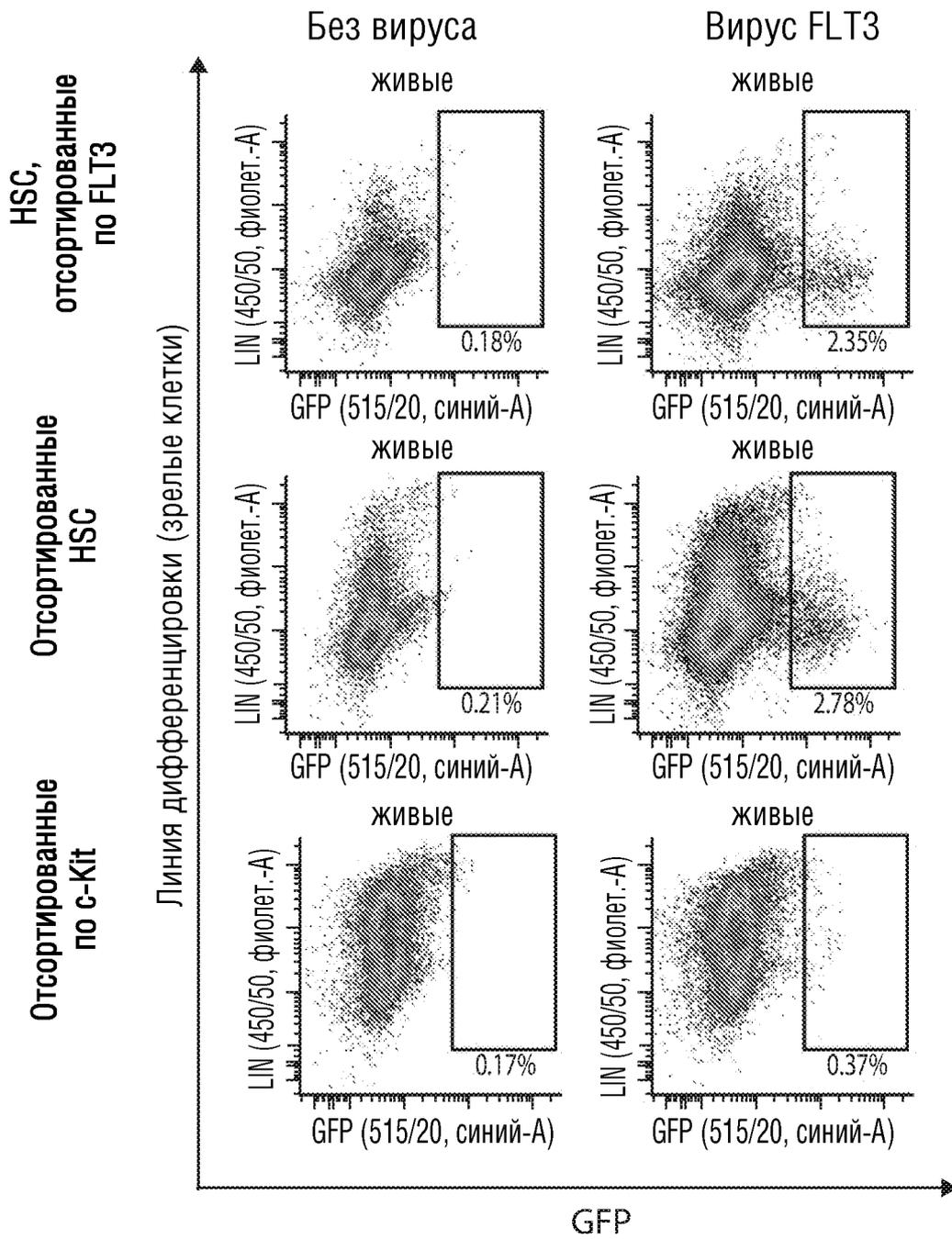


ФИГ.14

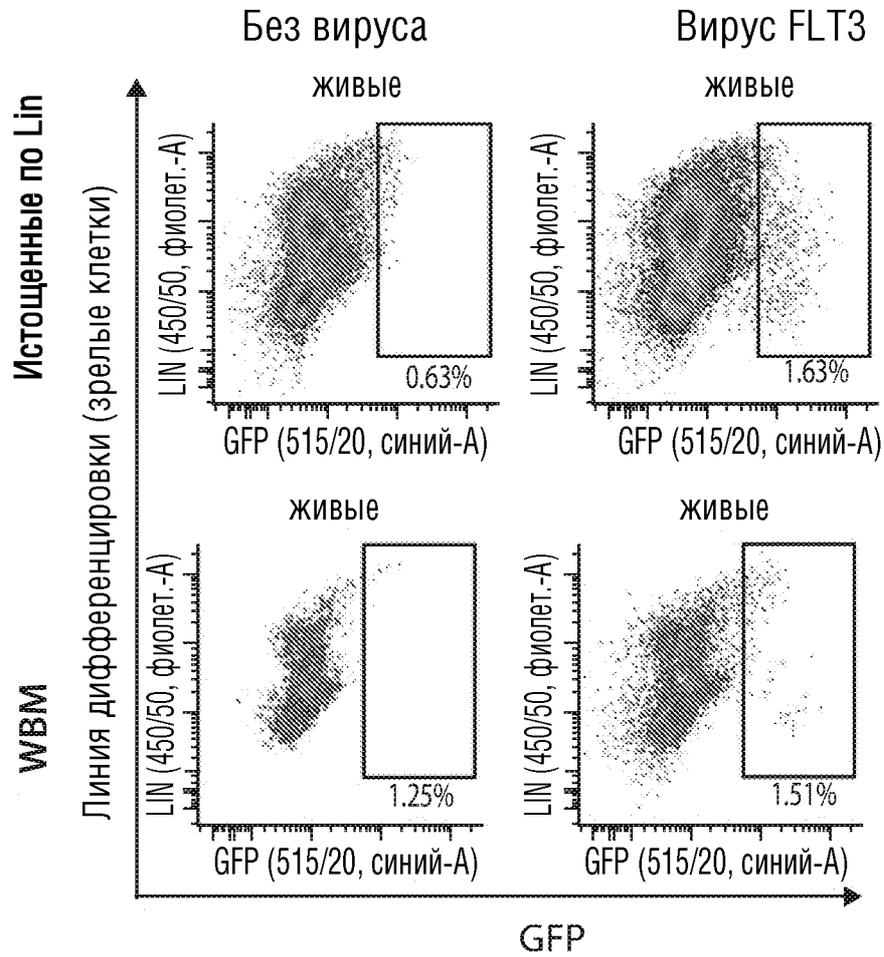


14/22

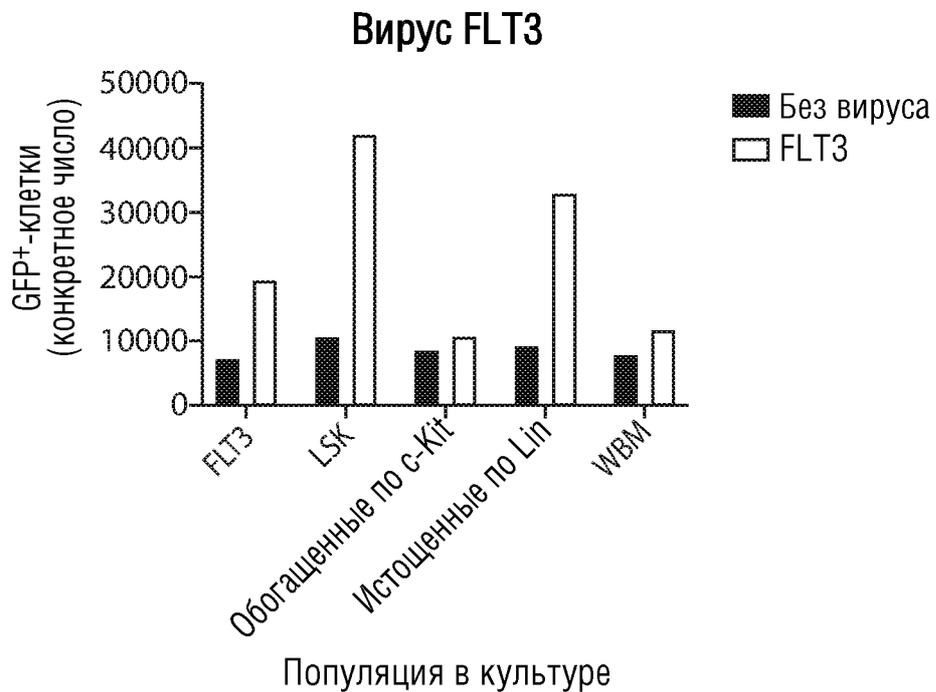
ФИГ.15А



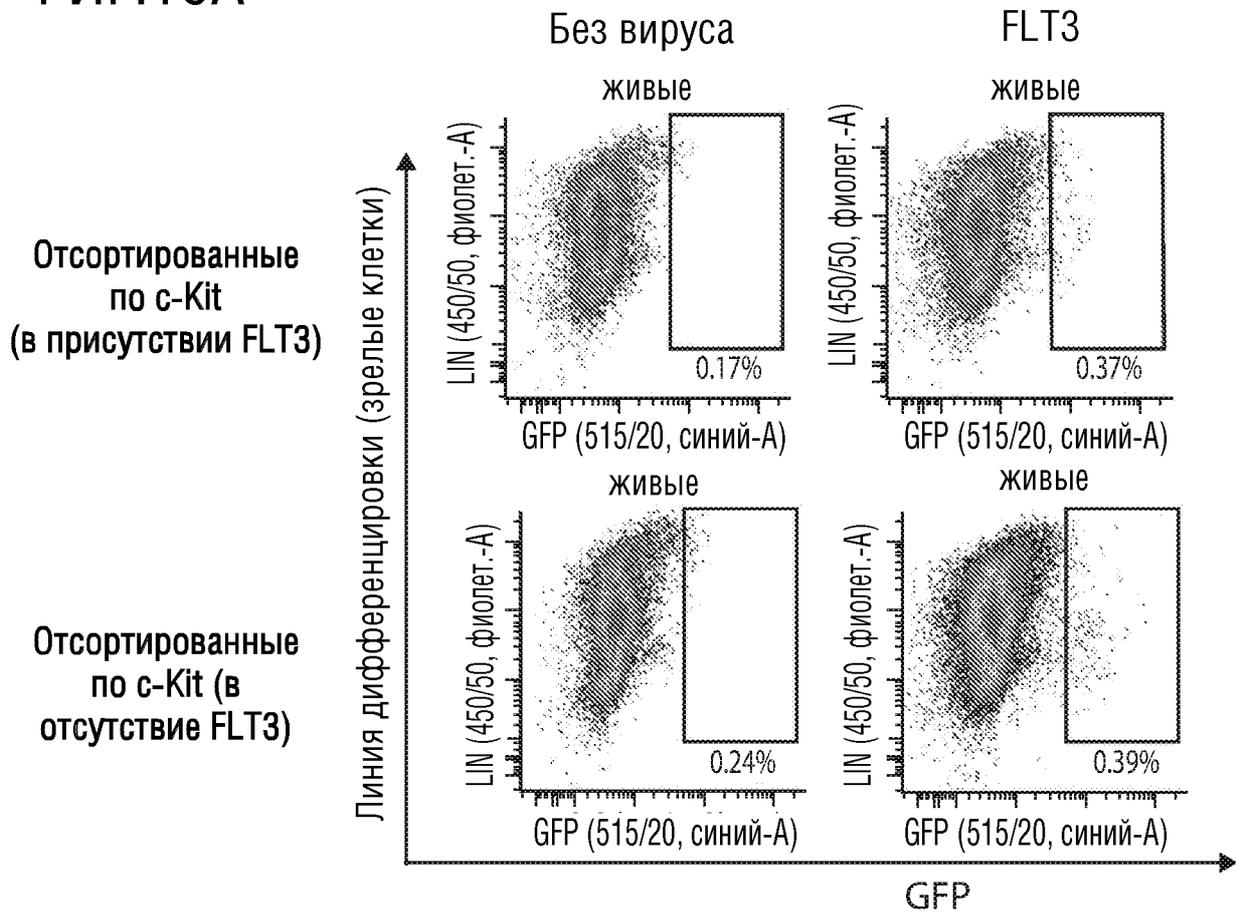
ФИГ.15В



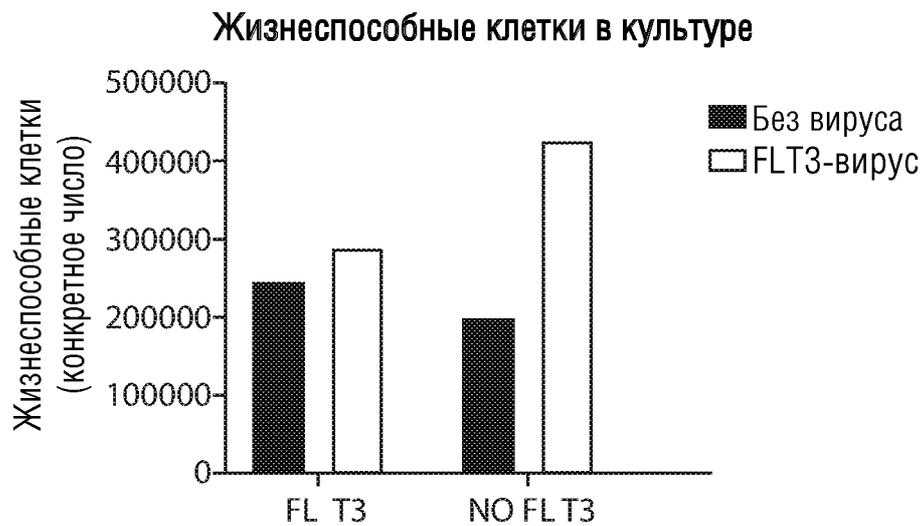
ФИГ.15С



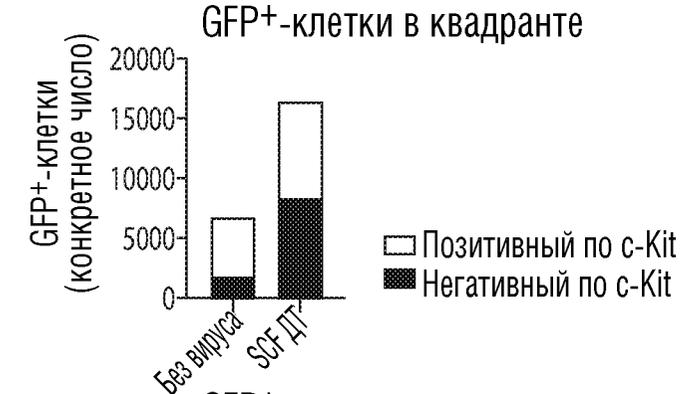
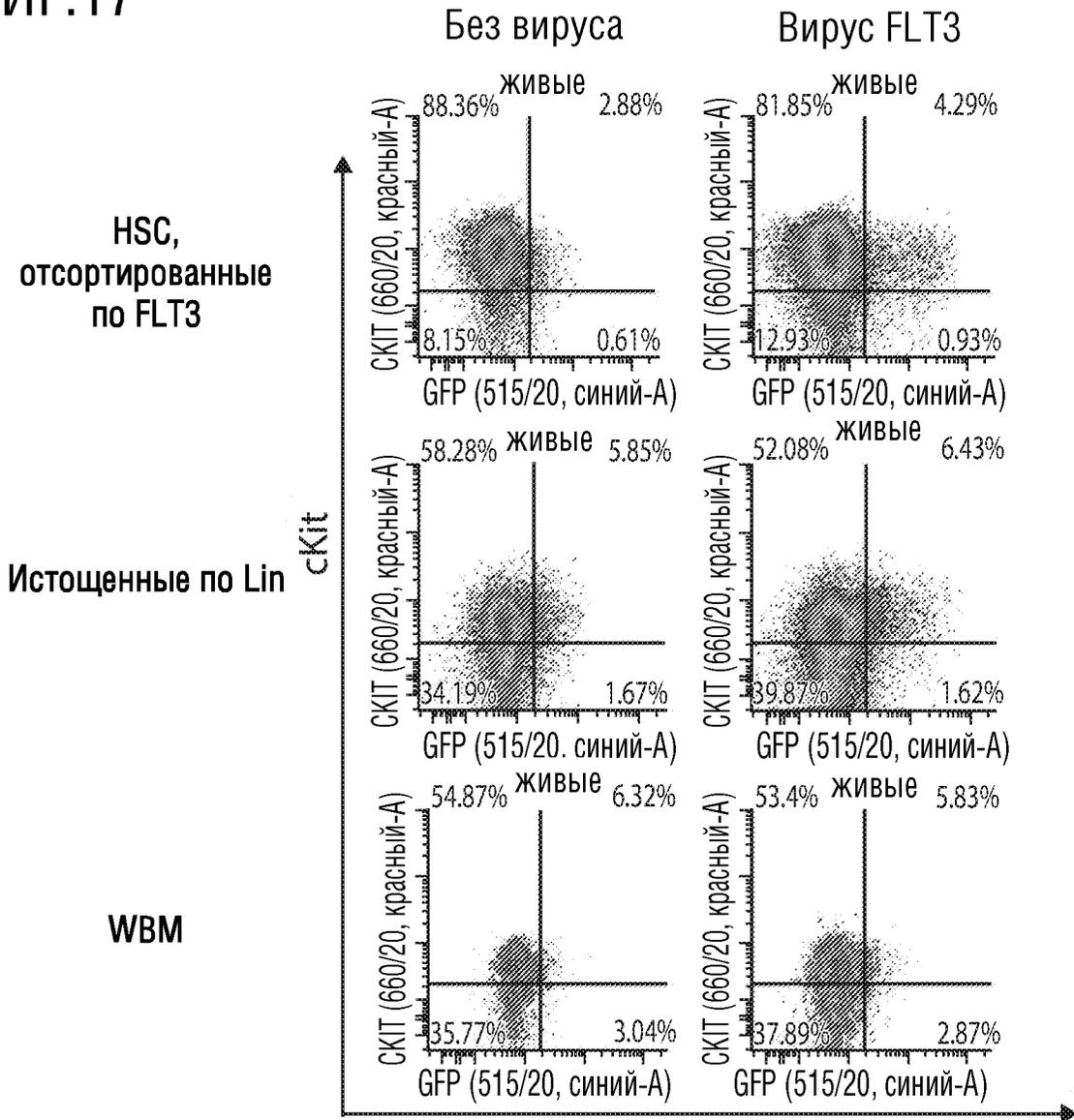
ФИГ.16А



ФИГ.16В



ФИГ.17



ФИГ.18А

>mS4-3a-trunc-pStalk-PDGFR, аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 28):

MKKTQTWIITCIYLQLLLFNPLVKTEICGDPVTDNVKDITKLVANLPNDYMITLNYVAGMDVLP SHCWLRDMVIQLSLS
 LTLLDKFSNISEGLSNYSIIHKLGIIVDDLFFCMEENAPKNIKEFPKRPETRSFTPEEFFSIFNRSIDAFKDFMVASDTSDCVL
SYPYDVPDYAASAVGQDTQEVIVVPHSLPFKVVVISAILALVVLTIIISLIILIMLWQKKPR*

Пояснения

Сигнальный пептид mSCF

mS4-3a-усеченная

Метка HA

Линкер+стебель PDGFR

Трансмембранный домен PDGFRβ

ФИГ.18В

>mFLT3LG-pStalk-PDGFR, аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 29):M

MTVLAPAWSPNSSLLLLLLLLSPCLRGTPDCYFSHSPISSNFKVKFRELDHLLKDYPVTVAVNLQDEKHCKALWSLFLAQ
 RWIEQLKTVAGSKMQTLLEDVNTIHFVTSCTFQPLPECLRFVQTNISHLLKDTCTQLLALKPCIGKACQNF SRCLEVQCQ
 PDSSTLLPPRSPIALEATELPEPRPRQYPYDVPDYAASAVGQDTQEVIVVPHSLPFKVVVISAILALVVLTIIISLIILIMLWQK
 KPR*

Пояснения

Сигнальный пептид лиганда mFLT3

Лиганд mFLT3

Метка HA

Линкер+стебель PDGFR

Трансмембранный домен PDGFRβ

ФИГ.18С

>mSCFa-trunc-pStalk-PDGFR, аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 32):

MKKTQTWIITCIYLQLLLFNPLVKTEICGNPVTDNVKDITKLVANLPNDYMITLNYVAGMDVLP SHCWLRDMVIQLSLS
 LTLLDKFSNISEGLSNYSIIDKLGKIVDDLVL CMEENAPKNIKESPKRPETRSFTPEEFFSIFNRSIDAFKDFMVASDTSDCV
LSYPYDVPDYAASAVGQDTQEVIVVPHSLPFKVVVISAILALVVLTIIISLIILIMLWQKKPR*

Пояснения

Сигнальный пептид mSCFa

mSCFa-усеченная

Метка HA

Линкер+стебель PDGFR

Трансмембранный домен PDGFRβ

ФИГ.18D

>mTPO-trunc-pStalk-PDGFR, аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 34):

MELTDLLLAAMLLAVARLTLSSPVAPACDPRLLNKLLRDSHLLHSRLSQCPDVPDPLSIPVLLPAVDFSLGEWKTQTEQSKA
 QDILGAVSLLLEGVMAARGQLEPSCLSLLGQLSGQVRLLLGALQGLLGTQLPLQGRTTANKDPNALFSLQQLLRGKVR
 FLLLVEGPTLCVRYPYDVPDYAASAVGQDTQEVIVVPHSLPFKVVVISAILALVVLTIISLIILIMLWQKKPR*

Пояснения

Сигнальный пептид mSCF

mTPO-усеченная

Метка HA

Линкер+стебель PDGFR

Трансмембранный домен PDGFRβ

ФИГ.18E

mS4-3a-IgG4hinge-PDGFR (SEQ ID NO: 36):

MKKTOTWIITCIYLOLLLFNPLVKKEICGDPVTDNVKDITKLVANLPNDYMITLNYVAGMDVLP SHCWLRDMVIQLSLS
 LTLLDKFSNISEGLSNYSIIHKLGIIVDDLFFCMEENAPKNIKEFPKRPETRSFTPEEFFSIFNRSIDAFKDFMVASDTSDCVL
 SYPYDVPDYAASESKYGPPCPPCPAVGQDTQEVIVVPHSLPFKVVVISAILALVVLTIISLIILIMLWQKKPR*

Пояснения

Сигнальный пептид mSCFa

mS4-3a-усеченная

Метка HA

Линкер+IgG4-шарнир

Трансмембранный домен PDGFRβ

ФИГ.18F

mFLT3LG-IgG4hinge-PDGFR (SEQ ID NO: 38):

MTVLAPAWSPNSSLLLLLLLLSPCLRGTPDCYFSHSPISSNFKVKFRELTDHLLKDYPVTVAVNLQDEKHCKALWSLFLAQ
 RWIEQLKTVAGSKMQTLLEDVNTEIHVFTSCTFQPLPECLRFVQTNISHLLKDTCTQLLALKPCIGKACQNF SRCLEVQCQ
 PDSSTLLPPRSPIALEATELPEPRPRQYPYDVPDYAASESKYGPPCPPCPAVGQDTQEVIVVPHSLPFKVVVISAILALVVL
 IISLIILIMLWQKKPR*

Пояснения

Сигнальный пептид лиганда mFLT3

Лиганд mFLT3

Метка HA

Линкер+IgG4-шарнир

Трансмембранный домен PDGFRβ

ФИГ.18G

mTPO-trunc-IgG4hinge-PDGFR (SEQ ID NO: 40):

MELTDLLLAAMLLAVARLTLSSPVAPACDPRLLNKLLRDSHLLHSRLSQCPDVPDPLSIPVLLPAVDFSLGEWKTQTEQSKA
 QDILGAVSLLLEGVMAARGQLEPSCLSSLLGQLSGQVRLLLGALQGLLGTQLPLQGRTTAHKDPNALFLSLQQLLRGKVR
 FLLLVEGPTLCVRYPYDVPDYAAASESKYGPPCPPCPAVGQDTQEVIVVPHSLPFKVVVISAILALVVLTIISLIILIMLWQKKP
 R*

Пояснения

Сигнальный пептид mTPO

mTPO-усеченная

Метка HA

Линкер+IgG4-шарнир

Трансмембранный домен PDGFRβ

ФИГ.18H

>mSCFa-IgG4hinge-PDGFR (SEQ ID NO: 42):

MKKTQTWIITCIYLQLLLFNPLVKTKEICGNPVTDNVKDITKLVANLPNDYMITLNYVAGMDVLP SHCWL RDMVIQLSLS
 LTTLLDKFSNISEGLSNYSIIDKLGKIVDDLVL CMEENAPKNIKESPKRPETRSFTPEEFFSIFNRSIDAFKDFMVASDTSDCV
 LSYPYDVPDYAAASESKYGPPCPPCPAVGQDTQEVIVVPHSLPFKVVVISAILALVVLTIISLIILIMLWQKKPR*

Пояснения

Сигнальный пептид mSCFa

mSCFa-усеченная

Метка HA

Линкер+IgG4-шарнир

Трансмембранный домен PDGFRβ

ФИГ.19A

hSCFa-trunc-pStalk-PDGFR (SEQ ID NO: 44):

MKKTQTWILTCIYLQLLLFNPLVKT^{EGICRNRVTNNVKDVT}KL VANLPKDYMITLKYVPGMDVLP SHCWISEM VVQLSD
 SLTDLLDKFSNISEGLSNYSIIDKLVNIVDDLVECVKENSSKDLKKSFKSPEPRLFTPEEFFRIFNRSIDAFKDFVVASETSDCV
 VSYPYDVPDYAAASAVGQDTQEVIVVPHSLPFKVVVISAILALVVLTIISLIILIMLWQKKPR*

Пояснения

Сигнальный пептид hSCF

hSCFa-усеченная

Метка HA

Линкер+стебель PDGFR

Трансмембранный домен PDGFRβ

ФИГ.19В

hSCFa-trunc-IgG4hinge-PDGFR (SEQ ID NO: 46):

MKKTQTWILTCIYLQLLLNFNPLVKTEGICRNRVTNNVKDVTKLVANLPKDYMILKYVPGMDVLP SHCWISEM VVQLSD
SLTDLLDKFSNISEGLSNYSIIDKLVNIVDDLVECVKENSSKDLKKSFKSPEPRLFTPEEFFRIFNRSIDAFKDFVVASETSDCV
VSYPYDVPDYAASAVGQDTQEVIVVPHSLPFKVVVISAILALVVLTIISLILIMLWQKKPR*

Пояснения

Сигнальный пептид hSCF

hSCFa-усеченная

Метка HA

Линкер+IgG4-шарнир

Трансмембранный домен PDGFRβ

ФИГ.19С

hFLT3LG-trunc-IgG4hinge-PDGFR (SEQ ID NO: 48):

MTVLAPAWSPTTYLLLLLLLSSGLSGTQDCSFQHSPISSDFAVKIRELSDYLLQDYPVTVASNLDDEELCGGLWRLVLAQR
WMERLKT VAGSKMQLLERVNTEIH FVTKCAFQPPPSCLRFVQTNISRLQETSEQLVALKPWITRQNF SRCLELQCQP
DSSTLPPPWSPRPLEATAPTAQPYYPYDVPDYAASESKYGPPCPPCPAVGQDTQEVIVVPHSLPFKVVVISAILALVVLTI
SLIILIMLWQKKPR*

Пояснения

Сигнальный пептид лиганда hFLT3

hFLT3-усеченная

Метка HA

Линкер+IgG4-шарнир

Трансмембранный домен PDGFRβ

ФИГ.19D

hFLT3LG-pStalk-PDGFR (SEQ ID NO: 50):

MTVLAPAWSPTTYLLLLLLLSSGLSGTQDCSFQHSPISSDFAVKIRELSDYLLQDYPVTVASNLDDEELCGGLWRLVLAQR
WMERLKT VAGSKMQLLERVNTEIH FVTKCAFQPPPSCLRFVQTNISRLQETSEQLVALKPWITRQNF SRCLELQCQP
DSSTLPPPWSPRPLEATAPTAQPYYPYDVPDYAASAVGQDTQEVIVVPHSLPFKVVVISAILALVVLTIISLILIMLWQKKP
R*

Пояснения

Сигнальный пептид лиганда hFLT3

hFLT3-усеченная

Метка HA

Линкер+стебель PDGFR

Трансмембранный домен PDGFRβ