

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202490247** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2024.08.30

(51) Int. Cl. *C12N 15/63* (2006.01)
C12N 15/79 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2018.10.19

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

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

(32) **2017.10.20; 2017.11.01; 2018.01.29**

(33) **US**

(62) **202090990; 2018.10.19**

(71) Заявитель:
**ФРЕД ХАТЧИНСОН КЭНСЕР
СЕНТЕР (US)**

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

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

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

202490247
A1

202490247

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-580312EA/072

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

ПЕРЕКРЕСТНЫЕ ССЫЛКИ НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] Данная заявка испрашивает приоритет по предварительной заявке на патент США № 62/575275, поданной 20 октября 2017 г., по предварительной заявке на патент США № 62/580303, поданной 1 ноября 2017 г., и предварительной заявке на патент США № 62/623371, поданной 29 января 2018 г., каждая из которых включена в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме, как если бы она была полностью изложена в данном документе.

ЗАЯВЛЕНИЕ ОТНОСИТЕЛЬНО СПИСКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

[0002] Перечень последовательностей, связанный с данной заявкой, предоставляется в текстовом формате вместо бумажной копии и тем самым включается посредством ссылки в данное описание. Имя текстового файла, содержащего список последовательностей, 18-024-WO-РСТ_ST25.txt. Текстовый файл размером 184 КБ был создан 19 октября 2018 года и был подан в электронном виде через EFS-Web.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[0003] В настоящем раскрытии предложены системы и способы генетической модификации В-клеток для экспрессии выбранных антител. Системы и способы могут быть использованы для: устранения необходимости классической вакцинации; обеспечения защиты от инфекционных агентов, для которых в настоящее время нет вакцин; обеспечения защиты от инфекционных агентов, в случае иммуносупрессированных пациентов; и/или обеспечения пользы, обеспечиваемой терапевтическими антителами, например, при лечении аутоиммунных расстройств.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0004] Вакцины предназначены для повышения иммунитета субъекта против конкретной инфекции путем стимулирования В-клеток для выработки антител против целевого инфекционного агента. Рутинная детская вакцинация представляет собой давно установленное клиническое вмешательство со сравнительно низким риском и высокой эффективностью. К сожалению, однако, вакцины доступны не для всех инфекционных агентов. Например, каждый год в Соединенных Штатах миллионы детей посещают врача или отделение неотложной помощи из-за инфекций респираторно-синцитиальным вирусом (РСВ).

[0005] В течение десятилетий исследователи пытались разработать вакцину, способную побудить В-клетки вырабатывать антитела, эффективные для защиты от вирусов, таких как РСВ, вирус иммунодефицита человека (ВИЧ) и вирус Зика. Но все попытки стимулировать выработку защитных антител провалились. Единственная широко протестированная вакцина против РСВ фактически усугубила инфекцию: антитела,

выработанные после вакцинации, не обезвредили вирус, а повысили его способность заражать клетки. Помимо вируса РСВ, ВИЧ и вируса Зика, существует ряд других инфекционных агентов, для которых не существует эффективных вакцин.

[0006] В дополнение к борьбе с инфекциями антитела также могут быть полезны в качестве лечения других состояний, таких как аутоиммунные заболевания. Однако эти терапии на основе антител обычно требуют повторных инъекций антител для поддержания защиты.

[0007] Также следует отметить, что многочисленные пациенты подвергаются пересадке костного мозга или гематопозитических стволовых клеток в качестве лечения гематологических злокачественных новообразований (например, лейкоза, лимфомы, миеломы). Другие пациенты получают инфузии генетически модифицированных гематопозитических стволовых клеток, которые обеспечивают наличие терапевтического гена, которого нет у пациента. Все эти способы лечения требуют, чтобы существующая иммунная система пациента была удалена до введения трансплантата или генетически модифицированных гематопозитических стволовых клеток, оставляя опасное окно подавленного иммунитета до того, как иммунная система пациента вновь заработает после лечения. В этот момент времени, пациенты с подавленным иммунитетом невероятно восприимчивы к инфекциям, таким как РСВ, грипп, парагрипп и метапневмовирус (МПВ). Эти инфекции являются фактором высокого риска и связаны с многочисленными летальными исходами после указанного лечения.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0008] В настоящем раскрытии предложены системы и способы генетической модификации В-клеток для экспрессии выбранных антител. В конкретных вариантах осуществления выбранные антитела уменьшают или устраняют необходимость в существующих вакцинах. В конкретных вариантах осуществления выбранные антитела защищают от инфекции от вирусов, для которых в настоящее время отсутствуют эффективные стратегии вакцинации (например, РСВ, ВИЧ, вирус Зика). В конкретных вариантах осуществления выбранные антитела уменьшают или устраняют необходимость в терапевтических инъекциях антител, таких как вводимые для лечения различных аутоиммунных расстройств. В конкретных вариантах осуществления выбранные антитела защищают иммуносупрессированных пациентов от инфекций. В конкретных вариантах осуществления способы раскрытия могут быть использованы для перепрограммирования В-клеток для защиты от сотен различных инфекционных агентов или патогенов, все посредством одной лабораторной манипуляции, занимающей несколько суток.

[0009] В конкретных вариантах осуществления настоящее раскрытие обеспечивает эти преимущества посредством целенаправленной вставки генетической конструкции в конкретную область эндогенного генома В-клетки. Важно отметить, что генетическая модификация В-клеток затруднена из-за высокой вариабельности генетических последовательностей в этих клетках, которая необходима для разнообразия антител. Эта высокая степень генетической вариабельности делает нецелесообразным

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

[0010] Дополнительные проблемы, касающиеся генетически модифицированных В-клеток для экспрессии выбранных антител, возникают из-за того, что антитела образуются из отдельных белковых единиц, называемых тяжелыми цепями и легкими цепями. Разные цепи кодируются различными частями генома В-клеток, но должны объединяться для образования функционирующего антитела.

[0011] Настоящее раскрытие преодолевает отмеченные проблемы, среди прочего, путем идентификации константной области генома В-клетки, которая может быть надежно нацелена для генетической вставки, и которая, будучи модифицированной, приводит к преимущественной экспрессии вставленной генетической конструкции по сравнению с соответствующими областями естественного генома В-клетки. Эта стратегия преодолевает вариабельность последовательности, связанную с геномом В-клеток, а также устраняет необходимость удалять и заменять части эндогенного генома В-клеток для достижения функциональной экспрессии выбранного антитела. Преодоление необходимости удалять и заменять части эндогенного генома В-клетки сохраняет функцию В-клеток после генетических манипуляций.

[0012] В конкретных вариантах осуществления отмеченная область, нацеленная для генетической вставки, представляет собой интронную область выше или ниже от элемента энхансера E μ SEQ ID NO: 85 (человека) или SEQ ID NO: 86 (мышь). В конкретных вариантах осуществления область, нацеленная для генетической вставки, представляет собой константную интронную область, выбранную из SEQ ID NO: 1 или 2 (человека) или SEQ ID NO: 3 или 4 (мышь). В конкретных вариантах осуществления последовательности ДНК человека в SEQ ID NO: 1 нацеленные для генетической вставки включают SEQ ID NO: 5-24. В конкретных вариантах осуществления последовательности ДНК человека в SEQ ID NO: 2 нацеленные для генетической вставки включают SEQ ID NO: 25-44. В конкретных вариантах осуществления последовательности ДНК мыши в SEQ ID NO: 3 нацеленные для генетической вставки включают SEQ ID NO: 45-64. В конкретных вариантах осуществления последовательности ДНК мыши в SEQ ID NO: 4 нацеленные для генетической вставки включают SEQ ID NO: 65-84. Генетические последовательности, особенно таковые, которые способны нацеливаться на эти сайты для генетической модификации, описаны в настоящем описании в виде направляющей РНК (нРНК) SEQ ID NO: 87-89 и 290-366.

[0013] В конкретных вариантах осуществления размещение и компоненты вставленной генетической конструкции приводят к преимущественной экспрессии вставленной генетической конструкции по сравнению с соответствующими частями эндогенного генома В-клетки. Эти варианты осуществления также включают элементы, которые преодолевают проблемы, связанные с областями антител, кодируемыми различными участками эндогенного генома В-клеток.

[0014] В конкретных вариантах осуществления генетические конструкции вставлены в одну из SEQ ID NO: 1, 2, 3 и 4 и включают (i) промотор; (ii) сигнальный пептид; (iii) трансген, кодирующий всю легкую цепь выбранного антитела; (iv) гибкий линкер или пропускающий элемент; (v) вариабельную область тяжелой цепи выбранного антитела; и (vi) границу сплайсинга, которая приводит к экспрессии эндогенной константной области тяжелой цепи В-клетки. В этих вариантах осуществления экспрессия выбранного антитела в виде единой конструкции преодолевает проблемы, связанные с областями антител, кодируемыми различными участками эндогенного генома В-клеток. Включение гибкого линкера физически связывает область легкой цепи и область тяжелой цепи экспрессируемого выбранного антитела таким образом, что это позволяет им образовывать функциональную единицу и в то же время снижает риск связывания частей антитела с другим потенциально экспрессируемыми цепями антитела из эндогенного генома В-клетки. Использование пропускающего элемента физически не связывает область легкой цепи и область тяжелой цепи, но его экспрессия в непосредственной близости также приводит к ассоциации с образованием функциональной единицы, в то же время снижая риск связывания областей антитела с другими потенциально экспрессируемыми цепями антитела из эндогенного генома В-клетки. Включение границы сплайсинга приводит к выбранному антителу, включающему константную область тяжелой цепи, соответствующую текущему состоянию активации и/или созревания В-клетки. Другими словами, выбранные экспрессированные антитела могут быть экспрессированы с использованием любой из эндогенных константных областей тяжелой цепи В-клетки, и константная область тяжелой цепи, экспрессируемая с выбранным антителом, может естественным образом изменяться со временем.

[0015] В настоящем раскрытии также предложены способы, гарантирующие, что только В-клетки, которые были эффективно генетически модифицированы для экспрессии выбранного антитела, собираются для составления и введения пациентам. Например, перед генетической модификацией В-клетка будет естественно экспрессировать антитела, которые включают либо легкую цепь каппа, либо легкую цепь лямбда. В-клетка может быть модифицирована для экспрессии легкой цепи, которая отличается от цепи каппа или лямбда, которую она естественным образом экспрессирует, и только те В-клетки, которые экспрессируют замещающую цепь, отбираются для составления и введения.

[0016] В настоящем раскрытии также предложены многочисленные дополнительные стратегии для эффективной модификации В-клеток для обеспечения преимуществ, описанных в данном документе. Эти и другие стратегии описаны более подробно в подробном описании ниже.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0017] Фиг. 1. Схема ответа В-клеток на классические стратегии вакцинации.

[0018] Фиг. 2А-2С. Схемы известных стратегий вакцинации против респираторно-синцитиального вируса (РСВ): (Фиг. 2А) инактивированная формалином вакцина против РСВ; (Фиг. 2В) «улучшенные» вакцины против РСВ; и (Фиг. 2С) эпитопная каркасная

вакцина против РСВ.

[0019] Фиг. 3А-3С. Резюме предыдущих усилий по обходу вакцинации и непосредственному введению защитных антител против РСВ: (Фиг. 3А) инъекция паливизумаба; (Фиг. 3В) аденовирус-опосредованная экспрессия паливизумаба; и (Фиг. 3С) генетическая модификация и дифференцирование стволовых клеток.

[0020] Фиг. 4А, 4В. Схемы для конкретных вариантов осуществления стратегий защиты, раскрытых в настоящем документе: (Фиг. 4А) модификация В-клетки для защиты от РСВ; и (Фиг. 4В) стратегия одновременной защиты.

[0021] Фиг. 5. Предполагаемая секреция паливизумаба подтипами В-клеток при наличии и отсутствии инфекции.

[0022] Фиг. 6А, 6В. Структура (Фиг. 6А) генов антител и (Фиг. 6В) белков антител, что подчеркивает техническую проблему описания: антитела представляют собой белки, полученные из двух отдельных генных продуктов. В конкретных вариантах осуществления синтетические генетические конструкции, кодирующие выбранные антитела, раскрытые в настоящем документе, используют пропускающие элементы (например, саморасщепляющиеся пептиды) для решения этой проблемы.

[0023] Фиг. 7. Схема, изображающая эндогенный локус гена тяжелой цепи, включая сегменты V, D и J, которые рекомбинируют, энхансерные элементы, показанные в виде круга и овала, и 6 потенциальных константных областей, которые могут быть экспрессированы. В-клетки начинают с экспрессии константных областей μ/δ , но могут переключаться на использование константных областей γ , α или ϵ путем удаления промежуточной ДНК. Также обратите внимание, что каждый V-сегмент связан с промотором тяжелой цепи, обозначенным стрелкой, которая управляет экспрессией тяжелой цепи после рекомбинации.

[0024] Фиг. 8А, 8В. Поскольку два белка объединяются для образования антитела, может быть желательным нацеливать на или инактивировать тяжелую цепь эндогенного антитела В-клетки (IgH) и/или легкую цепь эндогенного антитела В-клетки (IgL). При отсутствии такого нацеливания или инактивации могут образовываться нежелательные гибридные антитела (т.е. спаривание эндогенной легкой цепи с тяжелой цепью выбранного антитела или наоборот). (Фиг. 8А) Подход для нацеливания эндогенного IgH и получающаяся в результате химера, включающая области выбранного антитела (например, паливизумаб). (Фиг. 8В) Подход для инактивации IgL. В описанных подходах стоп-кодон может быть расположен выше (или как часть) встроенной генетической конструкции.

[0025] Фиг. 9. Схематическое изображение взаимодействий энхансеров тяжелых цепей с (вверху) эндогенной VDJ или (внизу) синтетической VDJ, кодируемой вставленной генетической конструкцией. Промоторы изображены в виде стрелок. Нуклеиновая кислота изображена в виде квадрата. В-клетки естественным образом экспрессируют нуклеиновую кислоту, которая находится ниже промотора, который ближе всего к энхансеру E μ . В эндогенном геноме В-клетки, изображенном на Фиг. 9, первый

восходящий промотор, ближайший к энхансеру E μ , затем управляет экспрессией эндогенных сегментов VDJ тяжелой цепи. Вставка генетической конструкции, которая включает промотор между энхансером E μ и первым эндогенным промотором, приводит к тому, что В-клетка экспрессирует вставленную генетическую конструкцию, а не эндогенные сегменты VDJ тяжелой цепи. Этот встроенный ген может представлять собой вариабельную область VDJ тяжелой цепи, спаренную легкую цепь полного антитела вместе с вариабельной областью VDJ тяжелой цепи или другой синтетический ген, способный экспрессироваться в виде слияния с константной областью тяжелой цепи В-клетки. На Фиг. 9 константные области индивидуально обозначены, чтобы подчеркнуть, что встроенная генетическая конструкция может экспрессироваться с любой из потенциальных константных областей тяжелой цепи.

[0026] Фиг. 10. Области нацеливания для вставки (человек). Области для вставки генетической конструкции в геном: #1: от концевой области J (IGHJ6 у человека, IGHJ4 у мыши) до энхансера E μ или # 2: от энхансера E μ до повторяющихся последовательностей области переключения константного домена.

[0027] Фиг. 11A, 11B. (Фиг. 11A) Интронный энхансер E μ человека (SEQ ID NO: 85) и последовательность ДНК человека предназначенные для генетической вставки, в том числе от IGHJ6 до интронного энхансера E μ (SEQ ID NO: 1); (Фиг. 11B) типичные ассоциированные сайты-мишени для нРНК (например, онРНК) (SEQ ID NO. 5-24) и последовательности нРНК (SEQ ID NO: 88, 89 и 290-307).

[0028] Фиг. 12A, 12B. (Фиг. 12A) Последовательность ДНК человека, предназначенная для генетической вставки, в том числе от интронного энхансера E μ до области переключения (SEQ ID NO: 2); (Фиг. 12B) типичные ассоциированные сайты-мишени для нРНК (например, онРНК) (SEQ ID NO. 25-44) и последовательности нРНК (SEQ ID NO: 308-327).

[0029] Фиг. 13A, 13B. (Фиг. 13A) Интронный энхансер E μ мыши (SEQ ID NO: 86) и последовательность ДНК мыши предназначенные для генетической вставки, в том числе от IGHJ4 до интронного энхансера E μ (SEQ ID NO: 3); (Фиг. 13B) типичные ассоциированные сайты-мишени для нРНК (например, онРНК) (SEQ ID NO. 45-64) и последовательности нРНК (SEQ ID NO: (87 и 328-346).

[0030] Фиг. 14A, 14B. (Фиг. 14A) Последовательность ДНК мыши, предназначенная для генетической вставки, в том числе от интронного энхансера E μ до области переключения (SEQ ID NO: 4); (Фиг. 14B) типичные ассоциированные сайты-мишени для нРНК (например, онРНК) (SEQ ID NO. 65-84) и последовательности нРНК (SEQ ID NO: 347-366).

[0031] Фиг. 15A, 15B. Фиг. 15A представляет собой схему, изображающую вставку генетической конструкции, кодирующей антитело к РСВ, в эндогенный локус тяжелой цепи с использованием системы редактирования генов CRISPR/Cas9. Генетическая конструкция может включать гомологичные плечи или гомологичные швы, которые представляют собой нуклеотидные выступы, которые гомологичны геномной ДНК в

месте вставки. Фиг. 15В описывает дополнительные примеры шаблонов репарирования ДНК, включая последовательности, фланкированные сайтами-мишенями онРНК, для генерации двухцепочечных разрывов ДНК, фланкирующих вставленную последовательность, вместе с разрезанием генома Cas9 /онРНК (вверху), одноцепочечную ДНК, содержащую длинные гомологичные плечи, фланкирующие вставленную последовательность (посредине) и короткие гомологичные плечи, фланкирующие вставленную последовательность, полученную отжигом олигоДНК (внизу).

[0032] Фиг. 16. Схематическое описание: (вверху) модифицированный локус тяжелой цепи, модифицированный генетической конструкцией, кодирующей переменную область тяжелой цепи антитела к РСВ; (посредине) модифицированный локус легкой цепи, модифицированный генетической конструкцией, кодирующей переменную область легкой цепи антитела к РСВ; и (внизу) модифицированный локус тяжелой цепи, модифицированный генетической конструкцией, кодирующей легкую цепь (т.е. IgL) антитела к РСВ, и переменную область тяжелой цепи антитела к РСВ с линкером (включая Strep-Tag) между переменной областью легкой цепи и тяжелой цепи.

[0033] Фиг. 17. Схема одновременной защиты от множества патогенных микроорганизмов модифицированными В-клетками памяти и модифицированными В-клетками, секретирующими антитела, как описано в настоящем документе.

[0034] Фиг. 18А-18С. Эффективное разрезание Cas9 целевой интронной области в В-клетках мыши и человека. Электропорирование с рибонуклеарными белковыми комплексами Cas9/онРНК опосредовало эффективный разрез в В-клетках мыши и человека. Клетки подвергались электропорированию с помощью комплексов Cas9/онРНК. Эффективность редактирования оценивали через 3 суток после электропорирования с помощью отслеживания вставок/делеций с помощью разложения (TIDE) в: (Фиг. 18А) линии В-клеток мыши (A20); (Фиг. 18В) первичных В-клетках; и (Фиг. 18С) линии В-клеток человека (Ramos).

[0035] Фиг. 19. Вставка генетической конструкции, кодирующей РСВ-специфическое антитело, в В-клетки мыши.

[0036] Фиг. 20. Обогащение и анализ генетически модифицированных В-клеток.

[0037] Фиг. 21. Генетически модифицированные В-клетки секретируют связывающее РСВ антитело.

[0038] Фиг. 22А, 22В. Подходы нехомологичного соединения концов (NHEJ) и микрохомологичного опосредованного соединения концов (MMEJ) предлагают альтернативы длинно-хомологичному репарированию (HDR) для геномной инженерии первичных В-клеток мыши. (Фиг. 22А) Первичные В-клетки праймировали в течение 24 ч, совместно инкубировали с аденоассоциированным вирусом (ААВ) в течение 12 ч, промывали и либо электропорировали, либо переносили непосредственно во вторичную культуру в течение 3 суток перед анализом экспрессии mCherry. (Фиг. 22В) Первичные В-клетки праймировали в течение 24 ч, подвергали имитации электропорирования или электропорировали с шаблоном+Cas9/онРНК и переносили во вторичную культуру в

течение 5 суток перед анализом экспрессии mCherry.

[0039] Фиг. 23А-23Е. Вставка новой генетической конструкции, кодирующей функциональное антитело, в линии В-клеток мыши и человека позволяет экспрессировать связанное с поверхностью и секретируемое антитело. (Фиг. 23А) Схема локуса IgH, показывающая сайт для вставки частичной конструкции антитела, а также изображения поверхностно-связанного и секретируемого антитела. emAb - синтетическое антитело, используемое в настоящем документе взаимозаменяемо с synAb. (Фиг. 23В) Окрашивание немодифицированных или модифицированных синтетических антител к РСВ(α RSV synAb) линий В-клеток мыши А20 тетрамером белка РСВ-предслияние-F (РСВ-тетрамер) и тетрамером анти-Streptag II (α TagAb тетрамер). (Фиг. 23С) Окрашивание немодифицированных или анти-РСВ synAb-модифицированных линий В-клеток человека RAMOS тетрамером РСВ-предслияние и тетрамером анти-Streptag II. (Фиг. 23D) ИФА на связывания антитела с F-белком предслияния РСВ из культуральной среды немодифицированных или модифицированных анти-РСВ synAb клеточных культур А20. Паливизумаб использовали в качестве положительного контроля. (Фиг. 23Е) ИФА на связывания антитела с F-белком предслияния РСВ из культуральной среды немодифицированных или модифицированных анти-РСВ synAb клеточных культур RAMOS. Паливизумаб использовали в качестве положительного контроля.

[0040] Фиг. 24А-24С. Получение первичных В-клеток мыши с новой специфичностью. (Фиг. 24А) Поверхностное окрашивание имитированно обработанных (вверху) или модифицированных анти-РСВ synAb В-клеток мыши (внизу) тетрамером анти- Streptag II до обогащения (левая панель) и после обогащения и расширения тетрамером анти- Streptag II (средняя панель) и тетрамерами РСВ-предслияние вирусного белка (правая панель). (Фиг. 24В) ИФА на связывания антитела с F-белком предслияния РСВ из культуральной среды немодифицированных или модифицированных анти-РСВ synAb клеточных культур В-клеток мыши. Паливизумаб использовали в качестве положительного контроля. Связывание антител обнаружено с помощью смеси 1:1 поликлонального антитела к Ig человека и антитела к Ig мыши, связанного с HRP. (24С) Быстрый рост обогащенных В-клеток synAb в культуре с помощью питающих клеток 3Т3-CD40L и IL-21.

[0041] Фиг. 25А-25I. Примерные последовательности. (Фиг. 25А) Примерные последовательности онРНК (SEQ ID NO: 87, 88, 89), гомологичные области генома (SEQ ID NO: 90-95) и сплайсинг-олигонуклеотиды (SEQ ID NO: 96-101); (Фиг. 25В) анти-РСВ-emAb ААВ человека (2531 п.о. (SEQ ID NO: 102) и ассоциированные нуклеотидные и протеиновые последовательности (SEQ ID NO: 110-126, 280, 285)); (Фиг. 25С) анти-РСВ-emAb ААВ человека (3134 п.о. (SEQ ID NO: 103) и ассоциированные нуклеотидные и протеиновые последовательности (SEQ ID NO: 127-141, 281, 286)); (Фиг. 25D) анти-РСВ-emAb ААВ человека (1736 п.о. (SEQ ID NO: 104) и ассоциированные нуклеотидные и протеиновые последовательности (SEQ ID NO: 142 -144)); (Фиг. 25Е) emAb-VRC01-ААВ человека (2551 п.о. (SEQ ID NO: 105) и ассоциированные нуклеотидные и протеиновые

последовательности (SEQ ID NO: 145-152, 282, 287)); (Фиг. 25F) emAb-Medi8852-ААВ человека (2544 п.о. (SEQ ID NO: 106) и ассоциированные нуклеотидные и протеиновые последовательности (SEQ ID NO: 153-160, 283, 288)); (Фиг. 25G) emAb-АММ01-ААВ человека (2555 п.о. (SEQ ID NO: 107) и ассоциированные нуклеотидные и протеиновые последовательности (SEQ ID NO: 161-169, 284, 289)); (Фиг. 25H) последовательность интегрирования сплайсинга мРСВ Balb/C (2261 п.о. (SEQ ID NO: 108) и ассоциированные нуклеотидные и протеиновые последовательности (SEQ ID NO: 170-172)); (Фиг. 25I) ТТ-чРСВ-Т7-интегрированная последовательность (1707 п.о. (SEQ ID NO: 109) и ассоциированные нуклеотидные и протеиновые последовательности (SEQ ID NO: 173-175)).

[0042] Фиг. 26А-26D. (Фиг. 26А) Целевая область выше энхансера E μ для введения новой кассеты антител; посредством нацеливания на эту область встроенные гены emAb могут управляться нативным (но вставленным) промотором IgH, максимизируя нативный контроль экспрессии иммуноглобина. Чтобы включить вставку за раз и свести к минимуму нецелевые взаимодействия, конструкции emAb были экспрессированы как слияние одной цепи. Это слияние состоит из полной последовательности легкой цепи, связанной с вариабельной областью тяжелой цепи глицин-сериновым линкером из 57 аминокислот. Физическое связывание легкой и тяжелой цепей сводит к минимуму возможность несовпадения между вставленным emAb и эндогенной легкой цепью. Оптимизированная граница сплайсинга позволяет emAb сплайсироваться к нижестоящим константным областям IgH. Это позволяет экспрессировать emAb как любой из классов изотипа тяжелой цепи. (Фиг. 26В) Линия В-клеток, происходящая от лимфомы Беркитта, нативно экспрессирует поверхностные и секретлируемые формы IgM в паре с легкой цепью лямбда. Экспрессию сконструированного α РСВ-emAb, полученного из паливизумаба, детектировали с использованием мономерного белка РСВ-F и стрептактина, модифицированного стрептавидина с высоким сродством к мотивам Streptag II в линкере. Клетки RAMOS, модифицированные α РСВ-emAb, экспрессировали сконструированное РСВ-специфическое антитело, которое можно было обнаружить на поверхности клеток. (Фиг. 26С) Сконструированное РСВ-специфическое антитело также было обнаружено в секретированной форме в супернатанте. (Фиг. 26D) клетки, модифицированные α РСВ-emAb, но не контрольные клетки, демонстрировали быструю и устойчивую передачу сигналов кальция в ответ на белковый антиген.

[0043] Фиг. 27А-27G. В-клетки человека эффективно генетически модифицированы для экспрессии одноцепочечного emAb путем парной доставки cas9-онРНК и ААВ-шаблона. (Фиг. 27А) Схематическое изображение способа инженерии клетки человека. Сутки 0: В-клетки выделяют из МКПК и праймируют олигонуклеотидами CD40L, IL2, IL10, IL15 и CpG. Сутки 2: клетки электропорированы с помощью cas9/онРНК RNP и обрабатывают ААВ, кодирующим шаблон emAb HR, через 1 ч после электропорирования с последующим культивированием, как описано для суток 0. Сутки 4: клетки отбирают на связывание антигена или экспрессию тэга. Сутки 4-15L:

отобранные клетки размножают на облученных питающих клетках, экспрессирующих CD40L, IL2 и IL21, дополненных IL15. Сутки 15-18: Клетки переносят в культуру для дифференцирования без питающих клеток с IL6, IL15 и IFN γ . (Фиг. 27B) Независимая частота в В-клетках от 6 независимых доноров МКПК, обработанных нацеленными на emAb RNP Cas9/онРНК. (Фиг. 27C) Все SNP человека с зарегистрированной частотой в целевом сайте онРНК. (Фиг. 27D) Типичный FACS для связывания префузионного мономера РСВ-F с контрольными культивируемыми или РСВ-emAb генетически модифицированными В-клетками человека на 4-е сутки культивирования. (Фиг. 27E) Частота РСВ-emAb В-клеток после конструирования В-клеток от 6 независимых доноров. (Фиг. 27F) FACS для маркеров плазматических клеток (CD19, CD27, CD38 и CD138) в примированных клетках (день 2) и клетках, дифференцированных *in vitro* (день 18). (Фиг. 27G) ИФА для секретируемого антитела к НА-стволу в культуральной среде контрольных В-клеток или В-клеток MEDI8852-emAb, нацеленных на грипп, на 18-е сутки культивирования.

[0044] Фиг. 28. Одноцепочечное emAb представляет собой гибкую платформу для экспрессии антивирусных антител. В-клетки человека подвергали фиктивному электропорированию (контроль В, верхний ряд) или генетически модифицировали конструкциями emAb (нижний ряд), полученными из переменных областей указанных широко нейтрализующих конструкций антител и легких цепей человека каппа (паливизумаб, VRC01 и MEDI8852) или лямбда (AMM01). Контрольные и сконструированные клетки emAb окрашивали подходящим антигеном, полученным из указанного патогена: Мономер РСВ-F или тетрамеры ВИЧ-ENV, ВЭБ GH/GL или НА-ствол.

[0045] Фиг. 29A-29D. Вставка emAb в продуктивный аллель IgH может блокировать выработку эндогенного IgH. (Фиг. 29A) Диаграмма аллелей RAMOS IgH: один продуктивный аллель, содержащий сайт-мишень emAb, и один аллель с транслокацией с-тус, исключаяющей сайт-мишень emAb. (Фиг. 29B) Проточная цитометрия, показывающая поверхностную экспрессию легкой цепи лямбда и связывание антигена РСВ-F во входных клетках RAMOS (гейтирование на CD79b+) и в клетках RAMOS, сконструированных α РСВ-emAb (гейтирование на CD79b+/РСВ-F+). (Фиг. 29C) Диаграмма первичных аллелей IgH: один продуктивный аллель и один непродуктивный аллель без функционально рекомбинированного VDJ, оба из которых содержат сайт-мишень emAb. (Фиг. 29D) Проточная цитометрия, показывающая поверхностную экспрессию легкой цепи и связывание антигена РСВ-F на входных отсортированных с λ легкой цепью+В-клетках (гейтирование на CD79b+) и В-клетках, сконструированных α РСВ-emAb (гейтирование на CD79b+/РСВ-F+).

[0046] Фиг. 30A-30E. Инженерия первичных В-клеток мыши с помощью кассеты α РСВ-emAb (Фиг. 30A) Схематическое представление способа инженерии В-клеток мыши. Сутки 0: В-клетки выделяют из селезенки и периферических лимфатических узлов (ПЛУ) посредством отрицательного отбора и праймируют CD40L-НА, анти-НА mAb и

IL4. Сутки 1: клетки подвергают электропорированию с помощью cas9/онРНК RNP вместе с дцДНК (состояние дцДНК) или одним cas9/онРНК RNP с последующей обработкой ААВ, содержащей шаблон emAb HR, через 1 ч после электропорирования (состояние ААВ). Затем клетки поддерживали в культуре, как описано для суток 0. Сутки 3: клетки отбирают на связывание антигена или экспрессию тэга. Сутки 4-8L: отобранные клетки размножали на облученных питающих клетках, экспрессирующих CD40L, с добавлением IL-21. (Фиг. 30B) Независимый процент в В-клетках, обработанных IgH, нацеливающимся на cas9/онРНК RNP. (Фиг. 30C) Типичный FACS для связывания с мономерным белком преслияние-PCV-F в контрольных В-клетках или emAb В-клетках, сконструированных с использованием шаблонов дцДНК или ААВ. (Фиг. 30D) Частота клеток emAb в В-клетках, сконструированных с использованием шаблонов дцДНК или ААВ. (Фиг. 30E) Анти-PCV специфическое секретируемое антитело в супернатанте контрольных В-клеток или В-клеток, сконструированных с использованием шаблонов дцДНК или ААВ.

[0047] Фиг. 31A-31D. Защита от вирусной инфекции с помощью сконструированных α PCV-emAb В-клеток. (Фиг. 31A) Схематическое представление противовирусной защиты переносимыми клетками emAb. Сутки 0: $1,5 \times 10^7$ обогащенные PCV-emAb В-клетки переносятся путем в/б инъекции. Сутки 5: Паливизумаб путем в/б инъекции в дозе 15 мг/кг. Сутки 6: Взятие крови для измерения противовирусных титров Ab. Сутки 7: интраназальное заражение вирусом PCV 10^6 БОЕ. Сутки 12: измерение вирусного титра в легких. (Фиг. 31B) Поверхностная экспрессия рецептора PCV-emAb до или через 24 ч после переноса клеток PCV-emAb, измеренная с помощью связывания мономера PCV-F и тэга стрептактина. (Фиг. 31C) Плазменный титр антител к α PCV-F у мышей на 6-е сутки. (Фиг. 31D) Вирусные титры PCV в легких мышей без перенесенных клеток, с α PCV-emAb В-клетками, с контрольными В-клетками или с 15 мг/кг паливизумаба, доставленного путем в/б инъекции за 48 ч до заражения.

[0048] Фиг. 32A, 32B. Мультиплексный перенос клеток, секретирующих антитело человека, мышам NSG (Фиг. 32A) Схема переноса emAb В-клеток человека мышам NSG. Сутки 0: 5×10^6 анти-Flu emAb В-клеток и 5×10^6 анти-PCV emAb В, полученных, как описано на Фиг. 27 были перенесены путем в/б инъекции. Сутки 7: Взятие крови для производства антител в сыворотке. (Фиг. 32B) ИФА для сывороточных титров антител к PCV-F и антител к НА-стволу у мышей, которые получали клетки emAb (двойной перенос) по сравнению с контрольной сывороткой (без переноса).

[0049] Фиг. 33A, 33B. Шаблоны для длинной вставки кассет emAb в мышь (Фиг. 33A) и человека (Фиг. 33B) locus IgH. В верхнем ряду для каждого генома указаны положение элементов в локусах зародышевой линии IgH, включая конечные J-области, элемент интронного энхансера E μ и начало константного домена μ . Положение сайта-мишени cas9/онРНК указано (сайт Cut). Ниже показаны положения нацеливающих плеч, нацеливающих гомологичные плечи, включенные в конструкцию ААВ мыши и дцДНК (Фиг. 33A), а также конструкция ААВ человека (Фиг. 33B). Также показана кассета emAb,

вставленная в геном.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0050] Вакцины предназначены для повышения иммунитета субъекта против конкретной инфекции путем стимулирования В-клеток для выработки антител против целевого инфекционного агента. Антитела представляют собой белки, которые могут обеспечить защиту от патогенов. Антитела могут связываться с патогеном и являются защитными, когда это связывание нарушает нормальную функцию патогена. Например, многие защитные антитела связываются с частью патогена, которая блокирует проникновение патогена в клетки. Антитела могут быть прикреплены к поверхности В-клеток (известных как В-клеточные рецепторы), но при секреции в кровь выполняют большинство своих защитных функций.

[0051] Патоген может относиться к любому веществу, которое может вызывать заболевание, а патогенный может относиться к способности вещества вызывать заболевание. Примеры патогенных микроорганизмов включают вирусы, бактерии и грибки, которые могут заразить хозяина и вызвать заболевание. Другие примеры патогенов включают белки хозяина или другие вещества хозяина, вызывающие заболевание, такие как фактор некроза опухоли альфа (ФНО α), воспалительная молекула, связанная с многочисленными аутоиммунными состояниями (например, артрит), и бета-амилоидные бляшки, которые являются волокнистыми белками, которые накапливаются в мозге во время болезни Альцгеймера. В конкретных вариантах осуществления раковые клетки и/или опухоли могут также называться патогенами или патогенными веществами в зависимости от их способности вызывать заболевание.

[0052] При воздействии вакцины или природного патогена эпитоп, содержащийся в вакцине и/или присутствующий в патогене, может связываться с рецептором В-клетки, присутствующим на наивной В-клетке. Это связывание может привести к активации В-клетки и выработке защитных антител.

[0053] Наивная В-клетка относится к В-клетке до того, как она вступит в контакт со своим эпитопом. Каждая наивная В-клетка экспрессирует уникальное антитело с уникальной эпитопной специфичностью. Уникальное антитело, экспрессируемое каждой наивной В-клеткой, генерируется случайным образом посредством генетической рекомбинации. Наивные В-клетки экспрессируют мембраносвязанные антитела (то есть В-клеточные рецепторы) и после связывания с эпитопом могут быстро пролиферировать. Во время пролиферации и созревания гены антител подвергаются соматической мутации, которая служит для увеличения аффинности связывания эпитопа. Увеличение сродства связывания эпитопа, которое происходит во время созревания В-клеток, необходимо для эффективной защиты от патогена. Одна наивная В-клетка способна подвергаться десяткам клеточных делений для создания тысяч секретирующих антитела В-клеток и В-клеток памяти (Фиг. 1) экспрессирующих то же антитело или родственное антитело, которое мутировало для улучшения связывания с патогеном.

[0054] Помимо активных В-клеток, секретирующих антитела, В-клетки памяти

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

[0055] К сожалению, существует много инфекционных агентов, для которых нет вакцин. Примеры инфекционных агентов без доступной эффективной стратегии вакцинации включают РСВ, ВИЧ и вирус Зика.

[0056] Что касается РСВ, то катастрофический отказ от инактивированной формалином вакцины против РСВ в 1960-х годах, вероятно, не был вызван неспособностью индуцировать секретирующие антитела В-клетки и В-клетки памяти, нацеленные на РСВ. Вполне вероятно, что вакцина индуцировала выработку антител, которые не нейтрализовали РСВ, но вместо этого усиливали инфекцию РСВ (Фиг. 2А) (Blanco et al., *Hum Vaccin.* 2010;6(6):482-92; Broadbent et al., *Influenza Other Respir Viruses.* 2015;9(4):169-78). Это подчеркивает тонкий баланс, который должен быть достигнут с помощью вакцин: индукция выработки «защитных» антител, нацеленных на определенные эпитопы, при этом избегая стимуляции выработки «патогенных» антител, нацеленных на неправильные эпитопы (Фиг. 2А).

[0057] Анализ, проведенный в 2015 году в рамках Международной платформы регистрации клинических исследований Всемирной организации здравоохранения, выявил девять вакцин-кандидатов против РСВ, которые клинически оценивались с 2008 года, и ни одна из них не вышла за пределы фазы 2 тестирования (Broadbent et al., *Influenza Other Respir Viruses.* 2015;9(4):169-78). Из них только три исследования были завершены, и только одно сообщило о результатах. Эта вакцина, названная MEDI-559, по-видимому, уменьшает РСВ-инфекцию, но респираторные симптомы были слишком сильны для дальнейшего тестирования (Malkin et al., *PLoS One.* 2013;8(10):e77104). Эти данные свидетельствуют о том, что, хотя MEDI-559 индуцировала выработку защитных антител, она, вероятно, также индуцировала выработку патогенных антител (Фиг. 2В).

[0058] Другие «улучшенные» стратегии вакцинации включают изменение состава, который вводят пациентам. Они включают альтернативные способы инактивации/ослабления вируса и изменения в адъюванте, направленные на усиление воспалительного ответа (Broadbent et al., *Influenza Other Respir Viruses.* 2015;9(4):169-78; Garg et al., *The Journal of general virology.* 2014;95(Pt 5):1043-54; Swanson et al., *J Virol.*

2014;88(20):11802-10; Widjaja et al., PLoS One. 2015;10(6):e0130829; Stewart-Jones et al., PLoS One. 2015;10(6):e0128779). Некоторые из этих подходов привели к увеличению количества защитных антител в моделях животных, но возможность индукции патогенных антител делает вероятным, что эти «улучшенные» вакцины против РСВ постигнет та же участь, что и MEDI-559.

[0059] В попытке сфокусировать иммунный ответ на эпитопы, на которые нацелены защитные антитела, недавний подход состоял в том, чтобы привить один эпитоп РСВ на каркас, не содержащий РСВ (Фиг. 2С). Этот подход исключает возможность появления патогенных антител, специфичных для других эпитопов РСВ, поскольку они отсутствуют в каркасе. Введение эпитопной каркасной вакцины против РСВ макаки-резуса привела к выработке нейтрализующих антител некоторыми животными, но только после 3-5 инъекций (Correia et al., Nature. 2014;507(7491):201-6).

[0060] Были также разработаны подходы для обхода вакцинации и непосредственного введения защитных антител. Единственным клинически одобренным профилактическим лечением РСВ является инъекция высокоаффинного РСВ-специфического защитного антитела паливизумаба (Фиг. 3А) (The PREVENT Study Group. Pediatrics. 1997;99(1):93-9; The IMpact-PCV Study Group. Pediatrics. 1998; 102 (3 Pt 1): 531-7). К сожалению, стоимость 5-месячной серии Паливизумаба составляющей 10 000 долларов ограничила его использование детьми с высоким риском тяжелой инфекции РСВ (Meissner & Kimberlin, Pediatrics. 2013;132(5):915-8). Другие РСВ-специфические антитела, рассчитанные на срок до года, в настоящее время проходят клиническую оценку (Influenza Other Respir Viruses. 2015;9(4):169-78). Однако ежегодная повторная инъекция антител невозможна для защиты в течение всей жизни.

[0061] Чтобы исключить необходимость инъекций в течение всей жизни, были разработаны способы, в которых аденовирусный вектор используется для переноса гена, кодирующего защитное антитело, в мышечные клетки (Фиг. 3В) (Schnepp & Johnson, Curr Opin HIV AIDS. 2014;9(3):250-6). Многообещающим является то, что аденовирус-опосредованная экспрессия паливизумаба частично защищает мышечные клетки от инфекции РСВ (Skaricic et al., Virology. 2008;378(1):79-85). Однако ограничением этого подхода являются высокие затраты на производство высоких доз вируса, необходимых для достижения защитных уровней антител (24). Высокие дозы необходимы, потому что экспрессия антител мышечной клеткой является низкой по сравнению с предполагаемыми 10000 антител, выделяемыми в секунду одной В-клеткой (Helmreich et al., J Biol Chem. 1961;236:464-73; Hibi & Dosch, Eur J Immunol. 1986;16(2):139-45). В-клетки достигают такой высокой скорости секреции, полностью перепрограммируя свои механизмы производства белка, чтобы сосредоточиться на секреции антител. Без революции в производственных возможностях перенос генов антител, опосредованных аденовирусом, в мышечные клетки не является реалистичным вариантом профилактики РСВ.

[0062] В другом подходе используется лентивирусный вектор для включения генов, кодирующих защитные антитела, в геном гематопозитических стволовых клеток,

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

[0063] В конкретных вариантах осуществления в настоящем раскрытии предложен обход вакцинации и/или устранение необходимости повторных инъекций терапевтических антител путем получения методом генетической инженерии В-клеток для экспрессии выбранного антитела (например, антитела против инфекционного агента (например, паливизумаба; Фиг. 4А)). Типы В-клеток, которые особенно полезны для генной инженерии, включают существующие В-клетки, секретирующие антитела, В-клетки памяти, наивные В-клетки, В1 В-клетки и В-клетки маргинальной зоны. Наивные В-клетки обладают наибольшим пролиферативным и функциональным потенциалом и могут вступать в реакцию герминального центра и улучшать их способность к связыванию. В1 В-клетки экспрессируют BCR и мигрируют в разные места, такие как брюшная полость. В1 В-клетки быстро дифференцируются в секретирующие антитела клетки после стимуляции через BCR, и им не требуются сигналы для Т-клеток для оптимальной функции. В-клетки маргинальной зоны в основном расположены в краевой зоне селезенки и быстро дифференцируются в секретирующие антитела клетки при стимуляции через BCR. Клетки В маргинальной зоны также не требуют сигналов от Т-клеток для оптимальной функции. Получение методом генетической инженерии одного или более из этих подмножеств В-клеток может создать базовый уровень антител для лечения текущей или немедленной инфекции и долгоживущий источник индуцибельного антитела в случае будущей повторной инфекции. Фиг. 4В демонстрирует связанную стратегию одновременной защиты от многочисленных патогенных микроорганизмов с использованием принципов настоящего изобретения, тогда как Фиг. 5 изображает предполагаемую секрецию паливизумаба типичными подтипами В-клеток в присутствии и в отсутствие инфекции.

[0064] В настоящем раскрытии предложено получение методом генной инженерии В-клеток путем вставки генетической конструкции, включающей трансген, в локус гена эндогенного антитела, специально выбранный для использования из-за структуры и функции эндогенного генома В-клетки. Например, вставка трансгена, кодирующего, по меньшей мере, часть выбранного антитела, в локус гена эндогенного антитела может обеспечить надежную выработку выбранного антитела, используя преимущества

механизма регуляции экспрессии эндогенного антитела. Трансген может относиться к фрагменту ДНК, который кодирует чужеродный (то есть экзогенный) белок. Генетическая конструкция может относиться к искусственно сконструированному сегменту нуклеиновой кислоты, который предназначен для введения в клетку для обеспечения возможности экспрессии чужеродного белка.

[0065] В конкретных вариантах осуществления в настоящем раскрытии предложены В-клетки, которые модифицированы для экспрессии выбранного антитела. Антитела вырабатываются из двух генов, гена тяжелой цепи и гена легкой цепи. Обычно антитело включает в себя две идентичные копии тяжелой цепи и две идентичные копии легкой цепи (см., например, Фиг. 6В). Тяжелые цепи представляют собой более крупные субъединицы из двух, и каждая тяжелая цепь включает в себя сегмент VDJ и константную область (показана как «С» на Фиг. 6В). Сегмент VDJ (или VDJ) относится к уникальному спариванию сегментов гена V, D и J, которые кодируют уникальную область тяжелых цепей антитела, которые связываются с эпитопом на патогене. Таким образом, V относится к одному из сегментов гена, который случайным образом соединяется с сегментом D и J для кодирования уникальной области тяжелой цепи антитела, которая связывается с эпитопом на патогене. Аналогично, D относится к одному из сегментов гена, который случайным образом соединяется с сегментом V и J для кодирования уникальной области тяжелой цепи антитела, которая связывается с эпитопом на патогене. Наконец, J относится к одному из сегментов гена, который случайно соединяется с сегментом V и D для кодирования уникальной области тяжелой цепи антитела, которая связывается с эпитопом на патогене. Существует несколько V-сегментов, D-сегментов и J-сегментов, которые могут объединяться во множество различных комбинаций для формирования конкретного VDJ-сегмента конкретной тяжелой цепи (см., например, Фиг. 7).

[0066] Каждая В-клетка объединяет только одну комбинацию VDJ с консервативной константной областью С, образуя тяжелую цепь полной длины. С-область тяжелой цепи может взаимодействовать с другими иммунными белками, такими как Fc-рецепторы, чтобы активировать другие иммунные клетки. Все наивные В-клетки экспрессируют одни и те же сегменты С-области, но они могут изменяться для экспрессии разных сегментов С-областей после активации, а разные С-области дают антителам разные функции. Например, один сегмент С-гена кодирует ϵ , а антитела, экспрессирующие ϵ , представляют собой «IgE». Антитела IgE-типа связываются с клетками организма и часто опосредуют аллергические реакции. Антитела, экспрессирующие область α С, представляют собой антитела IgA; антитела, экспрессирующие область γ С, представляют собой антитела IgG, а антитела, экспрессирующие область μ С, представляют собой антитела IgM. Геном человека включает один локус тяжелой цепи, который присутствует в хромосоме 14.

[0067] Снова ссылаясь на Фиг. 6В, легкая цепь антитела (IgL) включает переменную область и константную область. Переменная область легкой цепи

включает сегменты гена V и J, а константная область легкой цепи может включать единственный константный домен иммуноглобулина. Человек экспрессирует две разные легкие цепи: Igk, которая кодируется локусом иммуноглобулина каппа на хромосоме 2; и Igλ, которая кодируется локусом иммуноглобулина лямбда на хромосоме 22.

[0068] Фиг. 6А изображает схемы эндогенного генома В-клетки, который кодирует цепь IgH и цепь IgL. Фиг. 8А и 8В изображает исходные схемы, где экзогенные генетические конструкции согласно настоящему раскрытию могут быть вставлены для достижения экспрессии выбранного антитела. Фиг. 8А изображает встраивание генетической конструкции, включающей [сигнал остановки, цепь IgL выбранного антитела (здесь PV), пропускающий элемент (здесь 2А) и сегмент VDJ тяжелой цепи] в эндогенный геном IgH между эндогенным сегментом VDJ и кодирующими сегментами эндогенной С-области. Этот подход приводит к экспрессии всей экзогенной цепи IgL, экзогенного сегмента VDJ тяжелой цепи и эндогенной С-области тяжелой цепи. Экспрессия антитела, которое включает эндогенную С-область, может быть полезной, например, потому что она может позволить модифицированной В-клетке модулировать экспрессию С-области на основе естественной активации и созревания В-клеток. Например, альтернативный сплайсинг в константной области локуса гена тяжелой цепи может позволить модифицированной В-клетке переключаться между экспрессией мембраносвязанного антитела и экспрессией секретируемого антитела. Этот подход также позволяет экспрессию экзогенного VDJ без необходимости удаления эндогенного VDJ. Эта особенность полезна, потому что VDJ является относительно большим сегментом ДНК, и его удаление может отрицательно влиять на клеточные функции.

[0069] Фиг. 9 изображает аналогичную схему с более подробным описанием структуры и функции эндогенного генома В-клетки и того, как в настоящем описании используются эта структура и функция для достижения экспрессии выбранных антител. Промоторные регионы необходимы для достижения транскрипции генного сегмента. Промоторы вариабельной области тяжелой цепи (V_H) избирательно активны в линии В-клеток и включают ТАТА-бокс, элемент Inr и элемент октамера в пределах 100 пар оснований (п.о.) сайта инициации транскрипции. Активность промотора V_H находится под зависимостью-от-близости с помощью элемента энхансера E_{μ} эндогенного генома В-клетки (серый овал) и элемента энхансера, расположенного на 3'-конце локуса гена тяжелой цепи, проксимально к константному гену α тяжелой цепи (серый круг). Элемент энхансера E_{μ} представляет собой интронную область ДНК (длиной от 40 до 1500 п.о.) в интроне 700 п.о. между сегментом тяжелой цепи J и сегментом С μ (μ) локуса гена тяжелой цепи иммуноглобулина. Он может связывать белок-активатор для увеличения или активации транскрипции гена тяжелой цепи. Последовательность энхансерного элемента человека E_{μ} представлена на Фиг. 11А как SEQ ID NO: 85. Последовательность энхансерного элемента мыши E_{μ} представлена на Фиг. 13А как SEQ ID NO: 86.

[0070] Вставка генетической конструкции, которая включает V_H -промотор между эндогенной вариабельной областью тяжелой цепи и эндогенным энхансером E_{μ} , может

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

[0071] Фиг. 10 изображает дополнительную схему для целевых областей для вставки генетической конструкции. Эти области-мишени охватывают две консервативные области, присутствующие во всех В-клетках: от концевой области гена J (IGHJ6 у человека, IGHJ4 у мышей) до интронного энхансера тяжелой цепи (E_{μ}) и от E_{μ} до повторяющихся последовательностей, связанных с рекомбинацией ДНК-переключения.

[0072] В конкретных вариантах осуществления область эндогенного генома В-клетки, которая нацелена на вставку генетической конструкции, находится выше E_{μ} -энхансера SEQ ID NO: 85 или 86. На Фиг. 11A-14B представлены конкретные последовательности, которые могут быть предназначены для вставки генетической конструкции для достижения экспрессии выбранного антитела, как описано в настоящем документе.

[0073] На Фиг. 11A представлен последовательность ДНК человека IGHJ6 интронного энхансера E_{μ} (SEQ ID NO: 1; >hg38_dna range=chr14:105862523-105863244 5'pad=0 3'pad=0 strand=- repeatMasking=none). На Фиг. 11B представлены примерные диапазоны для нацеливания (например, сайты нРНК) в этой последовательности, включая SEQ ID NO: 5-24 и последовательности нРНК (SEQ ID NO: 88, 89 и 290-307). В качестве примеров, в конкретных вариантах, онРНК SEQ ID NO: 88 (см. также Фиг. 25A), может быть использована для нацеливания сайта нРНК SEQ ID NO: 7. В конкретных вариантах осуществления онРНК SEQ ID NO: 89 (см. также Фиг. 25A), может быть использована для нацеливания сайта нРНК SEQ ID NO: 10.

[0074] На Фиг. 12A представлена последовательность ДНК человека для области 2: От интронного энхансера E_{μ} до области переключения (SEQ ID NO: 2; >hg38_dna range=chr14:105860383-105861690 5'pad=0 3'pad=0 strand=-). На Фиг. 12B представлены примерные диапазоны для нацеливания (например, сайты нРНК) в этой последовательности, включая SEQ ID NO: 25-44 и ассоциированные последовательности

нРНК (SEQ ID NO: 308-327).

[0075] На Фиг. 13А представлена последовательность ДНК мыши для области 1: от IGHJ4 до интронного энхансера E μ (SEQ ID NO: 3; >mm10_dna range=chr12:113427973-113428554 5'pad=0 3'pad=0 strand=- repeatMasking=none). На Фиг. 13В представлены примерные диапазоны для нацеливания (например, сайты нРНК) в этой последовательности, включая SEQ ID NO: 45-64 и ассоциированные последовательности нРНК (SEQ ID NO: (87 и 328-346). В качестве примера, в конкретных вариантах, онРНК SEQ ID NO: 87 (см. также Фиг. 25А), может быть использована для нацеливания сайта нРНК SEQ ID NO: 46.

[0076] На Фиг. 14А представлена последовательность ДНК мыши для области 2: от интронного энхансера E μ до области переключения (SEQ ID NO: 4; >mm10_dna range=chr12:113425446-113426973 5'pad=0 3'pad=0 strand=- repeatMasking=none). На Фиг. 14В представлены типичные диапазоны для нацеливания (например, сайтов нРНК) в этой последовательности, включая SEQ ID NO. 65-84 и ассоциированные последовательности нРНК (SEQ ID NO: 347-366).

[0077] Таким образом, в конкретных вариантах осуществления в настоящем раскрытии предложена целевая вставка генетической конструкции, включающая (i) промотор и (ii) трансген, кодирующий часть выбранного антитела в интронной области, которая является постоянной во всех В-клетках (до и после рекомбинации) и (i) расположены относительно энхансерного элемента, который взаимодействует с промотором; и (ii) в такой конфигурации, что эндогенная последовательность VDJ тяжелой цепи В-клеток не экспрессируется. В конкретных вариантах осуществления кодированная часть выделенного антитела включает всю легкую цепь антитела и сегмент VDJ тяжелой цепи. Эти части выбранного антитела могут быть экспрессированы с константной областью тяжелой цепи, экспрессируемой модифицированной В-клеткой в любой момент времени. Конкретные варианты осуществления генетической конструкции также могут включать или кодировать сигнальный пептид, гибкий линкер, пропускающий элемент и/или граница сплайсинга.

[0078] Одна техническая проблема настоящего раскрытия состоит в том, что антитело представляет собой белок, полученный из двух отдельных генных продуктов: тяжелой цепи (IgH) и легкой цепи (IgL) (Фиг. 6А, 6В). Это означает, что в конкретных вариантах осуществления оба генетических местоположения должны быть одновременно изменены, чтобы правильно экспрессировать выбранное антитело. Однако в настоящем раскрытии также предложены стратегии для получения функционально выбранных антител без необходимости модификации обоих генетических местоположений. Один подход, который позволяет это, заключается в использовании последовательностей, которые позволяют экспрессию антител через одну конструкцию. В конкретных вариантах осуществления это достигается путем включения пропускающего элемента в генетическую конструкцию. Одним примером пропускающего элемента является саморасщепляющийся пептид, такой как саморасщепляющийся пептид «2А». 2А пептиды

функционируют, заставляя рибосому пропускать синтез пептидной связи в определенном месте, что приводит к образованию двух белков из одной мРНК. Последовательности 2A являются короткими (например, 20 аминокислот), что облегчает использование в конструкциях с ограниченным размером, и белки получают в соотношении 1: 1. Конкретные примеры включают T2A (GSG)EGRGSLTTCGDVEENPGP (SEQ ID NO: 176); P2A (GSG)ATNFSLLKQAGDVEENPGP (SEQ ID NO: 177); E2A (GSG)QCTNYALLKLAGDVES NPGPP (SEQ ID NO: 178); и F2A (GSG)VKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP (SEQ ID NO: 179).

[0079] В конкретных вариантах осуществления генетические конструкции включают последовательность внутреннего участка посадки рибосомы (IRES). IRES могут быть расположены выше VDJ тяжелой цепи генетической конструкции. IRES представляют собой некодирующие структурированные последовательности РНК, которые позволяют рибосомам иницировать трансляцию во втором внутреннем сайте молекулы мРНК, что приводит к образованию двух белков из одной мРНК. Однако трансляция, управляемая IRES, менее эффективна, чем трансляция, управляемая 2A, что приводит к снижению экспрессии второго белка в транскрипте.

[0080] В конкретных вариантах осуществления генетические конструкции кодируют гибкий линкер между частью легкой цепи выбранного антитела и частью тяжелой цепи выбранного антитела. Линкер может представлять собой серию аминокислот, которые гибко связывают один белковый домен с другим белковым доменом таким образом, который позволяет связанным последовательностям взаимодействовать, образуя функциональную единицу.

[0081] В конкретных последовательностях гибкие линкеры могут включать одну или более серий комбинаций глицина и серина, которые обеспечивают гибкость линкерной последовательности. Примерные Gly-Ser линкеры включают (GGS)_n (SEQ ID NO: 180), (GGGS)_n (SEQ ID NO: 181), и (GGGGS)_n (SEQ ID NO: 182), в которых n=1-100 и каждому целому числу между 1 и 100. В конкретных вариантах осуществления n=10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30. В конкретных вариантах осуществления линкер Gly-Ser включает 50-80 аминокислот. В конкретных вариантах осуществления линкер Gly-Ser включает 54, 57 или 60 аминокислот. В конкретных вариантах осуществления линкер Gly-Ser кодируется SEQ ID NO: 116. В конкретных вариантах осуществления линкер Gly-Ser включает SEQ ID NO: 122.

[0082] Дополнительные примеры гибких линкеров включают (KESGSVSSEQLAQFRSLD)_n (SEQ ID NO: 183) и (EGKSSGSGSESKST)_n (SEQ ID NO: 184). В этих линкерах остатки Gly и Ser в линкере были включены для обеспечения гибкости, тогда как Glu и Lys были добавлены для улучшения растворимости. Bird, RE et al. Science, 1988;242:423-426. В конкретных вариантах осуществления n=1-100 и каждому целому числу между 1 и 100. В конкретных вариантах осуществления n=10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30. В конкретных вариантах осуществления эти линкеры содержат 50-80 аминокислот.

[0083] Конкретные варианты осуществления включают границу сплайсинга, которая позволяет осуществлять сплайсинг между РНК, кодируемой генетической конструкцией, и РНК, кодируемой эндогенной константной областью тяжелой цепи. В конкретных вариантах осуществления генетические конструкции включают последовательность соединения сплайсинга на 3'-конце. Сплайсинг может относиться к удалению интронов и объединению экзонов с помощью комплекса РНК/белок, известного как сплайсосома. Граница сплайсинга относится к интронной последовательности, непосредственно фланкирующей экзон. Граница сплайсинга на 3'-конце экзона может включать донорный сайт сплайсинга. Последовательности донорного сайта сплайсинга обычно начинаются с «GU». В конкретных вариантах осуществления граница сплайсинга может включать в себя 40-80 п.о. интрона, следующего за последним экзоном VDJ. В конкретных вариантах осуществления граница сплайсинга включает 40-80 п.о. интрона, фланкирующего 3'-конец сегмента гена IGJ1 человека или гена IGJ3 мыши. В конкретных вариантах осуществления граница сплайсинга включает CAG/gtaagt, причем вырезание и сплайсинг происходят после заглавной буквы G (обозначено аннотацией «сплайсинг»). В конкретных вариантах осуществления граница сплайсинга включает CAG/gtgagt. CA образуют конец серинового кодона, а G начинает первый кодон из константной области. В конкретных вариантах осуществления граница сплайсинга с фланкирующей последовательностью включает в себя SEQ ID NO: 124 или 151 в генетических конструкциях для введения в локус человека. В конкретных вариантах осуществления граница сплайсинга с фланкирующей последовательностью включает SEQ ID NO: 139 в генетических конструкциях для введения в локус мыши.

[0084] Описанные в настоящем документе генетические конструкции также могут кодировать сигнальные пептиды. Примерные сигнальные пептиды включают сигнальные пептиды полученные из тяжелых цепей IgH человека, такие как MELGLSWIFLLAILKGVQC (SEQ ID NO: 185); MELGLRWVFLVAILEGVQC (SEQ ID NO: 186); MKHLWFFLLLVAAPRWVLS (SEQ ID NO: 187); MDWTWRILFLVAAATGAHS (SEQ ID NO: 188); MDWTWRFLFVVAATGVQS (SEQ ID NO: 189); MEFGLSWLFLVAILKGVQC (SEQ ID NO: 190); MEFGLSWVFLVALFRGVQC (SEQ ID NO: 191); и MDLLHKNMKHLWFFLLLVAAPRWVLS (SEQ ID NO: 192); и сигнальные пептиды полученные из легких цепей IgL человека, такие как MDMRVPAQLLGLLLLWLSGARC (SEQ ID NO: 193); и MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMA (SEQ ID NO: 194). В конкретных вариантах осуществления сигнальный пептид кодируется SEQ ID NO: 112 и включает в себя SEQ ID NO: 118 в генетических конструкциях для введения в локус человека. В конкретных вариантах осуществления сигнальный пептид кодируется SEQ ID NO: 129 и включает в себя SEQ ID NO: 134 в генетических конструкциях для введения в локус мыши. Смотрите также Фиг. 25B-25I и Haryadi R et al., tPLoS One v.10(2); 2015 PMC4338144.

[0085] Как указано, в конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения используется вставка экзогенных генетических конструкций в целевое

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

[0086] Гомологичные области заставляют генетическую конструкцию выравниваться рядом с целевой генетической областью, и части ДНК из генетической конструкции обмениваются в область, вырезанную способами редактирования генов. В конкретных вариантах осуществления генетическая конструкция может включать в себя верхний гомологичный конец генома с от 20 до 1500 п.о. гомологии генома и нижний гомологичный конец генома с от 20 до 1500 п.о. гомологии генома. Гомологичные области могут, например, обеспечивать «гомологичные швы», как показано на Фиг. 15А, которые могут опосредовать вставку генетической конструкции в целевой сайт вставки. В конкретных вариантах осуществления верхний гомологичный конец генома и нижний гомологичный конец генома могут включать последовательности, гомологичные последовательностям генома между областью VDJ тяжелой цепи и элементом энхансера E μ тяжелой цепи. В конкретных вариантах осуществления гомологичные области могут, в частности, включать 20-50 пар оснований; 300-500 пар оснований; 350-550 пар оснований; 900-1000 пар оснований или 400-600 пар оснований. В конкретных вариантах осуществления гомологичные области могут, в частности, включать 30-40 пар оснований (например, 36 пар оснований); 445-455 пар оснований (например, 450 пар оснований); 495-510 пар оснований (например, 503 пар оснований); и/или 960-980 пар оснований (например, 968 пар оснований). В конкретных вариантах осуществления гомологичные области для использования в генетических конструкциях мыши включают SEQ ID NO: 90, 91, 96, 97, 127, 140, 142, 143, 170 и 171. В конкретных вариантах осуществления гомологичные области для использования в генетических конструкциях человека включают SEQ ID NO: 92-95, 98-101, 110, 125, 153, 173 и 174.

[0087] В конкретных вариантах осуществления генетические конструкции также кодируют последовательность тэга. Последовательности тэга могут быть полезны, например, для того, чтобы клетки, экспрессирующие генетическую конструкцию, могли быть идентифицированы и/или отсортированы во время процессов генетической модификации и/или чтобы их можно было контролировать после введения субъекту. Например, в конкретных вариантах осуществления может быть полезно отслеживать и/или уничтожать генетически модифицированные клетки после введения субъекту. Примерные тэги включают STREPTAG[®] (GmbH, LLC, Геттинген, Германия), STREP[®] tag II

(WSHPQFEK (SEQ ID NO: 195)), или любой их вариант; см., например, патент США № 7981632), His тэг, Flag тэг (DYKDDDDK (SEQ ID NO:196)), Xpress тэг (DLYDDDDK (SEQ ID NO: 197)), Avi тэг (GLNDIFEAQKIEWHE (SEQ ID NO: 198)), кальмодулин тэг (KRRWKKNFIAVSAANRFKKISSSGAL (SEQ ID NO: 199)), полиглутаматный тэг, HA тэг (YPYDVPDYA (SEQ ID NO: 200)), Myc тэг (EQKLISEEDL (SEQ ID NO: 201)), Nus тэг, S тэг, SBP тэг, Softag 1 (SLAELLNAGLGGS (SEQ ID NO: 202)), Softag 3 (TQDPSRVG (SEQ ID NO: 203)) и V5 тэг (GKPIPNPLLGLDST (SEQ ID NO: 204)).

[0088] В конкретных вариантах осуществления в настоящем раскрытии предложена генетическая конструкция для экспрессии выбранного антитела, включающая или кодирующая (i) промотор тяжелой цепи и/или (ii) легкую цепь иммуноглобулина и/или (iii) вариабельную область тяжелой цепи, и/или (iv) стоп-кодон; и/или (v) пропускающий элемент и/или (vi) границу сплайсинга и/или (vii) гомологичные плечи и/или (viii) линкер и/или (ix) тэг.

[0089] Конкретные варианты осуществления включают или кодируют: (i) промотор тяжелой цепи; (ii) сигнальный пептид; (iii) всю легкую цепь выбранного антитела; (iv) гибкий линкер или пропускающий элемент; (v) вариабельную область тяжелой цепи выбранного антитела; и (vi) соединение сплайсинга.

[0090] Конкретные варианты осуществления включают или кодируют: (i) промотор тяжелой цепи; (ii) сигнальный пептид; (iii) всю легкую цепь выбранного антитела; (iv) гибкий линкер или пропускающий элемент; (v) вариабельную область тяжелой цепи выбранного антитела; (vi) границу сплайсинга и (vii) гомологичные плечи.

[0091] Конкретные варианты осуществления включают или кодируют: (i) промотор тяжелой цепи; (ii) сигнальный пептид; (iii) всю легкую цепь выбранного антитела; (iv) гибкий линкер или пропускающий элемент; (v) вариабельную область тяжелой цепи выбранного антитела; (vi) границу сплайсинга, (vii) гомологичные плечи; и (viii) тэг.

[0092] На Фиг. 15В изображены дополнительные примеры шаблонов репарирования ДНК. Примеры шаблонов репарирования ДНК, которые также могут быть использованы, включают синтетические шаблоны ДНК и аденоассоциированные вирусы. В конкретных вариантах осуществления синтетические шаблоны ДНК могут включать двухцепочечную ДНК (дцДНК), включающую или кодирующую промотор и выбранную часть антитела, фланкированную 20-1500 парами оснований гомологичными сайту-мишени в геноме. В конкретных вариантах осуществления синтетические шаблоны ДНК могут включать одноцепочечную ДНК (оцДНК), включающую или кодирующую промотор и выбранную часть антитела, фланкированную 10-80 парами оснований или 400-1000 парами оснований гомологичными сайту-мишени в геноме. В конкретных вариантах осуществления синтетические шаблоны ДНК могут включать как дцДНК, так и оцДНК, модифицированные путем фосфорилирования на концах для повышения эффективности лигирования ДНК. В конкретных вариантах осуществления и дцДНК, и оцДНК могут быть модифицированы на концах фосфоротиоатными связями для повышения стабильности и предотвращения расщепления эндонуклеазой.

[0093] В конкретных вариантах осуществления аденоассоциированный вирус может включать сегмент, кодирующий часть синтетического антитела, фланкированную 20-1500 парами оснований гомологичных сайту-мишени в геноме. В конкретных вариантах осуществления последовательность, кодирующая участок промотора и синтетического антитела, может быть фланкирована путем сопоставления гомологичных последовательностей с сайтом-мишенью в геноме.

[0094] В конкретных вариантах осуществления генетическая конструкция, включающая механизм репарирования ДНК (например, гомологичные швы, шаблон синтетической ДНК), может доставляться с использованием системы редактирования генов, такой как CRISPR, TALEN, megaTAL, нуклеазы цинкового пальца и/или аденоассоциированный вирус как описано более подробно ниже. Например, элемент, нацеливающийся на геном, режущий элемент генома и описанная в настоящем изобретении генетическая конструкция могут быть введены в В-клетку.

[0095] В качестве конкретного примера применения настоящего раскрытия В-клетки могут быть модифицированы для экспрессии антитела к паливизумабу. В-клетки могут быть модифицированы генетической конструкцией, которая включает в себя гомологичные плечи длиной 80 п.о., фланкирующие промотор тяжелой цепи выше от полной легкой цепи (IgLPV) и генные сегменты тяжелой цепи VDJ (VDJPV) из паливизумаба, отделенные пептидом 2A. В настоящем изобретении, пептид 2A включен для того, чтобы вызвать рибосомальный пропуск (Donnelly et al., *The Journal of General Virology*. 2001; 82 (Pt 5): 1013-25), что позволяет получить тяжелую цепь и легкую цепь в виде отдельных субъединиц, которые будут нормально связываться с образованием выбранного антитела. В конкретных вариантах осуществления, стоп-кодон может быть включен выше встроенного промотора тяжелой цепи, чтобы остановить любую потенциальную транскрипцию эндогенной вариабельной области тяжелой цепи.

[0096] На Фиг. 16 представлен пример «модифицированного» генома В-клетки, тогда как на Фиг. 17 изображены результирующие популяции В-клеток, экспрессирующих выбранные антитела.

[0097] В следующих параграфах приведено более подробное описание, касающееся (i) типичных выбранных антител и последовательностей; (ii) способов редактирования генов и сортировки клеток; (iii) составления модифицированных В-клеток; и (iv) способов использования.

[0098] (i) Типичные выбранные антитела и последовательности. В конкретных вариантах осуществления выбранное антитело представляет собой антитело, которое может обеспечивать защитный эффект против патогена или состояния (например, аутоиммунного заболевания). В конкретных вариантах осуществления выбранное антитело представляет собой антитело к РСВ, антитело к ВИЧ, антитело к вирусу Денге, антитело к *Bordatella pertussis*, антитело к гепатиту С, антитело к вирусу гриппа, антитело к вирусу парагриппа, антитело к метапневмовирусу (МПВ), антитело к цитомегаловирусу, антитело к вирусу Эпштейна -Барра; антитело к вирусу простого герпеса, антитело к

бактериальному токсину *Clostridium difficile* или антитело к фактору некроза опухоли (ФНО).

[0099] В конкретных вариантах осуществления выбранные антитела представляют собой химерные антитела. В конкретных вариантах осуществления химерные антитела относятся к синтетическому антителу, которое включает: (i) по меньшей мере одну часть, которая кодируется эндогенным геномом В-клетки, и (ii) по меньшей мере одну часть, которая кодируется встроенной генетической конструкцией. В конкретных вариантах осуществления химерное антитело включает константный домен эндогенной тяжелой цепи, экзогенную переменную и константную область легкой цепи иммуноглобулина и экзогенную переменную область тяжелой цепи.

[0100] Следующие антитела и последовательности полезны для предоставления выбранным антителам целевого связывания с интересующими патогенами или антигенами (если не указано иное, предназначена нумерация по Кабату):

[0101] Типичным антителом к РСВ является паливизумаб, который нацелен на слитый белок РСВ и используется для предотвращения или уменьшения РСВ-инфекций.

[0102] В конкретных вариантах осуществления антитело к РСВ представляет собой паливизумаб мыши, который включает переменную последовательность тяжелой цепи, включающую:

QVELQESGPGILQPSQTLSTLTCFSGFSLSSTSGMSVGVWIRQPSGEGLEWLADIWW
DDKKDYNPSLKSRLTISKDTSSNQVFLKITGVDTADTATYYCARSMITNWFYFDVWGAG
TTVTVSS (SEQ ID NO: 138); и переменную последовательность легкой цепи, включающую:

DIQLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSVGYMHWYQQKLSTSPKLQIYDTSKLAS
GVPGRFSGSGSGNSYSLTISSIQAEDVATYYCFRSGSGYPFTFGGQTKLEIK (SEQ ID NO:
205).

[0103] Дополнительным типичным антителом к РСВ является паливизумаб человека, и он включает переменную последовательность легкой цепи, включая:

DIQMTQSPSTLSASVGDRTITCKCQLSVGYMHWYQQKPGKAPKLLIYDTSKLA
SGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDFATYYCFQSGSGYPFTFGGGQTKLEIKR (SEQ ID NO:
206); и переменную последовательность тяжелой цепи, включающую:

QVTLRESGPALVKPTQTLTLCTFSGFSLSSTSGMSVGVWIRQPPGKALEWLADIW
WDDKKDYNPSLKSRLTISKDTSKNQVVLKVTNMDPADTATYYCARSMITNWFYFDVWG
AGTT (SEQ ID NO: 123).

[0104] Внутри переменной области тяжелой цепи и переменной области легкой цепи сегменты, называемые комплементарными определяющими областями (CDR), диктуют связывание с эпитопом. Каждая тяжелая цепь имеет три CDR (т.е. CDRH1, CDRH2 и CDRH3), и каждая легкая цепь имеет три CDR (то есть CDRL1, CDRL2 и CDRL3)

[0105] Дополнительное примерное антитело к РСВ описано в патенте США № 9403900. Это антитело к РСВ включает переменную область тяжелой цепи,

включающую последовательность CDRH1, включающую GASINSDNYYWT (SEQ ID NO: 207), последовательность CDRH2, включающую HISYTGNTYYTPSLKS (SEQ ID NO: 208) и последовательность CDRH3, включающую CGAYVLISNCGWFDS (SEQ ID NO: 209); и переменную область легкой цепи, включающую последовательность CDRL1, включающую QASQDISTYLN (SEQ ID NO: 210), последовательность CDRL2, включающую GASNLET (SEQ ID NO: 211) и последовательность CDRL3, включающую QQYQYLPYT (SEQ ID NO: 212).

[0106] Типичные антитела к РСВ также включают AB1128 (доступный от MILLIPORE) и ab20745 (доступный от ABCAM).

[0107] Примером антитела к ВИЧ является 10E8, которое является широко нейтрализующим антителом, которое связывается с gp41. Антитело к ВИЧ 10E8 включает переменную область тяжелой цепи, включающую последовательность CDRH1, включающую GFDFDNAW (SEQ ID NO: 213), последовательность CDRH2, включающую ITGPGEGWSV (SEQ ID NO: 214) и последовательность CDRH3, включающую TGKYYDFWSGYPPGEEYFQD (SEQ ID NO: 215); и переменную область легкой цепи, включающую последовательность CDRL1, включающую TGDSLRSHYAS (SEQ ID NO: 216), последовательность CDRL2, включающую GKNNRPS (SEQ ID NO: 217) и последовательность CDRL3, включающую SSRDKSGSRLSV (SEQ ID NO: 218).

[0108] Дополнительным примером антитела к ВИЧ является VRC01, которое является широко нейтрализующим антителом, которое связывается с сайтом связывания CD4 gp120. Антитело VRC01 включает переменную область тяжелой цепи, включающую последовательность CDRH1, включающую GYEFIDCT (SEQ ID NO: 219), последовательность CDRH2, включающую KPRGGAVN (SEQ ID NO: 220), и последовательность CDRH3, включающую RGKNCDYNWDFEHW (SEQ ID NO: 221); и переменную область легкой цепи, включающую последовательность CDRL1, включающую QYGS, последовательность CDRL2, включающую SGS, и последовательность CDRL3, включающую QQYEF (SEQ ID NO: 222).

[0109] Типичные антитела к ВИЧ также включают ab18633 и 39/5.4A (доступны от ABCAM); и H81E (доступно от THERMOFISHER).

[0110] Примером антитела к вирусу Денге является антитело 55, описанное в патенте США №20170233460, и оно включает переменную область тяжелой цепи, включающую последовательность CDRH1, включающую EVQLHQSGAELVKPGASVKLSCTVSGFNK (SEQ ID NO: 223), последовательность CDRH2, включающую WVKQRPEQGLEWI (SEQ ID NO: 224), и последовательность CDRH3, включающую ATIKADTSSNTAYLQLISLTSEDVAVYYCAF (SEQ ID NO: 225); и переменную область легкой цепи, включающую последовательность CDRL1, включающую DIQMTQSPASLSVSVGETVTITC (SEQ ID NO: 226), последовательность CDRL2, включающую WYQQKQKSPQLLVY (SEQ ID NO: 227), и последовательность CDRL3, включающую GVPSRFGSGSGTQYSLKINSLQSEDFGTYYC (SEQ ID NO: 228).

[0111] Дополнительным примером антитела к вирусу Денге является DB2-3,

описанное в патенте США № 8637035, и включает переменную область тяжелой цепи, включающую последовательность CDRH1, включающую YTFTDYAIT (SEQ ID NO: 229), последовательность CDRH2, включающую GLISTYYGDSFYNNQKFKG (SEQ ID NO: 230) и последовательность CDRH3, включающую TIRDGKAMDY (SEQ ID NO: 231); и переменную область легкой цепи, включающую последовательность CDRL1, включающую RSSQSLVHSNGNTYLH (SEQ ID NO: 232), последовательность CDRL2, включающую KVSNRFS (SEQ ID NO: 233), и последовательность CDRL3, включающую SQSTHVPYT (SEQ ID NO: 234). Примеры антител к вирусу Денге также включают ab155042 и ab80914 (оба доступны от ABCAM).

[0112] Пример антител к коклюшу, описан в патенте США №9512204 и включает в себя переменную область тяжелой цепи включающую QVQLQQPGSELVRPGASVKLSCKASGYKFTSYWMHWVKRPGQGLEWIGNIFPGSGSTNYDEKFNSKATLTVDTSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYYCTRWLSGAYFDYWGGTTVTVSS (SEQ ID NO: 235) и переменную область легкой цепи, включающую QIVLTQSPALMSASPGEKVTMTCSASSSVSFMYWYQQKPRSSPKWIYLTSLNLPAGVPA RFGSGSGSGLSYSLTISSMEAEDAATYYCQQWSSHPPTFGSGTKLEIK (SEQ ID NO: 236).

[0113] Пример антитела к гепатиту С включает переменную область тяжелой цепи, включающую последовательность CDRH1, включающую SYGMHW (SEQ ID NO: 237), последовательность CDRH2, включающую VIWLDGSNTYYADSVKGR (SEQ ID NO: 238) и последовательность CDRH3, включающую ARDIFTVARGVVIYFDY (SEQ ID NO: 239); и включающую переменную область легкой цепи, включающую последовательность CDRL1, включающую RASQSVSSYLA (SEQ ID NO: 240), последовательность CDRL2, включающую DASNRAT (SEQ ID NO: 241) и последовательность CDRL3, включающую QQRSNWVT (SEQ ID NO: 242). Примеры антител к гепатиту С также включают MAB8694 (доступно от MILLIPORE) и C7-50 (доступно от ABCAM).

[0114] Пример антитела к вирусу гриппа описан в патенте США № 9469685 и включает переменную область тяжелой цепи, включающую последовательность CDRH1, включающую GMTNSLA (SEQ ID NO: 243), последовательность CDRH2, включающую IIPVFETP (SEQ ID NO: 244), и последовательность CDRH3, включающую ATSAGGIVNYYLSFNI (SEQ ID NO: 245); и переменную область легкой цепи, включающую последовательность CDRL1, включающую QTITTW (SEQ ID NO: 246), последовательность CDRL2, включающую KTS, и последовательность CDRL3, включающую QQYSTYSGT (SEQ ID NO: 247). Пример антитела к вирусу гриппа также включает C102 (доступно от THERMOFISHER).

[0115] Типичное антитело к МПВ включает MPE8.

[0116] Типичные антитела к ЦМВ включают MCMV5322A, MCMV3068A, LJP538 и LJP539. RG7667 включает смесь MCMV5322A и MCMV3068A, тогда как CSJ148 включает смесь LJP538 и LJP539. См. также, например, Deng et al., *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 62(2) e01108-17 (Feb. 2018); и Dole et al., *Antimicrobial Agents and*

Chemotherapy 60(5) 2881-2887 (May 2016).

[0117] Пример антитела к ВЭБ включает переменную область тяжелой цепи, включающую последовательность CDRH1 AMM01, включающую YTFIIFGISW (SEQ ID NO: 248), последовательность CDRH2 AMM01, включающую IDTNNGNTNYAQLQG (SEQ ID NO: 249) и последовательность CDRH3 AMM01, включающую RALEMGHRSGFPFDY (SEQ ID NO: 250); и переменную область легкой цепи, включающую последовательность CDRL1 AMM01, включающую GGHNIGAKNVH (SEQ ID NO: 251), последовательность CDRL2 AMM01, включающую YDSDRPS (SEQ ID NO: 252) и последовательность CDRL3 AMM01, включающую CQVWDSGRGHPLYV (SEQ ID NO: 253).

[0118] Пример антитела к ВПГ включает HSV8-N и MB66.

[0119] Типичные антитела к *Clostridium difficile* включают актоксумаб и безлтоксумаб. См., также, например, Wilcox et al., N Engl J Med 376(4) 305-317 (2017).

[0120] Коммерчески доступные антитела к ФНО включают инфликсимаб (Remicade® Centocor, Inc., Малверн, Пенсильвания с биоаналогами Inflectra® Pfizer, Кент, Великобритания и Ixifi® Pfizer, Нью-Йорк, Нью-Йорк), адалимумаб (Humira® Abbott Laboratories, Эббот Парк, Иллинойс с биоаналогами Amjevita® Amgen, Саузен Оакс, Калифорния и Cyltezo® Boehringer Ingelheim Int'l, Ингельхайм, Германия), голимумаб (Simponi® Johnson & Johnson Corp., Нью-Брансуик, Нью-Джерси), этанерцепт (Enbrel® Immunex Corp, Саузерн Оакс, Калифорния с биоподобным Erelzi® Novartis AG, Базель, Швейцария) и цертолизумаб-пеголом (Cimzia® UCB Pharma, Брюссель, Бельгия).

[0121] В конкретных вариантах осуществления CDR инфликсимаба включают: остатки тяжелой цепи 26-37, 52-70 и 103-116 и остатки легкой цепи 24-39, 55-61 и 94-102. В конкретных вариантах осуществления тяжелая цепь инфликсимаба начинается с EVKLEESGGGLVQPGGSMK (SEQ ID NO: 254), а легкая цепь начинается с DILLTQSPAILSVPGER (SEQ ID NO: 255).

[0122] В конкретных вариантах осуществления инфликсимаб включает переменную область тяжелой цепи, включающую последовательность CDRH1, включающую IFSNHW (SEQ ID NO: 256), последовательность CDRH2, включающую RSKSINSATH (SEQ ID NO: 257), и последовательность CDRH3, включающую NYYGSTY (SEQ ID NO: 258); и переменную область легкой цепи, включающую последовательность CDRL1, включающую FVGSSIH (SEQ ID NO: 259), последовательность CDRL2, включающую KYASESM (SEQ ID NO: 260) и последовательность CDRL3, включающую QSHSW (SEQ ID NO: 261).

[0123] В конкретных вариантах осуществления адалимумаб включает переменную область тяжелой цепи, включающую последовательность CDRH1, включающую TFDDYA (SEQ ID NO: 262), последовательность CDRH2, включающую TWNSGHID (SEQ ID NO: 263), и последовательность CDRH3, включающую VSYLSTASSL (SEQ ID NO: 264); и переменную область легкой цепи, включающую последовательность CDRL1, включающую GIRNYLA (SEQ ID NO: 265),

последовательность CDRL2, включающую YAASTLQ (SEQ ID NO: 266) и последовательность CDRL3, включающую RYNRA (SEQ ID NO: 267).

[0124] В конкретных вариантах осуществления цертолизумаб включает переменную область тяжелой цепи, включающую последовательность CDRH1, включающую VFTDYG (SEQ ID NO: 268), последовательность CDRH2, включающую NTYIGEP1 (SEQ ID NO: 269) и последовательность CDRH3, включающую GYRSYAM (SEQ ID NO: 270); и переменную область легкой цепи, включающую последовательность CDRL1, включающую NVGTNVA (SEQ ID NO: 271), последовательность CDRL2, включающую YSASFLY (SEQ ID NO: 272) и последовательность CDRL3, включающую QYNIY (SEQ ID NO: 273).

[0125] Многочисленные дополнительные последовательности антител, которые могут быть использованы в рамках настоящего описания, доступны и известны специалистам в данной области техники, Информация о последовательности для коммерчески доступных антител может быть найдена в базе данных Drug Bank, CAS Registry и/или RSCB Protein Data Bank. Кроме того, последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие части выбранных антител, описанных в настоящем документе, могут быть легко получены специалистом в данной области техники.

[0126] (ii) Способы редактирования генов и сортировка клеток. Системы редактирования генов позволяют контролировать целевые сайты генетической терапии. В рамках настоящего описания может быть использована любая система редактирования генов, способная к точному нацеливанию и модификации последовательности. Эти системы обычно включают целевой элемент для точного нацеливания и режущий элемент для вырезания целевого генетического сайта. Направляющая РНК является одним из примеров нацеливающего элемента, в то время как различные нуклеазы являются примерами режущих элементов. Нацеливающие элементы и режущие элементы могут быть отдельными молекулами или связанными, например, наночастицей. Альтернативно, нацеливающий элемент и режущий элемент могут быть связаны вместе в одну молекулу двойного назначения. Когда предполагается введение терапевтической последовательности нуклеиновой кислоты, системы также могут включать шаблоны репарирования, направленные на гомологию (т.е. гомологичные группы, как описано выше), связанную с генетической конструкцией. Однако, как подробно описано ниже, разные системы редактирования генов могут принимать разные компоненты и конфигурации, сохраняя при этом способность точно нацеливать, вырезать и модифицировать выбранные сайты генома.

[0127] В конкретных вариантах осуществления используют цинк-пальцевые нуклеазы (ZFN) в качестве агентов для редактирования генов. ZFN представляют собой класс сайт-специфических нуклеаз, сконструированных для связывания и расщепления ДНК в определенных положениях. ZFN используются для введения двухцепочечных разрывов (DSB) в конкретном сайте в последовательности ДНК, что позволяет ZFN нацеливаться на уникальные последовательности в геноме в различных клетках. Более

того, после двухцепочечного разрыва происходит восстановление с направленной гомологией (HDR) или негомологическое соединение концов (NHEJ) для восстановления DSB, что позволяет редактировать геном.

[0128] ZFN синтезируются путем слияния ДНК-связывающего цинк-пальцевого домена с доменом расщепления ДНК. ДНК-связывающий домен включает от трех до шести цинк-пальцевых белков, которые являются факторами транскрипции. Домен расщепления ДНК включает каталитический домен, например, домен FokI эндонуклеазы. Домен FokI функционирует как димер, требующий двух конструкций с уникальными ДНК-связывающими доменами для сайтов последовательности-мишени. Домен расщепления FokI расщепляет в спейсерной последовательности из пяти или шести пар оснований, разделяющей два инвертированных полусайта.

[0129] Для получения дополнительной информации о ZFN см. Kim, et al. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 1156-1160 (1996); Wolfe, et al. *Annual review of biophysics and biomolecular structure* 29, 183-212 (2000); Bibikova, et al. *Science* 300, 764 (2003); Bibikova, et al. *Genetics* 161, 1169-1175 (2002); Miller, et al. *The EMBO journal* 4, 1609-1614 (1985); и Miller, et al. *Nature biotechnology* 25, 778-785 (2007).

[0130] В конкретных вариантах осуществления может использоваться активатор транскрипции, такой как эффекторные нуклеазы (TALEN), в качестве агентов для редактирования генов. TALEN относятся к слитым белкам, включающим ДНК-связывающий белок, подобный активатору транскрипции (TALE), и домен расщепления ДНК. TALEN используются для редактирования генов и геномов путем индукции DSB в ДНК, которые индуцируют механизмы репарирования в клетках. Как правило, два TALEN должны связывать и фланкировать каждую сторону сайта-мишени ДНК, чтобы домен расщепления ДНК димеризовался и индуцировал DSB. DSB восстанавливается в клетке с помощью NHEJ или HDR, если присутствует экзогенный двухцепочечный донорский фрагмент ДНК.

[0131] Как указано, TALEN были разработаны для связывания последовательности-мишени, например, эндогенного генома, и разрезания ДНК в месте расположения последовательности-мишени. TALE в TALEN представляют собой ДНК-связывающие белки, секретируемые бактериями *Xanthomonas*. ДНК-связывающий домен TALE включает высококонсервативный 33- или 34-аминокислотный повтор с расходящимися остатками в 12-м и 13-м положениях каждого повтора. Эти две позиции, называемые повторяющиеся переменные двойные остатки (RVD), показывают сильную корреляцию с распознаванием специфических нуклеотидов. Соответственно, специфичность нацеливания может быть улучшена путем замены аминокислот в RVD и включения нетрадиционных аминокислот RVD.

[0132] Примерами доменов расщепления ДНК, которые можно использовать в слияниях TALEN, являются дикого типа и варианты домены FokI эндонуклеаз. Для получения дополнительной информации о TALEN см. Boch, et al. *Science* 326, 1509-1512

(2009); Moscou, & Bogdanove, *Science* 326, 1501 (2009); Christian, et al. *Genetics* 186, 757-761 (2010); and Miller, et al. *Nature biotechnology* 29, 143-148 (2011).

[0133] Конкретные варианты осуществления используют MegaTAL в качестве агентов редактирования генов. MegaTAL имеют одноцепочечную структуру нуклеазы с редким расщеплением, в которой TALE слит с доменом расщепления ДНК мегануклеазы. Мегануклеазы, также известные как самонаводящиеся эндонуклеазы, представляют собой одиночные пептидные цепи, которые имеют как функцию распознавания ДНК, так и функцию нуклеазы в одном и том же домене. В отличие от TALEN, megaTAL требует доставки только одной пептидной цепи для функциональной активности.

[0134] В конкретных вариантах осуществления эндогенный геном В-клетки может быть нацелен с использованием систем редактирования генов CRISPR. Нуклеазная система CRISPR представляет собой прокариотическую иммунную систему, которая придает устойчивость к чужеродным генетическим элементам, таким как плазмиды и фаги, и обеспечивает форму приобретенного иммунитета. CRISPR представляют собой локусы ДНК, содержащие короткие повторения последовательностей оснований. В контексте прокариотической иммунной системы за каждым повторением следуют короткие сегменты спейсерной ДНК, принадлежащие чужеродным генетическим элементам, с которыми взаимодействовал прокариот. Этот набор повторов CRISPR с включениями спейсеров может быть транскрибирован в РНК. РНК может быть обработана до зрелой формы и ассоциирована с нуклеазой, такой как cas (CRISPR-ассоциированная) нуклеаза. Система CRISPR-Cas, включающая РНК, имеющую последовательность, которая может гибридизоваться с чужеродными генетическими элементами, и нуклеазу Cas, может затем распознавать и вырезать эти экзогенные генетические элементы в геноме.

[0135] Система CRISPR-Cas не требует генерации индивидуальных белков для нацеливания на специфические последовательности, но вместо этого короткая направляющая молекула РНК (кРНК) может запрограммировать один фермент Cas для распознавания конкретной ДНК-мишени. Системы бактериального и археального адаптивного иммунитета CRISPR-Cas демонстрируют чрезвычайное разнообразие белкового состава и архитектуры геномных локусов. Системные локусы CRISPR-Cas имеют более 50 семейств генов, и нет строго универсальных генов, что указывает на быструю эволюцию и чрезвычайное разнообразие архитектуры локусов. До настоящего времени, принимая многосторонний подход, существует комплексная идентификация гена cas из 395 профилей для 93 белков Cas. Классификация включает сигнатурные генные профили плюс сигнатуры локусной архитектуры. Предложена новая классификация систем CRISPR-Cas, в которой эти системы широко разделены на два класса: класс 1 с эффекторными комплексами с несколькими субъединицами и класс 2 с эффекторными модулями с одной субъединицей, примером которого является белок Cas9.

[0136] Для редактирования генома было разработано как минимум три разных типа нуклеазы Cas9. Первым типом является Cas9 дикого типа, которая вводит двухцепочечные

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

[0137] В дополнение к системам CRISPR-Cas класса 1 и класса 2, недавно был идентифицирован предполагаемый класс 2, тип v CRISPR-Cas, примером которого является Cpf1, см. Zetsche et al. (2015) Cell 163(3): 759-771. Нуклеаза Cpf1, в частности, может обеспечить дополнительную гибкость при выборе целевого сайта с помощью короткой последовательности распознавания из трех пар оснований (TTN), известной как мотив, примыкающий к протоспейсеру, или PAM. Сайт разреза Cpf1 находится на расстоянии по меньшей мере в 18 п.о. от последовательности PAM, таким образом, фермент может многократно разрезать указанный локус после образования инсерционно-делеционной мутации (вставки и делеции), увеличивая эффективность HDR. Кроме того, ступенчатые DSB с липкими концами позволяют вставлять донорские шаблоны для конкретной ориентации.

[0138] Дополнительная информация, касающаяся систем CRISPR-Cas и их компонентов, описана в, US8697359, US8771945, US8795965, US8865406, US8871445, US8889356, US8889418, US8895308, US8906616, US8932814, US8945839, US8993233 и US8999641 и связанными с ними заявками; и WO2014/018423, WO2014/093595, WO2014/093622, WO2014/093635, WO2014/093655, WO2014/093661, WO2014/093694, WO2014/093701, WO2014/093709, WO2014/093712, WO2014/093718, WO2014/145599, WO2014/204723, WO2014/204724, WO2014/204725, WO2014/204726, WO2014/204727, WO2014/204728, WO2014/204729, WO2015/065964, WO2015/089351, WO2015/089354, WO2015/089364, WO2015/089419, WO2015/089427, WO2015/089462, WO2015/089465, WO2015/089473 и WO2015/089486, WO2016205711, WO2017/106657, WO2017/127807 и связанными с ними заявками.

[0139] Конкретные варианты осуществления объединяют тракрПНК и крПНК в

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

[0140] В конкретных вариантах осуществления режущий элемент направляется в целевое местоположение ДНК с помощью сконструированных нРНК (Фиг. 25A (Sternberg et al., *Mol Cell*. 2015;58(4):568-74)). Генетические конструкции с гомологическими плечами, фланкирующими вырезанную геномную область, эффективно вставляются в это место с помощью механизма направленного гомологического репарирования ДНК (см., например, Фиг. 15B (Elliott et al., *Mol Cell Biol*. 1998;18(1):93-101)). При таком подходе экспрессия эндогенного антитела будет устранена, и гены, кодирующие выбранное антитело, будут вставлены в целевое генетическое местоположение. Эта целевая вставка устраняет или значительно уменьшает вероятность нецелевых эффектов, возникающих в результате случайной генетической вставки.

[0141] В конкретных вариантах осуществления онРНК, нацеленная на IgH мыши или человека каждого эндогенного антитела, нацелена на область 100 п.о. ниже J-области (Фиг. 9). В экспериментальных примерах эта область была нацелена на экспрессию версии выбранного антитела паливизумаба, содержащего область C из эндогенного генома (Фиг. 7 и 9). Алгоритм crispr.mit.edu (Hsu et al., *Nat Biotechnol*. 2013; 31 (9): 827-32) идентифицировал 22 последовательности нацеливания для этой области, которые, как прогнозируют, имеют небольшое, если таковое имеется, связывание вне цели. Индивидуальные нацеливающие последовательности могут быть вставлены в полноразмерную онРНК и смешаны с нуклеазой, такой как Cas9, непосредственно перед инкубацией, как описано (Schumann et al., *Proc Natl Acad Sci US A*. 2015; 112 (33): 10437-42) и электропорированы в В-клетки (Kim et al., *J. Immunol*. 1979;122(2):549-54). Поскольку клеточное репарирование ДНК, разрезанной Cas9, часто приводит к потере функции гена (Symington & Gautier, *Annu Rev Genet*. 2011; 45: 247-71), ожидается, что эффективные онРНК, нацеленные на области, кодирующие антитела, приведут к появлению некоторых В-клеток, в которых отсутствует антитело, что можно легко оценить с помощью проточной цитометрии. Активность онРНК, нацеленных на интронные последовательности, можно оценить путем секвенирования или с помощью ферментативных анализов, таких как анализ эндонуклеазы T7.

[0142] В конкретных вариантах осуществления направляющие и режущие элементы генома можно вводить посредством электропорирования, доставки,

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

[0143] В конкретных вариантах осуществления генетические конструкции для введения можно вводить посредством электропорирования, доставки, опосредованной наночастицами, и/или доставки вирусным вектором. Аденоассоциированные вирусные векторы включают в себя векторы, происходящие, например, от аденовируса 5 (Ad5), аденовируса 35 (Ad35), аденовируса 11 (Ad11), аденовируса 26 (Ad26), аденовируса 48 (Ad48) или аденовируса 50 (Ad50) и адено ассоциированного вируса (AAB; см., например, пат. США № 5,604,090; Kay et al., *Nat. Genet.* 24:257 (2000); Nakai et al., *Blood* 91:4600 (1998)).

[0144] В конкретных вариантах осуществления направляющие и режущие элементы генома можно вводить посредством электропорирования, а генетические конструкции для введения можно вводить посредством AAB-опосредованной доставки. В конкретных вариантах осуществления направляющие и режущие элементы генома можно вводить посредством доставки, опосредованной наночастицами, а генетические конструкции для введения можно вводить посредством доставки, опосредованной AAB.

[0145] В конкретных вариантах осуществления генетическая конструкция, включающая трансген, может быть смешана с нацеливающим элементом (например, онРНК) и режущим элементом (например, Cas9 или *crf1*) непосредственно или незадолго до электропорирования. Экспрессия выбранного антитела может быть подтверждена позже (например, через 3 суток) путем измерения связывания клеток с флуоресцентно мечеными белками-мишенями с помощью проточной цитометрии. Могут быть использованы методики обогащения и анализа для выявления и анализа эпитоп-специфичных В-клеток. Pape et al., *Science*. 2011;331(6021):1203-7; Taylor et al., *J Exp Med*. 2012;209(3):597-606; Taylor et al., *J Exp Med*. 2012;209(11):2065-77; Haasken et al., *J Immunol*. 2013;191(3):1055-62; Taylor et al., *J Immunol Methods*. 2014;405:74-86; Nanton et al., *Eur J Immunol*. 2015;45(2):428-41; Hamilton et al., *J Immunol*. 2015;194(10):5022-34; Taylor et al., *Science*. 2015;347(6223):784-7). Эти методологии позволяют обнаруживать выбранные экспрессирующие антитела В-клетки на частотах, столь необычно низких, как 0,00002% от общей популяции В-клеток (Taylor et al., *Science*. 2015;347(6223):784-7).

[0146] В конкретных вариантах осуществления клетки могут быть идентифицированы и/или отсортированы на основе маркера экспрессии до или после доставки генетической конструкции. Например, может быть полезно выделить конкретный тип В-клеток (например, В-клетки памяти, В-клетки, секретирующие антитела, наивные В-клетки, В1 В-клетки, В-клетки маргинальной зоны) из образца перед доставкой генетической конструкции. В качестве другого примера, может быть полезно отделить В-клетки от других клеток, присутствующих в образце крови. CD19 является

примером белка, экспрессируемого В-клетками, но немногими другими клетками организма. Путем маркировки CD19 флуоресцентной молекулой В-клетки могут быть специфически идентифицированы. B220 является полезным маркером для идентификации В-клеток мыши.

[0147] CD27 является примером белка, экспрессируемого В-клетками памяти, но не наивными В-клетками человека. Путем маркировки CD27 флуоресцентной молекулой можно идентифицировать В-клетки памяти.

[0148] CD21 представляет собой пример белка, не экспрессируемого (или экспрессируемого в низкой степени) некоторыми В-клетками памяти человека, обладающими способностью быстро секретировать антитело после инфекции. Низкую экспрессию CD21 можно использовать для определения В-клеток, праймированных для дифференцирования плазматических клеток. Путем маркировки CD21 флуоресцентной молекулой эти В-клетки могут быть специфически идентифицированы, например, путем негативного отбора.

[0149] Наивные В-клетки человека можно идентифицировать по маркерному профилю IgM⁺ IgD⁺ CD27⁻. Наивные В-клетки мыши можно идентифицировать по маркерному профилю CD38⁺ GL7-IgM⁺ IgD⁺. В1 В-клетки человека можно идентифицировать по маркерному профилю CD5⁺ CD43⁺. В1 В-клетки мыши можно идентифицировать по маркерному профилю CD43⁺ B220^{LOW}. В-клетки маргинальной зоны человека можно идентифицировать по маркерному профилю CD21⁺⁺⁺ IgM⁺⁺ IgD⁻ CD27⁺. В-клетки маргинальной зоны мыши можно идентифицировать по маркерному профилю CD21⁺⁺⁺ IgM⁺⁺ IgD⁻.

[0150] В конкретных вариантах осуществления может использоваться маркерный профиль CD19⁺CD27⁺CD21^{lo}.

[0151] CD45 представляет собой маркер, используемый для идентификации и/или выделения типов клеток, используемых в описанных в настоящем изобретении экспериментах. Разные линии мышей экспрессируют разные версии белка, называемого CD45, называемые CD45.1 и CD45.2. В экспериментах, раскрытых в данном документе, В-клетки мыши, которая экспрессирует CD45.2, будут взяты и перенесены в мышь, которая экспрессирует CD45.1. С помощью маркировки CD45.1 и CD45.2 различными флуоресцентными молекулами, можно идентифицировать клетки, полученные от животного-донора, потому что они экспрессируют CD45.2, но не CD45.1.

[0152] Конкретные варианты осуществления включают сортировку В-клеток после генетической модификации на основе экспрессии экзогенной легкой цепи. Например, В-клетки, которые естественным образом экспрессируют легкую цепь каппа, могут быть модифицированы для экспрессии выбранного антитела, которое включает легкую цепь. Например, В-клетки, которые естественным образом экспрессируют легкую цепь лямбда, могут быть модифицированы для экспрессии выбранного антитела, которое включает легкую цепь каппа. Сортировка, основанная на экспрессии экзогенной легкой цепи, позволит выделить только те В-клетки, которые экспрессируют выбранное антитело. В

конкретных вариантах осуществления только те В-клетки, у которых полностью отсутствует поверхностная экспрессия их эндогенной легкой цепи, выделяют для составления и введения субъекту.

[0153] В конкретных вариантах осуществления клетки могут быть идентифицированы и/или выделены с использованием проточной цитометрии. Проточная цитометрия представляет собой чувствительный и мощный метод анализа, в котором используются лазеры для индивидуального анализа флуоресцентных молекул, маркирующих миллионы отдельных клеток. Анализируя комбинацию флуоресцентных молекул, отмеченных каждой клеткой, можно идентифицировать различные подтипы В-клеток. Проточную цитометрию можно использовать для идентификации подгрупп В-клеток и анализа экспрессии выбранных антител (например, паливизумаба) в этих клетках.

[0154] В конкретных вариантах осуществления способы модификации В-клеток могут включать получение гематопоэтических стволовых клеток (HSC) и/или доставку генетических конструкций в HSC. HSC может относиться к типу стволовых клеток, которые естественным образом вырабатывают В-клетки, а также все другие клетки иммунной системы. HSC можно получить, например, из пуповинной крови.

[0155] Конкретные экспериментальные результаты, описанные в настоящем изобретении, использовали клетки A20 для разработки методологии генетической модификации перед переходом к свежеизолированным В-клеткам. A20 представляет собой иммортализованную клеточную линию, полученную из В-клеток мыши.

[0156] В конкретных вариантах осуществления В-клетки могут быть получены от человека, и полученные В-клетки или их подгруппа могут быть модифицированы *ex vivo*.

[0157] Составы модифицированных В-клеток. После модификации клетки могут быть собраны из культуральной среды, промыты и сконцентрированы в носителе в терапевтически эффективном количестве. Типичные носители включают солевой раствор, забуференный солевой раствор, физиологический солевой раствор, воду, раствор Хенкса, раствор Рингера, Nonnosol-R (Abbott Labs), PLASMA-LYTE A[®] (Baxter Laboratories, Inc., Мортон Гров, Иллинойс), глицерин, этанол, и их комбинации.

[0158] В конкретных вариантах осуществления носители могут быть дополнены сывороточным альбумином человека (HSA) или другими сывороточными компонентами человека или фетальной бычьей сывороткой. В конкретных вариантах осуществления носитель для инфузии включает забуференный физиологический раствор с 5% натриевой солью гиалуроновой кислоты (HAS) или декстрозой. Дополнительные изотонические агенты включают многоатомные сахарные спирты, включая трехатомные или высшие сахарные спирты, такие как глицерин, эритрит, арабит, ксилит, сорбит или маннит.

[0159] Носители могут включать буферные агенты, такие как цитратные буферы, сукцинатные буферы, тартратные буферы, фумаратные буферы, глюконатные буферы, оксалатные буферы, лактатные буферы, ацетатные буферы, фосфатные буферы, гистидиновые буферы и/или соли триметиламина.

[0160] Стабилизаторы относятся к широкой категории вспомогательных веществ, которые могут варьироваться от наполнителя до добавки, которая помогает предотвратить прилипание клеток к стенкам контейнера. Типичные стабилизаторы могут включать многоатомные сахарные спирты; аминокислоты, такие как аргинин, лизин, глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аланин, орнитин, L-лейцин, 2-фенилаланин, глутаминовая кислота и треонин; органические сахара или сахарные спирты, такие как лактоза, трегалоза, стахиоза, маннит, сорбит, ксилит, рибит, миоинозит, галактит, глицерин и циклитолы, такие как инозит; ПЭГ; аминокислотные полимеры; серосодержащие восстановители, такие как мочевины, глутатион, тиоктовая кислота, тиогликолат натрия, тиоглицерин, альфа-монотиоглицерин и тиосульфат натрия; низкомолекулярные полипептиды (то есть <10 остатков); белки, такие как HSA, бычий сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; моносахариды, такие как ксилоза, манноза, фруктоза и глюкоза; дисахариды, такие как лактоза, мальтоза и сахароза; трисахариды, такие как рафиноза, и полисахариды, такие как декстран.

[0161] Там, где это необходимо или полезно, составы могут включать местный анестетик, такой как лидокаин, для облегчения боли в месте инъекции.

[0162] Типичные консерванты включают фенол, бензиловый спирт, метакрезол, метилпарабен, пропилпарабен, октадецилдиметилбензиламмонийхлорид, бензалконийгалогениды, гексаметонийхлорид, алкилпарабены, такие как метил или пропилпарабен, катехол, резорцин, циклогексанол и 3-пентан.

[0163] Составы могут включать, например, более чем 10^2 модифицированных В-клеток, более чем 10^3 модифицированных В-клеток, более чем 10^4 модифицированных В-клеток, более чем 10^5 модифицированных В-клеток, более чем 10^6 модифицированных В-клеток, более чем 10^7 модифицированных В-клеток, более чем 10^8 модифицированных В-клеток, более чем 10^9 модифицированных В-клеток, более чем 10^{10} модифицированных В-клеток или более чем 10^{11} модифицированных В-клеток.

[0164] Способы использования. Способы, раскрытые в настоящем изобретении, включают лечение субъектов (например, людей, ветеринарных животных (собак, кошек, рептилий, птиц), домашнего скота (например, лошадей, крупного рогатого скота, коз, свиней, кур) и исследовательских животных (например, обезьян, крыс, мышей, рыб) составами, раскрытыми в настоящем изобретении. Лечение субъектов включает доставку терапевтически эффективных количеств. Терапевтически эффективные количества включают те, которые обеспечивают эффективные количества, профилактическое лечение и/или терапевтическое лечение.

[0165] «Эффективное количество» представляет собой количество композиции, необходимое для достижения желаемого физиологического изменения у субъекта. Эффективные количества часто вводятся в исследовательских целях. Раскрытые в настоящем изобретении эффективные количества могут вызывать статистически значимый эффект в модели на животных или в анализе *in vitro*, относящийся к оценке

развития, прогрессирувания и/или разрешения состояния.

[0166] «Профилактическое лечение» включает лечение, назначаемое субъекту, который не проявляет признаков или симптомов состояния или показывает только ранние признаки или симптомы состояния, так что лечение вводят с целью уменьшения риска развития состояния. Таким образом, профилактическое лечение функционирует как профилактическое лечение от состояния. В конкретных вариантах осуществления профилактическое лечение уменьшает, задерживает или предотвращает ухудшение состояния. Конкретные варианты осуществления включают введение композиции, описанной в настоящем изобретении, в качестве профилактической защиты в отсутствие эффективной в настоящее время вакцины. Конкретные варианты осуществления включают введение композиции, описанной в настоящем изобретении, в качестве профилактической защиты в качестве замены для традиционных стратегий вакцинации. Конкретные варианты осуществления включают введение композиции, описанной в настоящем изобретении, в качестве профилактической защиты в качестве дополнения к обычным стратегиям вакцинации.

[0167] «Терапевтическое лечение» включает лечение, назначаемое субъекту, который проявляет симптомы или признаки состояния, и вводится субъекту с целью уменьшения или устранения этих признаков или симптомов состояния. Терапевтическое лечение может уменьшать, контролировать или устранять наличие или активность состояния и/или уменьшать, контролировать или устранять побочные эффекты состояния.

[0168] В конкретных вариантах осуществления состояние представляет собой инфекцию.

[0169] В зависимости от функции эффективного количества, профилактическое лечение или терапевтическое лечение не являются взаимоисключающими, и в конкретных вариантах осуществления вводимые дозы могут выполнять более одного типа лечения.

[0170] В конкретных вариантах осуществления терапевтически эффективные количества обеспечивают антипатогенные эффекты. Антипатогенные эффекты могут включать противоинфекционные эффекты. Противоинфекционные эффекты могут включать уменьшение случаев возникновения инфекций, уменьшение тяжести инфекций, уменьшение продолжительности инфекций, уменьшение количества инфицированных клеток, уменьшение объема инфицированных тканей, увеличение ожидаемой продолжительности жизни, индуцирование чувствительности инфицированных клеток к иммунному клиренсу, уменьшение боли, связанной с инфекцией, и/или уменьшение или устранение симптома, связанного с инфекцией, поддающейся лечению.

[0171] В конкретных вариантах осуществления терапевтически эффективные количества обеспечивают противовоспалительные эффекты. Противовоспалительное действие может включать уменьшение боли, связанной с воспалением, жара, покраснения, отека и/или потери функции.

[0172] В конкретных вариантах осуществления терапевтически эффективные количества обеспечивают эффекты против болезни Крона или эффектов против язвенного

колита. Воздействие против болезни Крона или против язвенного колита может включать уменьшение диареи, уменьшение ректального кровотечения, снижение необъяснимой потери веса, снижение температуры, уменьшение боли и спазмов в животе, уменьшение усталости и ощущения низкой энергии и/или восстановление аппетита.

[0173] В конкретных вариантах осуществления терапевтически эффективные количества обеспечивают противодартритные эффекты. Противодартритные эффекты могут включать уменьшение боли, ригидности, припухлости, покраснения в области суставов и/или восстановление диапазона движений. Типы артрита включают ревматоидный артрит (РА), анкилозирующий спондилоартрит и псориатический артрит.

[0174] В конкретных вариантах осуществления терапевтически эффективные количества обеспечивают противопсориазные эффекты (против бляшечного псориаза). Противопсориазные эффекты (против бляшечного псориаза) могут включать уменьшение красных пятен, шелушения, зуда, жжения, болезненности, аномалий ногтевого ложа и/или опухших или неподвижных суставов.

[0175] В конкретных вариантах осуществления В-клетки могут быть получены от субъекта, подмножество В-клеток может быть модифицировано *ex vivo*, а затем модифицированные В-клетки могут быть составлены и введены субъекту. В конкретных вариантах осуществления первое подмножество В-клеток субъекта может быть модифицировано первой генетической конструкцией для получения выбранного антитела к первому патогену, а второе подмножество В-клеток субъекта может быть модифицировано второй генетической конструкцией для получения выбранного антитела ко второму патогену, обеспечивая тем самым защитные антитела к двум патогенам. Как указано, В-клетки против любого количества патогенов могут быть получены и введены субъекту. В конкретных вариантах осуществления выбранные антитела могут представлять собой антитело к РСВ, антитело к ВИЧ, антитело к вирусу Денге, антитело к *Bordatella pertussis*, антитело к гепатиту С, антитело к вирусу гриппа, антитело к вирусу парагриппа, антитело к МПВ, антитело к цитомегаловирусу, антитело к вирусу Эпштейна-Барра; антитело к вирусу простого герпеса, антитело к бактериальному токсину *Clostridium difficile* и/или антитело к ФНО. В конкретных вариантах осуществления выбранные антитела могут представлять собой одно или более антител против РСВ, антитело к вирусу гриппа, антитела к вирусу парагриппа и/или антитело к МПВ. В конкретных вариантах осуществления выбранные антитела могут представлять собой антитело к РСВ, антитело к вирусу гриппа, антитело к вирусу парагриппа и антитело к МПВ. В конкретных вариантах осуществления выбранное антитело представляет собой паливизумаб.

[0176] В конкретных вариантах осуществления В-клетки могут быть получены от донора костного мозга или донора гематопозитических стволовых клеток, который был иммунологически подобран реципиенту. В конкретных вариантах осуществления первое подмножество донорских В-клеток может быть модифицировано первой генетической конструкцией для получения выбранного антитела к первому патогену, а второе

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

[0177] В конкретных вариантах осуществления реципиент получает костный мозг от донора или трансплантацию гематопозитических стволовых клеток в качестве лечения гематологического злокачественного новообразования. Примеры гематологических злокачественных новообразований включают острый лимфоцитарный лейкоз, В-клеточный пролимфоцитарный лейкоз, лимфому/лейкоз Беркитта, хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ), диффузную В-крупноклеточную лимфому, фолликулярную лимфому (степень I, II, III или IV), лимфому Ходжкина, внутрисосудистую В-крупноклеточную лимфому, лимфому, лимфоплазмочитарную лимфому, мантийноклеточную лимфому, лимфому маргинальной зоны (экстранодальную и узловую), медиастинальную (тимусную) В-крупноклеточную лимфому, множественную миелому, неходжкинскую лимфому, РОEMS-синдром/остеосклеротическую миелому, первичную выпотную лимфому, лимфому маргинальной зоны селезенки, мелкоклеточную лимфоцитарную лимфому, вялотекущую множественную миелому (SMM) и макроглобулинемию Вальденстрема.

[0178] В конкретных вариантах осуществления реципиент получает генетически модифицированные гематопозитические стволовые клетки, которые обеспечивают ген, который отсутствует у реципиента. Данные реципиенты могут иметь первичный или вторичный иммунодефицит, который можно лечить с помощью предоставления терапевтического гена через гематопозитические стволовые клетки. Более чем 80 первичных иммунодефицитных заболеваний признаны Всемирной организацией здравоохранения. Эти заболевания характеризуются внутренним нарушением иммунной системы, при котором в некоторых случаях организм не может вырабатывать какое-либо

или достаточное количество антитела против инфекции. В других случаях клеточная защита для борьбы с инфекцией не работает должным образом. Как правило, первичные иммунодефицитные состояния являются наследственными нарушениями. X-сцепленный тяжелый комбинированный иммунодефицит (SCID-X1) является еще одним примером первичного иммунодефицита. X-сцепленный SCID приводит как к клеточному, так и к гуморальному иммунному истощению, вызванному мутациями в гене общей гамма-цепи (γ C), которые приводят к отсутствию Т-лимфоцитов и лимфоцитов естественных киллеров (NK).

[0179] Вторичные или приобретенные иммунодефициты не являются результатом наследственных генетических аномалий, а скорее встречаются у индивидуумов, у которых иммунная система нарушена факторами вне иммунной системы. Примеры включают травму, вирусы, химиотерапию, токсины и загрязнение. Синдром приобретенного иммунодефицита (СПИД) является примером вторичного иммунодефицита, вызванного вирусом, вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ), при котором истощение Т-лимфоцитов делает организм неспособным бороться с инфекцией.

[0180] В конкретных вариантах осуществления В-клетки могут быть получены от субъекта, подмножество В-клеток может быть модифицировано *ex vivo*, а затем модифицированные В-клетки могут быть составлены и введены субъекту. В конкретных вариантах осуществления первая подгруппа В-клеток субъекта может быть модифицирована первой генетической конструкцией, чтобы вырабатывать выбранное антитело к молекуле воспаления, такой как воспалительный цитокин, тем самым обеспечивая антитела, которые защищают от воспаления. В конкретных вариантах осуществления выбранные антитела могут быть антителами к ФНО и/или антителами к ИЛ-1. В конкретных вариантах осуществления выбранное антитело представляет собой инфликсимаб, адалимумаб и/или голимумаб, и/или его утвержденный биоаналог.

[0181] Для введения терапевтически эффективные количества (также называемые в данном документе как дозы) могут быть первоначально оценены на основе результатов анализов *in vitro* и/или исследований на животных. Такая информация может использоваться для более точного определения полезных доз у субъектов, представляющих интерес. Фактическая доза, вводимая конкретному субъекту, может быть определена врачом, ветеринаром или исследователем с учетом таких параметров, как физические и физиологические факторы, включая возраст, предыдущие вакцины (если вводились), цель, массу тела, тяжесть состояния, тип состояния, стадию состояния, предыдущие или сопутствующие терапевтические вмешательства, индивидуальную особенность субъекта и путь введения.

[0182] Как указано, в конкретных вариантах осуществления модифицированные В-клетки экспрессируют тэг, которая позволяет, например, отслеживать и/или устранять их после введения субъекту.

[0183] Типовые дозы могут включать более чем 10^2 модифицированных В-клеток, более чем 10^3 модифицированных В-клеток, более чем 10^4 модифицированных В-клеток,

более чем 10^5 модифицированных В-клеток, более чем 10^6 модифицированных В-клеток, более чем 10^7 модифицированных В-клеток, более чем 10^8 модифицированных В-клетки, более чем 10^9 модифицированных В-клеток, более чем 10^{10} модифицированных В-клеток или более чем 10^{11} модифицированных В-клеток.

[0184] В конкретных вариантах осуществления эффекты выбранных антител могут быть измерены с использованием титров вируса. Титр вируса относится к количеству вируса, которое может быть обнаружено. Высокие титры вируса означают высокий уровень инфекции. Оптимальный защитный ответ наблюдается с титрами, которые падают до нуля.

[0185] Как будет понятно специалисту в данной области техники, в то время как были описаны конкретные варианты осуществления, дополнительные варианты осуществления также могут быть использованы в пределах объема настоящего раскрытия. Следующее описание обеспечивает описание и включение типовых дополнительных вариантов осуществления.

Примерные варианты осуществления.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

10. Способ по любому из вариантов осуществления 2-6, 8 или 9, в котором гибкий линкер представляет собой SEQ ID NO: 122.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

тэг.

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

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

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

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

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

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

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

30. Способ по любому из вариантов осуществления 1-29, в котором выбранное антитело представляет собой антитело к РСВ, включая паливизумаб, АВ1128 или ab20745.

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

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

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

34. Способ по любому из вариантов осуществления 1-29 или 33, в котором выбранное антитело представляет собой антитело к ВИЧ, включающее тяжелую цепь,

включающую SEQ ID NO: 150 и легкую цепь, включающую SEQ ID NO: 149.

35. Способ по любому из вариантов осуществления 1-29 или 33, в котором выбранное антитело представляет собой антитело к ВИЧ, включающее CDRH1, включающую SEQ ID NO: 213, CDRH2, включающую SEQ ID NO: 214, CDRH3, включающую SEQ ID NO: 215, CDRL1, включающую SEQ ID NO: 216, CDRL2, включающую SEQ ID NO: 217, и CDRL3, включающую SEQ ID NO: 218 или CDRH1, включающую SEQ ID NO: 219, CDRH2, включающую SEQ ID NO: 220, CDRH3, включающую SEQ ID NO: 221, CDRL1, включающую QYGS, CDRL2, включающую SGS, и CDRL3, включающую SEQ ID NO: 222.

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

37. Способ по любому из вариантов осуществления 1-29 или 36, в котором выбранное антитело представляет собой антитело к вирусу Денге, включающее CDRH1, включающую SEQ ID NO: 223, CDRH2, включающую SEQ ID NO: 224, CDRH3, включающую SEQ ID NO: 225; CDRL1, включающую SEQ ID NO: 226, CDRL2, включающую SEQ ID NO: 227, и CDRK3, включающую SEQ ID NO: 228 или CDRH1, включающую SEQ ID NO: 229, CDRH2, включающую SEQ ID NO: 230, CDRH3, включающую SEQ ID NO: 231, CDRL1, включающую SEQ ID NO: 232, CDRL2, включающую SEQ ID NO: 233, и CDRL3, включающую SEQ ID NO: 234.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

52. Способ по любому из вариантов осуществления 1-51, в котором в генетической модификации используется последовательность, включающая любую из SEQ ID NO: 87, 88, 89, 90-175, 278-366.

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

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

осуществления 1-53.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

68. Генетическая конструкция по любому из вариантов осуществления 62-64, 66

или 67, в которой гибкий линкер представляет собой SEQ ID NO: 122.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

79. Генетическая конструкция по любому из вариантов осуществления 62-78, в которой генетическая конструкция кодирует тэг.

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

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

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

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

включающую SEQ ID NO: 205; антитело к РСВ, включающее тяжелую цепь, включающую SEQ ID NO: 123 и легкую цепь, включающую SEQ ID NO: 120; или антитело к РСВ, включающее тяжелую цепь, включающую SEQ ID NO: 123 и легкую цепь, включающую SEQ ID NO: 206.

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

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

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

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

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

89. Генетическая конструкция по любому из вариантов осуществления 62-81 или 88, в которой выбранное антитело представляет собой антитело к вирусу Денге, включающее CDRH1, включающую SEQ ID NO: 223, CDRH2, включающую SEQ ID NO: 224, CDRH3, включающую SEQ ID NO: 225; CDRL1, включающую SEQ ID NO: 226, CDRL2, включающую SEQ ID NO: 227, и CDRKL3, включающую SEQ ID NO: 228 или CDRH1, включающую SEQ ID NO: 229, CDRH2, включающую SEQ ID NO: 230, CDRH3, включающую SEQ ID NO: 231, CDRL1, включающую SEQ ID NO: 232, CDRL2, включающую SEQ ID NO: 233, и CDRL3, включающую SEQ ID NO: 234.

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

91. Генетическая конструкция по любому из вариантов осуществления 62-81, в

которой выбранное антитело представляет собой антитело к вирусу гепатита С, включая MAB8694 или C7-50.

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

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

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

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

96. Генетическая конструкция по любому из вариантов осуществления 62-81, в которой выбранное антитело представляет собой антитело к МПВ, включая MPE8.

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

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

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

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

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

102. Генетическая конструкция по любому из вариантов осуществления 62-81, в которой выбранное антитело представляет собой антитело к ФНО, включая инфликсимаб,

адалимумаб, этанерцепт, цертолизумаб или их приемлемые биоаналоги.

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

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

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

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

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

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

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

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

[0186] Пример 1 Обеспечение иммунитета от респираторно-синцитиальной вирусной инфекции без вакцины. Респираторно-синцитиальный вирус (РСВ) является основной причиной тяжелых респираторных заболеваний у детей младшего возраста, особенно у детей с хроническими заболеваниями легких, врожденными пороками сердца или преждевременно родившихся. Гуморальный иммунитет может обеспечивать эффективную защиту от РСВ, что подтверждается терапевтическими эффектами рекомбинантного антитела Synagis® (MedImmune, Inc.)/паливизумаб. Однако как естественная инфекция, так и предыдущие испытания вакцин не смогли вызвать полностью защитный иммунный ответ против РСВ.

[0187] Для РСВ и других, трудно поддающихся получению вакцины болезней,

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

[0188] Конкретные варианты осуществления включают платформу для быстрого и селективного перепрограммирования первичной антительной специфичности В-клетки с помощью однонаправленной иммунологической инженерии. Эта платформа использует преимущества высокой активности опосредованного микрогомологией соединения концов пути репарирования ДНК в первичных В-клетках для вставки полностью синтетического гибридного двухцепочечного/одноцепочечного ДНК-шаблона после создания разрывов ДНК рибопротеинами Cas9/онРНК. Ключом к этому подходу является сохранение эндогенных регуляторных элементов, что позволяет осуществлять естественный контроль экспрессии поверхностно-связанных и секретлируемых антител. Более того, стратегия не ограничивается РСВ. Может быть возможным экспрессировать антитела, защищающие практически от любого патогена, всего одним взятием крови и последующей инфузией клеток через несколько суток.

[0189] Материалы и способы. Дизайн онРНК онРНК, нацеленные на интронные последовательности в локусе IgH мыши и человека, конструировали с использованием CrispRGold (crisprgold.mdc-berlin.de) и получали в синтетической форме, включающей 2'-О-метильные аналоги и 3' фосфоротиоатные межнуклеотидные связи в первых трех 5' и 3' концевых остатках РНК (Synthego). Последовательности, нацеленные на геном, являются следующими:

Мышь: UUAUACAGUAUCCGAUGCAU (SEQ ID NO: 87)

Человек: GUCUCAGGAGCGGUGUCUGU (SEQ ID NO: 89)

[0190] Разработка и сборка шаблонов последовательностей.

[0191] Человек: Конструкция антитела включала промоторную область тяжелой цепи IgVH1-69 (SEQ ID NO: 111), полноразмерную кодон-оптимизированную легкую цепь паливизумаба (SEQ ID NO: 113 (нуклеотид) и SEQ ID NO: 120 (аминокислота)), 57-аминокислотный глицин-сериновый линкер, содержащий 3 тандемные копии мотива Streptag II (SEQ ID NO: 116 (нуклеотид) и SEQ ID NO: 122 (аминокислота)), кодон-оптимизированную переменную область тяжелой цепи паливизумаба (SEQ ID NO: 117 (нуклеотид) и SEQ ID NO: 123 (аминокислота) и границу сплайсинга с 60 п.о. фланкирующей последовательности, полученной из генного сегментаIGHJ1 человека (SEQ ID NO: 124).

[0192] Мышь: mCherry шаблон, включающий промотор тяжелой цепи J5558H10,

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

[0193] Отжиг сшиваемых олигонуклеотидов (т.е., сплайсинг-олигонуклеотидов). Сшиваемые олигонуклеотиды с 36 п.о. комплементарности к рам-дистальной и рам-проксимальной нецелевой цепи ДНК и 50-100 п.о. комплементарности к вставленному шаблону были получены синтетически и предварительно отожджены на шаблон ДНК перед использованием (например, SEQ ID No: 96-101). Сплайсинг-олигонуклеотиды могут обеспечивать «гомологичные швы», как показано на Фиг. 15.

[0194] Доставка шаблонов вирусных векторов на основе аденоассоциированных вирусов (AAB). Вирусные векторы AAB содержали промотор MND, полноразмерную кодон-оптимизированную mCherry открытую рамку считывания и сайт полиаденилирования sv40, фланкированный либо 2 сайтами распознавания онРНК мыши, либо 400 п.о. гомологии. Вирионы AAB получали в клетках 293Т, псевдотипированных вирусным капсидом AAV6, и очищали центрифугированием в градиенте сахарозы и хранили при -80 °С. Для вирусной доставки шаблона ДНК концентрированный вирус AAB добавляли до конечного объема 10% от общего объема культуры за 12 часов до электропорирования.

[0195] Культура В-клеток мыши и электропорирование. Основная В-клеточная среда включала среду RPMI с 10% фетальной телячьей сывороткой (Hyclone), 10 mM HEPES (Gibco), 1 mM пируват натрия (Gibco), 55 мкМ β-меркаптоэтанол (Sigma) и 100 ед./мл пенициллина плюс 100 мкг/мл стрептомицина (Gibco) за исключением стадий, свободных от антибиотиков, как отмечено.

[0196] В-клетки выделяли из селезенки и лимфатических узлов с помощью негативного отбора с помощью магнитных микроносителей (Miltenyi) и культивировали в течение 24 часов при 2×10^6 /мл в В-клеточной среде с добавлением 100 нг/мл рекомбинантного свободного от меченного НА носителя CD40L мыши (R&D systems), 100 нг/мл антитела к НА (клон 543851, R&D systems) и 4 нг/мл мышинового IL-4 (R&D systems). Затем В-клетки подвергали электропорированию с использованием системы трансфекции Neon и наконечника на 10 мкл следующим образом. Белок Cas9 (Invitrogen) и синтетическую онРНК (Synthego) смешивали в соотношении 3 мкг Cas9/900 нг онРНК и инкубировали при комнатной температуре в течение по меньшей мере 10 минут. В-клетки промывали ФСБ и суспендировали в буфере Neon T с конечной плотностью $2,5 \times 10^7$

клеток/мл с помощью Cas9/онРНК и предварительно собранного шаблона ДНК. Клетки подвергали электропорированию (1675 В, 10 миллисекунд, 3 импульса) и сразу же распределяли в предварительно нагретую среду без антибиотиков.

[0197] Для размножения клеток В-клетки совместно культивировали с облученными (80 мкг) питающими клетками 3T3-CD40L в присутствии 20 нг/мл IL-21 мыши.

[0198] Оценка активности онРНК с помощью отслеживания вставок/делеций с помощью разложения (TIDE). Общая геномная ДНК была выделена из ложных и обработанных Cas9 клеток через 3-5 суток после электропорирования. Область 500-600 п.о., фланкирующую участок разреза, амплифицировали с помощью ПЦР с использованием следующих олигонуклеотидов:

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

Обратная: AACCTCAGTCACCGTCTCCT (SEQ ID NO: 275)

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

Обратная: GCCACTCTAGGGCCTTTGTT (SEQ ID NO: 277)

[0199] Результаты. Результаты показаны на Фиг. 18А-18С, Фиг. 22А и 22В, Фиг. 23В-23Е и Фиг. 24А-24С. На Фиг. 18А, 18В и 18С продемонстрирован успешный разрез мышью В-клеточной линии А20, первичных В-клеток мыши и В-клеточные линии RAMOS человека соответственно в локусах-мишенях IgH после электропорирования клеток с рибонуклеарными белками Cas9/онРНК. На Фиг. 22А и 22В изображено встраивание репортера флуоресцентного белка mCherry в локус IgH первичных В-клеток мыши. На Фиг. 23В и 23С продемонстрирована поверхностная экспрессия антитела к РСВ после введения частичной кассеты антител в линии В-клеток мыши А20 (Фиг. 23В) и линии В-клеток человека RAMOS (Фиг. 23С). На Фиг. 23D и 23Е продемонстрирована секреция антитела к РСВ после введения частичной кассеты антител в линии В-клеток мыши А20 (Фиг. 23D) и линии В-клеток человека RAMOS (Фиг. 23Е). На Фиг. 24А продемонстрирована поверхностная экспрессия антитела к РСВ после введения частичной кассеты антител в первичные В-клетки мыши, первоначально (левые панели) и после обогащения и размножения *in vitro* (правые панели). На Фиг. 24В продемонстрирована секреция антитела к РСВ после вставки частичной кассеты антител в первичные линии В-клеток мыши. На Фиг. 24С продемонстрирован *in vitro* пролиферативный потенциал сконструированных В-клеток.

[0200] Пример 2 Целью этого примера было получение генетически модифицированных В-клеток с определенной специфичностью, которые поддерживают нативный контроль секреторируемой и поверхностной экспрессии Ig посредством генной инженерии локуса IgH. Локус IgH в В-клетках является трудной областью для нацеливания для геномной инженерии из-за высоко варьируемых последовательностей, присутствующих в В-клетках. Развитие В-клеток приводит к рекомбинации элементов V, D и J на более чем 1 мегаоснование ДНК с образованием варьируемых областей VDJ, фундаментальных для разнообразия антител. Позднее в онтогенезе В-клеток

переключение классов между различными константными областями приводит к потере ДНК в сходном диапазоне последовательностей (Reviewed in Watson, et al., (2017). *Trends Immunol* 38(7): 459-470).

[0201] Эта вариабельность последовательности делает непрактичным прямое нацеливание на кодирующие области антитела. Однако небольшая область ДНК между последним сегментом гена J и областью переключения, участвующей в переключении класса, присутствует во всех В-клетках. Эта универсальная мишень содержит критический интронный энхансер E μ , один из нескольких сильных энхансерных элементов, которые взаимодействуют для обеспечения высокого уровня экспрессии генов IgH, несмотря на их слабые промоторы. Активность этих энхансеров частично регулируется близостью промоторов относительно энхансера E μ , и вставка трансгена между рекомбинированными сегментами VDJ и энхансером E μ может полностью блокировать транскрипцию VDJ (Delpy, et al., (2002). *J Immunol* 169(12): 6875-6882). По этой причине способы, используемые в этом примере, нацелены на область выше энхансера E μ для вставки новой кассеты антител (Фиг. 26А). Посредством нацеливания на эту область встроенные гены emAb могут управляться нативным (но вставленным) промотором IgH, максимизируя нативный контроль экспрессии иммуноглобина.

[0202] Чтобы включить вставку за раз и свести к минимуму нецелевые взаимодействия, конструкции emAb были экспрессированы как слияние одной цепи. Это слияние состоит из полноразмерной последовательности легкой цепи, связанной с вариабельной областью тяжелой цепи глицин-сериновым линкером из 57 аминокислот, как было описано для одноцепочечных фрагментов F(ab). (Koerber, et al., (2015). *J Mol Biol* 427(2): 576-586) (Фиг. 26А). Этот линкер содержит 3 тандемных повтора мотива StreptagII, чтобы облегчить обнаружение и обогащение генетически модифицированных клеток (Schmidt & Skerra (2007). *Nat Protoc* 2(6): 1528-1535). Физическое связывание легкой и тяжелой цепей сводит к минимуму возможность несовпадения между вставленным emAb и эндогенной легкой цепью. Оптимизированная граница сплайсинга позволяет emAb сплайсироваться к нижестоящим константным областям IgH. Это позволяет экспрессировать emAb как любой из классов изотипа тяжелой цепи.

[0203] Эта стратегия была опробована на линии В-клеток человека RAMOS. Эта линия В-клеток, происходящая от лимфомы Беркитта, нативно экспрессирует поверхностные и секретируемые формы IgM в паре с легкой цепью лямбда. В этих экспериментах экспрессию сконструированного α PCB-emAb, полученного из паливизумаба, детектировали с использованием мономерного белка PCB-F и стрептактина, модифицированного стрептавидина с высокой аффинностью к мотивам Streptag II в линкере. α Генетически модифицированные клетки RAMOS PCB-emAb экспрессировали сконструированное PCB-специфическое антитело, которое можно было обнаружить на поверхности клеток (Фиг. 26В) и в виде секретируемой формы в супернатанте (Фиг. 26С). Чтобы подтвердить, что emAb BCR собирается с вторичными белковыми комплексами, важными для передачи сигналов BCR, клетки RAMOS

подвергали стимуляции мультимеризованным антигеном РСВ-F. α Сконструированные, но не контрольные клетки РСВ-emAb демонстрировали быструю и устойчивую передачу сигналов кальция в ответ на белковый антиген (Фиг. 26D). Эти данные послужили подтверждением жизнеспособности инженерного подхода emAb.

[0204] Затем первичные В-клетки человека были генетически модифицированы с использованием многоступенчатого процесса экспансии и дифференцирования (Фиг. 27A). Электропорирование предварительно комплексных направляющих РНК и Cas9 приводит к высокоэффективному разрезанию геномной ДНК, что приводит к дефектному восстановлению этой области в 70% аллелей-мишеней, проанализированных у нескольких независимых доноров (Фиг. 27B). Сайт-мишень онРНК сильно консервативен у людей, при этом не сообщается о единичных нуклеотидных полиморфизмах, зарегистрированных с частотой выше 1% (Фиг. 27C). Добавление ААВ-доставленной кассеты α РСВ-emAb эффективно перепрограммировало В-клетки человека для связывания белка РСВ-F (фиг. 27D). Примечательно, что emAb В-клетки были успешно получены из каждого тестируемого донора-человека со средней степенью инженерии 24% (Фиг. 27E). Культивирование и дифференцирование *in vitro* во время выработки emAb увеличивали потенциал секреции антител. Праймированные клетки на 2-е сутки экспрессировали высокие уровни CD19 и низкие уровни маркеров плазматических клеток CD138, CD27 и CD138, в отличие от клеток на 18-е сутки, которые имели более низкие уровни CD19 и повышенные CD38, CD27 и CD138 (Фиг. 27F). В соответствии с этими изменениями в маркерах клеточной поверхности дифференцированные В-клетки, сконструированные с помощью emAb, секретируют значительное количество целевого антитела (Фиг. 27G). Взятые вместе, эти данные демонстрируют способность быстро и эффективно создавать первичные В-клетки для получения специфических защитных антител.

[0205] Для демонстрации гибкого аспекта платформы были протестированы кассеты emAb, полученные из 3 дополнительных широко нейтрализующих антивирусных антител, включая VRC01, нацеленное на ВИЧ, АММ01 нацеленное на ВЭБ и MED18852 нацеленное на НА-стволы гриппа. Первичные В-клетки были эффективно перепрограммированы всеми 4 конструкциями, которые включали антитела с легкими цепями как каппа (Palivizumab, VRC01, Medi8852), так и лямбда (АММ01) (Фиг. 28). Эти данные демонстрируют гибкий и широко применимый характер платформы emAb.

[0206] Блокирование выработки эндогенной тяжелой цепи Ig важно для максимизации выработки emAb и минимизации потенциала для производства неизвестных эндогенных антител из генетически модифицированных клеток. Линия В-клеток RAMOS эндогенно экспрессирует IgH в паре с легкой цепью лямбда. Конструирование этих клеток с помощью α РСВ-emAb, связанного с легкой цепью каппа, позволяет использовать поверхностную экспрессию легкой цепи лямбда в качестве эффективной меры экспрессии IgH. Кроме того, клетки RAMOS подверглись транслокации с-тус, разрушая один аллель IgH, так что любая вставка emAb при необходимости будет в продуктивном аллеле (Фиг. 29A). Входные клетки RAMOS

экспрессируют высокие уровни легкой цепи лямбда на поверхности, тогда как клетки, экспрессирующие α PCV-emAb, почти полностью потеряли экспрессию легкой цепи лямбда (Фиг. 29B). Эти данные указывают на то, что вставка emAb в продуктивный аллель может эффективно блокировать экспрессию эндогенного IgH. Почти во всех первичных В-клетках один аллель IgH обладает продуктивной перестройкой VDJ, тогда как другой аллель не подвергался рекомбинации VDJ или был непродуктивно рекомбинирован. Однако оба этих аллеля обладают потенциальными сайтами для вставки emAb (Фиг. 29C). Чтобы проверить эффекты вставки emAb, очищенные легкие цепи лямбда, экспрессирующие первичные В-клетки, были генетически модифицированы α PCV-emAb. Входные клетки продолжали экспрессировать эндогенное антитело в паре с легкой цепью лямбда на поверхности. Напротив, половина α В-клеток, сконструированных из PCV-emAb, утратила экспрессию легкой цепи лямбда (Фиг. 29D). Дифференциальные паттерны экспрессии, наблюдаемые в RAMOS и первичных В-клетках, позволяют предположить, что вставка emAb может блокировать эндогенную экспрессию IgH, если она встроена в продуктивный аллель. Дифференциальная экспрессия поверхностной легкой цепи представляет собой способ очистки клеток, которые экспрессируют исключительно конструкцию emAb. Альтернативно, потенциал для вставки в любой аллель дает возможность клетки экспрессирующие двойное антитело emAb, либо путем отбора исходного пула В-клеток антивирусной памяти для конструирования, либо путем вставки другой кассеты в каждый аллель.

[0207] Продемонстрировав способность конструировать В-клетки, была подтверждена защитная способность клеток на мышинных моделях вирусной инфекции. Мышинные emAb В-клетки получали с использованием процесса праймирования, электропорирования+доставки emAb-кассеты и экспансии, аналогичной той, которая используется в первичных В-клетках человека (Фиг. 30A). Электропорирование в сочетании с предварительно скомплексованными направляющей РНК и Cas9, и разрезание были высокоэффективными, что привело к неправильному восстановлению этой области в 80% анализируемой ДНК (Фиг. 30B). Доставка мышинной α PCV-emAb-кассеты через воспроизводимо модифицированные AAV мышинные В-клетки, с 8-24% В-клеток мыши связывающихся с PCV-F (Фиг. 30C, 30D). Вставку в 1-7% клеток также осуществляли с использованием двухцепочечной ДНК (дцДНК), содержащей короткие области гомологии, вместо AAV (Фиг. 30C, 30D (см. также Пример 1), предлагая потенциал для конструирования emAb В-клеток с использованием чисто синтетических компонентов. Высокие титры секретируемых сконструированных антител также могут быть обнаружены в культуральных супернатантах, полученных с помощью обеих методик (Фиг. 30E).

[0208] Для проверки потенциала противовирусной защиты $1,5 \times 10^7$ генетически модифицированных В-клеток мыши вводили мышам Balb/c/byJ дикого типа с последующим взятием крови и заражением PCV (Фиг. 31A). PCV-специфические антитела и генетически модифицированные В-клетки присутствовали в крови через 6 суток после

переноса генетически модифицированных В-клеток (Фиг. 31В, 31С). Важно отметить, что мыши, получающие генетически модифицированные В-клетки, были почти полностью защищены от инфекции РСВ (Фиг. 31D). Эта защита приблизилась к защите, обеспечиваемой инъекцией паливизумаба за 2 суток до заражения (Фиг. 31D). Перенос смешанных клеток человека emAb, нацеленных на РСВ и вирус гриппа, у мышей NOD-scid IL2Rgammanull (NSG) приводит к получению сывороточных титров антител, нацеленных на оба вируса (Фиг. 32А, 32В). Эти результаты показывают, что описанные в данном документе генетически модифицированные В-клетки защищают от вирусной инфекции.

[0209] Способы. Разработка шаблонных последовательностей одноцепочечных антител. *Человек*: Конструкция антитела включала промоторную область тяжелой цепи IgVH1-69 (SEQ ID NO: 111), легкую цепь полноразмерного антитела (например, SEQ ID NO: 113, 145, 154 и 161 (нуклеотидная) и SEQ ID NO: 119, 148, 157 и 165 (аминокислотная)), 57-аминокислотный глицин-сериновый линкер, содержащий 3 tandemные копии мотива Streptag II (SEQ ID NO: 116 (нуклеотид) и SEQ ID NO: 122 (аминокислотная)), переменную область тяжелой цепи (например, SEQ ID NO: 117, 147, 156 и 164 (нуклеотидная) и SEQ ID NO: 123, 150, 159 и 168 (аминокислотная)) и границу сплайсинга с 60 парами оснований фланкирующей последовательности, полученной из соответствующих переменных областей IgHJ (например, SEQ ID NO: 124 и 151).

[0210] *Мышь*: Конструкции антител включали промотор тяжелой цепи J5558H10 (SEQ ID NO: 128, V.A Love et. Al Molecular Immunology 2000), полноразмерную легкую цепь кодон-оптимизированных антител (например, SEQ ID NO: 130 (нуклеотид) и SEQ ID NO: 135 (аминокислота)), 57-аминокислотный глицин-сериновый линкер, содержащий три tandemные копии последовательности Streptag II (SEQ ID NO: 116 (нуклеотид) и SEQ ID NO: 122 (аминокислота)), кодон-оптимизированную переменную область тяжелой цепи антитела (например, SEQ ID NO: 133 (нуклеотид) и SEQ ID NO: 138 (аминокислота)) и границу сплайсинга с 60 парами фланкирующей последовательности, полученной из генного сегмента IGHJ3 мыши (SEQ ID NO: 139).

[0211] Полноразмерные последовательности типичных конструкций антител представлены на Фиг. 25В-25I.

[0212] Получение рекомбинантных векторов AAV. Векторы AAV генерировали путем тройной трансфекции вектора AAV, капсида серотипа 6 и аденовирусной плазмиды-помощника (pHelper) в клетки HEK293T с использованием PEI. Через 24 часа после трансфекции среду меняли на бессывороточную среду DMEM, и через 72 часа клетки собирали, лизировали путем замораживания-оттаивания, обрабатывали бензоназой, очищали в градиенте иодиксанола с последующим концентрированием в ФСБ с использованием колонки Amicon Ultra-15 (EMD Millipore)(Choi, et al., (2007). Curr Protoc Mol Biol Chapter 16: Unit 16 25). Титры вируса в исходном растворе определяли с помощью кПЦР геномов AAV и они варьировались от 5×10^{10} до 1×10^{12} на микролитр(Aurnhammer, et al., (2012). Hum Gene Ther Methods 23(1): 18-28).

[0213] Получение дцДНК-шаблонов emAb мыши.

[0214] αШаблоны РСВ-emAb амплифицировали и добавляли короткие области гомологии с помощью модифицированных олигоДНК следующим образом:

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

/5Phos/**ACCACCTCTGTGACAGCATTTATACAGTATCCGATGGACAAGTGAGTGTCTCAGGTTAGGATTCT** (SEQ ID NO: 278)

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

T*A*A*AGAAAGTGCCCCACTCCACTCTTTGTCCSTATGCTTGACCACAATGAATACTCCCACC (SEQ ID NO: 279)

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

[0215] Клеточные линии. 3T3-msCD40L были получены от доктора Марка Коннора в NIH AIDS Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH: Номер в каталоге #12535. Клетки 3T3 культивировали в среде DMEM с 10% фетальной телячьей сывороткой (Gibco), 100 ед/мл пенициллина плюс 100 мкг/мл стрептомицина (Gibco) и G418 (350 мкг/мл).

[0216] Клетки RAMOS были получены от ATCC (CRL-1596™). Клетки RAMOS культивировали в среде RPMI с 10% фетальной телячьей сывороткой (Gibco) и 100 ед/мл пенициллина плюс 100 мкг/мл стрептомицина (Gibco).

[0217] Культура В-клеток мыши и электропорирование. Среда В-клеток включала среду RPMI с 10% фетальной телячьей сывороткой (Gemini Biosciences), 10 mM HEPES (Gibco), 1 mM пируват натрия (Gibco), 55 мкМ бета-меркаптоэтанол (Sigma) и 100 ед/мл пенициллина плюс 100 мкг/мл стрептомицина (Gibco) за исключением стадий, свободных от антибиотиков, как отмечено.

[0218] В-клетки выделяли из селезенки и лимфатических узлов с помощью негативного отбора с помощью магнитных микроносителей (Miltenyi) и культивировали в течение 24 часов при 2×10^6 /мл в В-клеточной среде с добавлением 100 нг/мл рекомбинантного свободного от меченного НА носителя CD40L мыши (R&D systems), 100 нг/мл антитела к НА (клон 543851, R&D systems) и 4 нг/мл IL-4 мыши (R&D systems). Затем В-клетки электропорировали с использованием системы трансфекции Neon следующим образом. Белок Cas9 (Invitrogen) и синтетическую онРНК (Synthego) смешивали в соотношении 1 мкг Cas9 к 300 нг онРНК и инкубировали при комнатной температуре в течение по меньшей мере 10 минут. В-клетки промывали ФСБ и суспендировали в буфере Neon T с конечной плотностью $2,5 \times 10^7$ клеток/мл с 12 мкг Cas9 RNP/ 10^6 клеток. Для условий дцДНК в электропорирование также включали 7,5 мкг шаблона дцДНК/ 10^6 клеток. Клетки подвергали электропорированию (1675 В, 10 миллисекунд, 3 импульса) и сразу же распределяли в предварительно нагретую среду без антибиотиков. Для условий ААВ концентрированный ААВ в ФСБ добавляли до 15% от

конечного объема культуры. После электропорирования В-клетки размножали в течение дополнительных 48 часов с помощью среды В-клеток, дополненной 100 нг/мл рекомбинантного CD40L мыши без НА-тэга (R&D systems), 100 нг/мл антитела к НА (клон 543851, системы R&D), 4 нг/мл IL-4 мыши (R&D systems) и 20 нг/мл IL-21 мыши. (Biolegend). Для вторичного размножения В-клетки совместно культивировали с облученными (80 мкг) питающими клетками NIH 3T3-CD40L в присутствии 20 нг/мл IL-21 мыши. (Biolegend).

[0219] Культура В-клеток человека и электропорирование. Базальная среда для культуры В-клеток человека (hBCM) была в среде IMDM, с 10% FBS (Gemini Biosciences), 100 ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина (Gibco), за исключением стадий, свободных от антибиотиков, как отмечалось.

[0220] МКПК человека были получены от Онкологического исследовательского центра им. Фреда Хатчинсона. Клетки оттаивали и отбирали с использованием негативного отбора с использованием набора для выделения В-клеток Miltenyi II (человек) в соответствии с протоколом производителя. Выделенные клетки ресуспендировали при $0,5-1,0 \cdot 10^6$ клеток/мл в hBCM с добавлением 100 нг/мл MEGACD40L (Enzo Life Sciences), 50 нг/мл рекомбинантного IL-2 (Biolegend), 50 нг/мл IL-10 (Shenandoah Biotech), 10 нг/мл IL-15 (Shenandoah Biotech), 1 мкг/мл CpG ODN 2006 (IDT).

[0221] После 48 часов стимуляции клетки подвергали электропорированию с использованием Neon Transfection System. Белок Cas9 (Invitrogen) и онРНК H7 (Synthego) предварительно смешивали в соотношении 2:1 в буфере Т в течение 20 минут при комнатной температуре. Клетки промывали ФСБ (Gibco) и ресуспендировали в буфере Т при конечной концентрации $2,5 \cdot 10^7$ клеток/мл в буфере Т, содержащем предварительно комплексированный RNP Cas9. Смесь Cell-RNP загружали в наконечник для трансфекции Neon 10 мкл и подвергали электропорированию в соответствии с протоколом производителя с настройками 1750 В, 20 мс и 1 импульс. Сразу после электропорирования клетки высевали в стимулирующую среду, как описано выше, без антибиотиков. Через 30 минут добавляли ААВ до конечной концентрации 10-15% объема культуры и тщательно перемешивали. Через 2-4 часа клетки переносили в большую чашку для культивирования, чтобы обеспечить дальнейшее размножение.

[0222] Через двое суток после электропорирования клетки окрашивали меченым флуорохромом антигеном или стрептактином, и отбирали генетически модифицированные клетки. Для вторичной экспансии В-клетки совместно культивировали с облученными (80 мкг) питающими клетками NIH 3T3-CD40L в hBCM, содержащими 5 мкг/мл человеческого рекомбинантного инсулина (Sigma), 50 мкг/мл трансферрина (Sigma), 50 нг/мл рекомбинантных IL-2 (Biolegend), 20 нг/мл IL-21 (Biolegend) и 10 нг/мл IL-15 (Shenandoah Biotech).

[0223] Чтобы стимулировать дифференцирование в плазматические клетки, клетки переносили из условий размножения в условия свежего культивирования без питания,

содержащие hVCM, дополненный 5 мкг/мл рекомбинантного инсулина человека (Sigma), 50 мкг/мл Transferrin (Sigma), 500 ед/мл универсальным белком IFN типа I (R&D Systems), 50 нг/мл IL-6 (Shenendoah Biotech), 10 нг/мл IL-15 (Shenendoah Biotech).

[0224] Оценка активности онРНК TIDE. Общую геномную ДНК выделяли из имитационных и обработанных cas9/онРНК клеток через 3-5 суток после электропорирования. Область 500-600 пар оснований, фланкирующую сайт-мишень онРНК, амплифицировали с помощью ПЦР с использованием следующих олигонуклеотидов:

Мышь:

Прямая: GGCTCCACCAGACCTCTCTA (SEQ. ID NO: 274)

Обратная: AACCTCAGTCACCGTCTCCT (SEQ ID NO: 275)

Человек:

Прямая: ACAGTAAGCATGCCTCCTAAG (SEQ ID NO: 276)

Обратная: GCCACTCTAGGGCCTTTGTT (SEQ ID NO: 277)

[0225] Очищенный продукт ПЦР секвенировали по Сэнгеру, и частоту вставок/делений в электропорированных клетках Cas9/онРНК относительно имитационных электропорированных клеток определяли с использованием алгоритма ICE (Hsiao, et al., (2018). "Inference of CRISPR Edits from Sanger Trace Data." bioRxiv).

[0226] Белковые антигены. Белок слияния РСВ-F, комплекс ВЭБ gh/gI и модифицированный антиген Вич env (426с TM4 d1-3) получали, как описано (McLellan, et al., (2013). Science 342(6158): 592-598; McGuire, et al., (2016). Nat Commun 7: 10618; Snijder, et al., (2018). Immunity 48(4): 799-811 e799). Стабилизированный НА-ствол гриппа был получен из клона 3925 VRC, полученного из штамма H1 1999 NC, как описано в (Yassine, et al., (2015). Nat Med 21(9): 1065-1070). Мономерный белок преслияния РСВ-F метили Alexa-488 (Thermo Fisher). Все другие белки были конъюгированы с биотином с использованием молярного соотношения биотин:белок от 0,8 до 2 с последующей тетрамеризацией со стрептавидином-PE или -APC (прозимом).

[0227] Проточная цитометрия. Проточный цитометрический анализ проводили на машине FACSymphony (BD bioscience), клетки сортировали на Aria II (BD bioscience), а данные анализировали с использованием программного обеспечения FlowJo (Tree Star).

[0228] EmAb терапевтические исследования на мышах. Исследования на животных были одобрены и проведены в соответствии с Комитетом по уходу и использованию животных при Онкологическом центре им. Фреда Хатчинсона.

[0229] Для заражения РСВ EmAb или контрольные В-клетки вводили в виде однократной внутрибрюшинной (в/б) дозы $1,5 \times 10^7$ клеток. Для пассивного переноса паливизумаба, мыши получали однократную дозу 15 мг/кг в/б. Был предложен GFP-экспрессирующий РСВ (в данном документе упоминается как РСВ для простоты) (Munir, et al., (2008). J Virol 82(17): 8780-8796). Мышей BALB/cByJ соответствующего возраста (Jackson Labs) интраназально инокулировали 10^6 БОЕ очищенного сахарозой РСВ в 40 мкл ФСБ. Легкие собирали на 5-е сутки после заражения, и титр определяли, как описано

ранее с помощью анализа бляшек (Murphy, et al., (1990). Vaccine 8(5): 497-502). Вкратце, легкие гомогенизировали в 2 мл среды в диссоциаторе GentleMACS, осветляли центрифугированием при $400 \times g$ в течение 10 минут, затем быстро замораживали и хранили при $-80 \text{ }^\circ\text{C}$. Супернатант разбавляли 1:10 и 1:20 в среде DMEM в двух экземплярах. 100 мкл каждого разведения добавляли к слитым клеткам Vero в 24-луночных планшетах в течение 2 часов при 37°C . Затем добавляли слой 0,8% метилцеллюлозы и планшеты инкубировали в течение 5 суток перед визуализацией на сканере Turphoon с настройками фильтра для GFP. Титр в БОЕ/легкое рассчитывали путем подсчета количества бляшек при самом высоком положительном разведении и поправки на коэффициент разбавления.

[0230] Для приживления человеческих клеток В-клетки человека emAb вводили в виде однократной в.б.-дозы со специфичностью 5×10^6 клеток/emAb (всего 1×10^7) мышам NOD-scid IL2Rgamma^{null} (NSG) (произведенным селекционной компанией FHCRC). Через 7 суток после переноса отбирали кровь и определяли титры emAb человека на РСВ-F и HA-ствол в сыворотке с помощью ИФА.

[0231] Статистический анализ. Статистический анализ проводили с использованием GraphPad Prism 7. Парные сравнения проводились с использованием непарного t-критерия с поправкой Уэлча.

[0232] Описанные в данном документе последовательности нуклеиновых кислот показаны с использованием стандартных буквенных сокращений для нуклеотидных оснований, как определено в 37 C.F.R. §1.822. В некоторых случаях показана только одна цепь каждой последовательности нуклеиновой кислоты, но комплементарная цепь понимается как включенная в варианты осуществления, где это было бы целесообразно. Например, последовательности, комплементарные сайтам-мишеням, включая SEQ ID NO: 5-84 представляют последовательности нРНК, для нацеливания на эти сайты.

[0233] Может быть использована любая нуклеиновая кислота, которая кодирует выбранную конструкцию на основе антитела, как описано в данном документе. Варианты последовательностей нуклеиновых кислот, раскрытые в данном документе, включают различные полиморфизмы, мутации и изменения последовательности, в которых различия в последовательности существенно не влияют на функцию кодируемого белка. Термин нуклеиновая кислота или «ген» может включать не только кодирующие последовательности, но также регуляторные области, такие как промоторы, энхансеры и области терминации. Термин далее может включать все интроны и другие последовательности ДНК, сплайсированные из транскрипта мРНК, а также варианты, полученные из альтернативных сайтов сплайсинга. Кодирующая нуклеиновая кислота может представлять собой ДНК или РНК, которая направляет экспрессию одной или более выбранных конструкций на основе антител. Эти последовательности нуклеиновой кислоты могут представлять собой последовательность цепи ДНК, которая транскрибируется в РНК, или последовательность РНК, которая транслируется в белок. Последовательности нуклеиновой кислоты включают как полноразмерные

последовательности нуклеиновой кислоты, так и последовательности неполной длины, полученные из полноразмерного белка. Последовательности также могут включать вырожденные кодоны нативной последовательности или последовательности, которые могут быть введены для обеспечения предпочтительности кодонов в конкретном типе клеток. Последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие выбранные конструкции на основе антител, могут быть легко получены из соответствующей аминокислотной последовательности выбранной конструкции на основе антител.

[0234] «Варианты» белковых последовательностей включают те, которые имеют одну или более аминокислотных добавок, делеций, позиций останковки или замен по сравнению с белковой последовательностью, раскрытой в другом месте данного документа.

[0235] Замена аминокислоты может быть консервативной или неконсервативной заменой. Варианты белковой последовательности, раскрытые в данном документе, могут включать варианты, имеющие одну или более консервативных аминокислотных замен. «Консервативная замена» или «консервативная аминокислотная замена» включает замену, обнаруженную в одной из следующих групп консервативных замен: Группа 1: A, G, S, T; Группа 2: D, E; Группа 3: N, Q; Группа 4: R, K, H; Группа 5: I, L, M, V; и группа 6: F, Y, W.

[0236] Кроме того, аминокислоты могут быть сгруппированы в консервативные замещающие группы по сходной функции, химической структуре или составу (например, кислотная, основная, алифатическая, ароматическая или серосодержащая). Например, алифатическая группа может включать, в целях замещения, G, A, V, L и I. Другие группы, включая аминокислоты, которые считаются консервативными заменами друг для друга, включают: серосодержащие: M и C; кислотные: D, E, N и Q; небольшие алифатические, неполярные или слегка полярные остатки: A, S, T, P и G; полярные, отрицательно заряженные остатки и их амиды: D, N, E и Q; полярные, положительно заряженные остатки: H, R и K; большие алифатические неполярные остатки: M, L, I, V и C; и большие ароматические остатки: F, Y и W.

[0237] Неконсервативные замены включают те, которые значительно влияют на: структуру пептидного остова в области изменения (например, структуру альфа-спирали или бета-структуры); заряд или гидрофобность молекулы в целевом сайте; или основная часть боковой цепи. Неконсервативные замены, которые, как правило, должны вызывать наибольшие изменения в свойствах белка, представляют собой такие, в которых (i) гидрофильный остаток (например, S или T) можно заменить (или на) гидрофобным остатком (например, L, I, F, V или A); (ii) C или P могут быть заменены (или на) любым другим остатком; (iii) остаток, имеющий электроположительную боковую цепь (например, K, R или H), может быть заменен (или на) электроотрицательным остатком (например, Q или D); или (iv) остаток, имеющий объемную боковую цепь (например, F), может быть заменен (или на) остатком, не имеющим объемной боковой цепи (например, G). Дополнительную информацию можно найти в Creighton (1984) *Proteins*, W.H. Freeman

and Company.

[0238] Варианты последовательностей нуклеиновой кислоты и белка, раскрытые в данном документе, также включают последовательности, идентичные на по меньшей мере 70%, на по меньшей мере 80%, на по меньшей мере 85%, на по меньшей мере 90%, на по меньшей мере 95%, на по меньшей мере 96%, на по меньшей мере 97%, на по меньшей мере 98% или на по меньшей мере 99% эталонной последовательности, раскрытой в настоящем документе.

[0239] «Процент (%) идентичности последовательности» по отношению к последовательностям, указанным в настоящем документе, определяется как процент остатков нуклеиновой кислоты или аминокислоты в последовательности-кандидате, которые идентичны остаткам нуклеиновой кислоты или аминокислоты в контрольной последовательности после выравнивания последовательностей и введение пропусков, если необходимо, для достижения максимальной процентной идентичности последовательности. Выравнивание в целях определения процента идентичности нуклеиновой кислоты или аминокислотной последовательности может быть достигнуто различными способами, которые известны специалисту в данной области техники, например, с использованием общедоступного компьютерного программного обеспечения, такого как BLAST, BLAST-2, ALIGN, ALIGN-2 или Программное обеспечение Megalign (DNASTAR). Специалисты в данной области техники могут определить подходящие параметры для измерения выравнивания, включая любые алгоритмы, необходимые для достижения максимального выравнивания по всей длине сравниваемых последовательностей. Например, % значения идентичности последовательности, генерируемых с помощью компьютерной программы WU-BLAST-2 (Altschul et al., *Methods in Enzymology*, 266:460-480 (1996)), использует несколько параметров поиска, большинство из которых установлены на значения по умолчанию. Те, которые не установлены в значения по умолчанию (то есть регулируемые параметры), устанавливаются со следующими значениями: интервал перекрытия=1, доля перекрытия=0,125, пороговая длина слова (T) = 11 и матрица оценки BLOSUM62.

[0240] Варианты обычно проявляют ту же качественную биологическую активность и вызывают по существу сходный биологический ответ с последовательностью нуклеиновой кислоты или пептида сравнения, хотя варианты могут быть выбраны для модификации характеристик эталонной нуклеиновой кислоты или пептида по мере необходимости. Скрининг вариантов может быть выполнен с использованием экспериментальных протоколов, описанных в настоящем документе.

[0241] Как будет понятно специалисту в данной области техники, каждый раскрытый в настоящем документе вариант осуществления может содержать, состоять по существу или состоять из его конкретного заявленного элемента, стадии, ингредиента или компонента. Таким образом, термины «включать» или «включая» следует толковать так, что они включают: «включают, состоят или состоят по существу из». Термин «содержит» или «содержать» означает, что он включает, но не ограничивается ими, и позволяет

включать неуказанные элементы, стадии, ингредиенты или компоненты даже в больших количествах. Переходная фраза «состоящий из» исключает любой элемент, стадию, ингредиент или компонент, который не указан. Переходная фраза «состоящий по существу из» ограничивает объем варианта осуществления указанными элементами, стадиями, ингредиентами или компонентами и теми, которые не оказывают существенного влияния на вариант осуществления. Материальный эффект может вызвать статистически значимое снижение экспрессии В-клеток выбранного антитела.

[0242] Если не указано иное, все числа, выражающие количества ингредиентов, свойств, такие как молекулярная масса, условия реакции и так далее, используемые в описании и формуле изобретения, следует понимать как измененные во всех случаях термином «около». Соответственно, если не указано иное, числовые параметры, изложенные в описании и прилагаемой формуле изобретения, являются приблизительными значениями, которые могут варьироваться в зависимости от желаемых свойств, которые должны быть получены с помощью настоящего изобретения. По меньшей мере, и не как попытка ограничить применение доктрины эквивалентов к объему формулы изобретения, каждый числовой параметр должен по меньшей мере истолковываться с учетом числа сообщаемых значащих цифр и путем применения обычных методов округления. Когда требуется дополнительная ясность, термин «около» имеет значение, разумно приписанное ему специалистом в данной области техники, когда используется в сочетании с указанным числовым значением или диапазоном, то есть обозначает несколько большее или несколько меньшее, чем указанное значение или диапазон в пределах $\pm 20\%$ от заявленного значения; $\pm 19\%$ от заявленного значения; $\pm 18\%$ от заявленного значения; $\pm 17\%$ от заявленного значения; $\pm 16\%$ от заявленного значения; $\pm 15\%$ от заявленного значения; $\pm 14\%$ от заявленного значения; $\pm 13\%$ от заявленного значения; $\pm 12\%$ от заявленного значения; $\pm 11\%$ от заявленного значения; $\pm 10\%$ от заявленного значения; $\pm 9\%$ от заявленного значения; $\pm 8\%$ от заявленного значения; $\pm 7\%$ от заявленного значения; $\pm 6\%$ от заявленного значения; $\pm 5\%$ от заявленного значения; $\pm 4\%$ от заявленного значения; $\pm 3\%$ от заявленного значения; $\pm 2\%$ от заявленного значения; или $\pm 1\%$ от заявленного значения.

[0243] Несмотря на то, что числовые диапазоны и параметры, определяющие широкий объем изобретения, являются приблизительными, числовые значения, приведенные в конкретных примерах, сообщаются настолько точно, насколько это возможно. Однако любое числовое значение по своей природе содержит определенные ошибки, неизбежно возникающие в результате стандартного отклонения, обнаруженного в их соответствующих тестовых измерениях.

[0244] Термины в единственном числе и подобные ссылки, используемые в контексте описания изобретения (особенно в контексте следующей формулы изобретения), должны толковаться как охватывающие как единственное, так и множественное число, если в данном документе не указано иное или явно противоречит контексту. Перечисление диапазонов значений в данном документе просто предназначено

для того, чтобы служить кратким способом индивидуальной ссылки на каждое отдельное значение, попадающее в диапазон. Если в данном документе не указано иное, каждое отдельное значение включается в описание, как если бы оно было отдельно указано в данном документе. Все способы, описанные в данном документе, могут быть выполнены в любом подходящем порядке, если иное не указано в настоящем документе или иное явно не противоречит контексту. Использование любых и всех примеров или примерных формулировок (например, «таких как»), представленных в настоящем документе, предназначено просто для лучшего освещения изобретения и не ограничивает объем притязаний, заявленных иным образом. Ни одна терминология в описании не должна быть истолкована как указывающая на любой не заявленный элемент, существенный для практического применения изобретения.

[0245] Группы альтернативных элементов или вариантов осуществления изобретения, раскрытых в данном документе, не должны рассматриваться как ограничения. Каждый член группы может упоминаться и запрашиваться индивидуально или в любой комбинации с другими членами группы или другими элементами, представленными в данном документе. Предполагается, что один или более членов группы могут быть включены или исключены из группы по соображениям удобства и/или патентоспособности. Когда происходит любое такое включение или удаление, считается, что спецификация содержит измененную группу, таким образом выполняя письменное описание всех групп Маркуша, используемых в прилагаемой формуле изобретения.

[0246] Некоторые варианты осуществления этого изобретения описаны в данном документе, включая лучший способ, известный изобретателям для осуществления изобретения. Конечно, изменения в этих описанных вариантах осуществления станут очевидными для специалистов в данной области техники после прочтения предшествующего описания. Изобретатель ожидает, что квалифицированные специалисты будут использовать такие варианты в зависимости от обстоятельств, и изобретатели намерены применять изобретение на практике иным образом, чем конкретно описано в данном документе. Соответственно, это изобретение включает все модификации и эквиваленты объекта изобретения, перечисленного в прилагаемой формуле изобретения, как это разрешено применимым законодательством. Более того, любая комбинация вышеописанных элементов во всех возможных их вариантах охватывается изобретением, если иное не указано в данном документе или иное явно не противоречит контексту.

[0247] Кроме того, многочисленные ссылки были сделаны на патенты, печатные публикации, статьи в научном журнале и другие письменные тексты по всему описанию (ссылки на материалы в данном документе). Каждый из упомянутых материалов индивидуально включен в настоящий документ посредством ссылки во всей их полноте для включения основной идеи.

[0248] В заключение следует понимать, что варианты осуществления изобретения, раскрытые в настоящем документе, являются иллюстрацией принципов настоящего

изобретения. Другие модификации, которые могут быть использованы, входят в объем изобретения. Таким образом, в качестве примера, но не ограничения, альтернативные конфигурации настоящего изобретения могут использоваться в соответствии с изложенными в данном документе идеями. Соответственно, настоящее изобретение не ограничивается этим точно, как показано и описано.

[0249] Подробности, показанные в данном документе, приведены в качестве примера и в целях иллюстративного обсуждения только предпочтительных вариантов осуществления настоящего изобретения и представлены в целях предоставления того, что считается наиболее полезным и легко понятным описанием принципов и концептуальных аспектов различных вариантов осуществления изобретения. В связи с этим не предпринимаются попытки показать структурные детали изобретения более подробно, чем это необходимо для фундаментального понимания изобретения, описание, взятое с графическими материалами и/или примерами, делающими очевидным для специалистов в данной области техники, как формы изобретения могут быть воплощены на практике.

[0250] Определения и пояснения, используемые в настоящем раскрытии, предназначены для управления в любой будущей конструкции, если только они не будут четко и недвусмысленно изменены в следующих примерах или когда применение значения делает любую конструкцию бессмысленной или по существу бессмысленной. В тех случаях, когда конструкция этого термина делает его бессмысленным или по существу бессмысленным, определение следует взять из Webster's Dictionary, 3rd Edition или из словаря, известного специалистам в данной области техники, такого как Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology (Ed. Anthony Smith, Oxford University Press, Oxford, 2004).

1. Способ генетической модификации В-клеток для экспрессии паливизумаба, включающий вставку в SEQ ID NO: 1 генетической конструкции, содержащей промотор тяжелой цепи и последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей всю легкую цепь паливизумаба, линкер Gly-Ser и вариабельную область тяжелой цепи паливизумаба, что позволяет генетически сконструировать В-клетки для экспрессии паливизумаба.

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

3. Способ по п. 2, в котором эндогенный геном В-клеток, кодирующий вариабельную тяжелую цепь не вырезается во время генетической модификации.

4. Способ по п. 2, в котором выбранное антитело представляет собой антитело к респираторно-синцитиальному вирусу (РСВ), антитело к вирусу иммунодефицита

человека (ВИЧ), антитело к вирусу Денге, антитело к *Bordatella pertussis*, антитело к вирусу гепатита С, антитело к вирусу гриппа, антитело к вирусу парагриппа, антитело к метапневмовирусу (МПВ), антитело к цитомегаловирусу, антитело к вирусу Эпштейна - Барра; антитело к вирусу простого герпеса, антитело к бактериальному токсину *Clostridium difficile* или антитело к фактору некроза опухоли (ФНО).

5. Способ по п. 2, в котором генетическая конструкция содержит SEQ ID NO: 102-175, 278, 279 или 280-289.

6. Способ по п. 2, в котором гибкий линкер находится между полноразмерной легкой цепью выбранного антитела и вариабельной областью тяжелой цепи выбранного антитела.

7. Способ по п. 2, в котором гибкий линкер выбран из SEQ ID NO: 180-184.

8. Способ по п. 2, в котором гибкий линкер представляет собой линкер Gly-Ser, содержащий 50-80 аминокислот.

9. Способ по п. 2, в котором гибкий линкер представляет собой линкер Gly-Ser, содержащий 57 аминокислот.

10. Способ по п. 2, в котором гибкий линкер представляет собой SEQ ID NO: 122.

11. Способ по п. 2, в котором пропускающий элемент находится между полноразмерной легкой цепью выбранного антитела и вариабельной областью тяжелой цепи выбранного антитела.

12. Способ по п. 2, в котором пропускающий элемент представляет собой саморасщепляющийся пептид.

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

14. Способ по п. 2, в котором пропускающий элемент представляет собой внутренний участок посадки рибосомы (IRES).

15. Способ по п. 2, в котором промотор тяжелой цепи выбран из SEQ ID NO: 111 и 128.

16. Способ по п. 2, в котором промотором тяжелой цепи представляет собой IgVH1-69 или J558H10.

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

18. Способ по п. 2, в котором сигнальный пептид получен из тяжелой цепи IgH человека или легкой цепи IgL человека.

19. Способ по п. 2, в котором генетическая конструкция содержит гомологичные плечи.

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

21. Способ по п. 2, в котором генетическая конструкция кодирует тэг.

22. Способ по п. 21, в котором тэг включает STREPTAG[®], STREP[®] тэг II, His-тэг, Flag-тэг, Xpress-тэг, Avi-тэг, кальмодулиновый тэг, полиглутаматный тэг, HA-тэг, Мус-

тэг, Nus-тэг, S-тэг, SBP-тэг, Softag 1, Softag 3 или V5-тэг.

23. Способ по п. 21, в котором тэг содержит SEQ ID NO: 122 или 195-204.

24. Способ по п. 2, дополнительно включающий доставку последовательности направляющей РНК (нРНК), выбранной из одной или более SEQ ID NO: 87-89 и 290-366, и нуклеазы для В-клеток.

25. Способ по п. 24, в котором доставка осуществляется посредством электропорирования, наночастицы или вирус-опосредованной доставки.

26. Способ по п. 2, в котором генетическая конструкция является частью вирусного вектора на основе аденоассоциированного вируса.

27. Способ по п. 24, в котором нРНК и нуклеаза доставляются посредством электропорирования, а генетическая конструкция доставляется как часть вирусного вектора на основе аденоассоциированного вируса.

28. Способ по п. 24, в котором нуклеаза представляет собой Cas9 или Cpf1.

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

30. Способ по п. 2, в котором выбранное антитело представляет собой антитело к РСВ, содержащее паливизумаб, АВ1128 или ab20745.

31. Способ по п. 2, в котором выбранное антитело представляет собой: паливизумаб, содержащий тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO: 138, и легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 136; паливизумаб, содержащий тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO: 138, и легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 205; антитело к РСВ, содержащее тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO: 123, и легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 120; или антитело к РСВ, содержащее тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO: 123, и легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 206.

32. Способ по п. 2, в котором выбранное антитело представляет собой антитело к РСВ, содержащее CDRH1, содержащую SEQ ID NO: 207, CDRH2, содержащую SEQ ID NO: 208, CDRH3, содержащую SEQ ID NO: 209; CDRL1, содержащую SEQ ID NO: 210, CDRL2, содержащую SEQ ID NO: 211, и CDRL3, содержащую SEQ ID NO: 212.

33. Способ по п. 2, в котором выбранное антитело представляет собой антитело к ВИЧ, содержащее 10E8, VRC01, ab18633 или 39/5.4A.

34. Способ по п. 2, в котором выбранное антитело представляет собой антитело к ВИЧ, содержащее тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO: 150, и легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 149.

35. Способ по п. 2, в котором выбранное антитело представляет собой антитело к ВИЧ, содержащее CDRH1, содержащую SEQ ID NO: 213, CDRH2, содержащую SEQ ID NO: 214, CDRH3, содержащую SEQ ID NO: 215, CDRL1, содержащую SEQ ID NO: 216, CDRL2, содержащую SEQ ID NO: 217, и CDRL3, содержащую SEQ ID NO: 218 или CDRH1, содержащую SEQ ID NO: 219, CDRH2, содержащую SEQ ID NO: 220, CDRH3,

содержащую SEQ ID NO: 221, CDRL1, содержащую QYGS, CDRL2, содержащую SGS, и CDRL3, содержащую SEQ ID NO: 222.

36. Способ по п. 2, в котором выбранное антитело представляет собой антитело к вирусу Денге, содержащее антитело 55, DB2-3, ab155042 или ab80914.

37. Способ по п. 2, в котором выбранное антитело представляет собой антитело к вирусу Денге, содержащее CDRH1, содержащую SEQ ID NO: 223, CDRH2, содержащую SEQ ID NO: 224, CDRH3, содержащую SEQ ID NO: 225; CDRL1, содержащую SEQ ID NO: 226, CDRL2, содержащую SEQ ID NO: 227, и CDRKL3, содержащую SEQ ID NO: 228 или CDRH1, содержащую SEQ ID NO: 229, CDRH2, содержащую SEQ ID NO: 230, CDRH3, содержащую SEQ ID NO: 231, CDRL1, содержащую SEQ ID NO: 232, CDRL2, содержащую SEQ ID NO: 233, и CDRL3, содержащую SEQ ID NO: 234.

38. Способ по п. 2, в котором выбранное антитело представляет собой антитело к вирусу коклюша, содержащее тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO: 235, и легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 236.

39. Способ по п. 2, в котором выбранное антитело представляет собой антитело к вирусу гепатита С, содержащее MAB8694 или C7-50.

40. Способ по п. 2, в котором выбранное антитело представляет собой антитело к вирусу гепатита С, содержащее CDRH1, содержащую SEQ ID NO: 237, CDRH2, содержащую SEQ ID NO: 238, CDRH3, содержащую SEQ ID NO: 239, CDRL1, содержащую SEQ ID NO: 240, CDRL2, содержащую SEQ ID NO: 241, и CDRL3, содержащую SEQ ID NO: 242.

41. Способ по п. 2, в котором выбранное антитело представляет собой антитело к вирусу гриппа, содержащее C102.

42. Способ по п. 2, в котором выбранное антитело представляет собой антитело к вирусу гриппа, содержащее тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO: 159, и легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 158.

43. Способ по п. 2, в котором выбранное антитело представляет собой антитело к вирусу гриппа, содержащее CDRH1, содержащую SEQ ID NO: 243, CDRH2, содержащую SEQ ID NO: 244, CDRH3, содержащую SEQ ID NO: 245, CDRL1, содержащую SEQ ID NO: 246, CDRL2, содержащую KTS, и CDRL3, содержащую SEQ ID NO: 247.

44. Способ по п. 2, в котором выбранное антитело представляет собой антитело к МПВ, содержащее MPE8.

45. Способ по п. 2, в котором выбранное антитело представляет собой антитело к ЦМВ, содержащее MCMV5322A, MCMV3068A, LJP538 или LJP539.

46. Способ по п. 2, в котором выбранное антитело представляет собой антитело к ВЭБ, содержащее тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO: 168, и легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 166.

47. Способ по п. 2, в котором выбранное антитело представляет собой антитело к РСВ, содержащее CDRH1, содержащую SEQ ID NO: 248, CDRH2, содержащую SEQ ID NO: 249, CDRH3, содержащую SEQ ID NO: 250, CDRL1, содержащую SEQ ID NO: 251,

CDRL2, содержащую SEQ ID NO: 252, и CDRL3, содержащую SEQ ID NO: 253.

48. Способ по п. 2, в котором выбранное антитело представляет собой антитело к ВПГ, содержащее HSV8-N и MB66.

49. Способ по п. 2, в котором выбранное антитело представляет собой антитело к *Clostridium difficile*, содержащее актоксумаб или безлотоксумаб.

50. Способ по п. 2, в котором выбранное антитело представляет собой антитело к ФНО, содержащее инфликсимаб, адалимумаб, этанерцепт, цертолизумаб или их приемлемые биоаналоги.

51. Способ по п. 2, в котором выбранное антитело представляет собой антитело к ФНО, содержащее тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO: 254, и легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 255; CDRH1, содержащую SEQ ID NO: 256, CDRH2, содержащую SEQ ID NO: 257, и CDRH3, содержащую SEQ ID NO: 258; CDRL1, содержащую SEQ ID NO: 259, CDRL2, содержащую SEQ ID NO: 260, и CDRL3, содержащую SEQ ID NO: 261; CDRH1, содержащую SEQ ID NO: 262, CDRH2, содержащую SEQ ID NO: 263, и CDRH3, содержащую SEQ ID NO: 264; CDRL1, содержащую SEQ ID NO: 265, CDRL2, содержащую SEQ ID NO: 266, и CDRL3, содержащую SEQ ID NO: 267; CDRH1, содержащую SEQ ID NO: 268, CDRH2, содержащую SEQ ID NO: 269, и CDRH3, содержащую SEQ ID NO: 270; или CDRL1, содержащую SEQ ID NO: 271, CDRL2, содержащую SEQ ID NO: 272, и CDRL3, содержащую SEQ ID NO: 273.

52. Способ по п. 2, в котором в генетической модификации используют последовательность, включающую любую из SEQ ID NO: 87, 88, 89, 90-175, 278-366.

53. Способ по п. 2, в котором В-клетка представляет собой В-клетку, вырабатывающую антитело, В-клетку памяти, наивную В-клетку, В1 В-клетку или В-клетку маргинальной зоны.

54. В-клетка, модифицированная по способу по любому из пп. 2-53.

55. В-клетка по п. 54, в котором В-клетка представляет собой В-клетку, секретирующую антитело, В-клетку памяти, наивную В-клетку, В1 В-клетку или В-клетку маргинальной зоны.

56. Способ обеспечения противоифекционного эффекта у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества В-клетки по п. 54, обеспечивая тем самым противоифекционный эффект.

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

58. Способ по п. 56, в котором введение заменяет протокол вакцинации.

59. Способ по п. 56, в котором субъект представляет собой иммуносупрессированный субъект.

60. Способ по п. 56, в котором иммуносупрессия у субъекта является частью схемы лечения, включающей трансплантацию костного мозга, трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток или введение генетически модифицированных гемопоэтических

стволовых клеток.

61. Способ обеспечения противовоспалительного эффекта у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества В-клеток по п. 54, обеспечивая тем самым противовоспалительный эффект.

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

63. Генетическая конструкция по п. 62, содержащая SEQ ID NO: 102-175 или 280-289.

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

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

66. Генетическая конструкция по п. 62, в которой гибкий линкер представляет собой линкер Gly-Ser, содержащий 50-80 аминокислот.

67. Генетическая конструкция по п. 62, в которой гибкий линкер представляет собой линкер Gly-Ser, содержащий 57 аминокислот.

68. Генетическая конструкция по п. 62, в которой гибкий линкер представляет собой SEQ ID NO: 122.

69. Генетическая конструкция по п. 62, в которой пропускающий элемент находится между полноразмерной легкой цепью выбранного антитела и переменной областью тяжелой цепи выбранного антитела.

70. Генетическая конструкция по п. 62, в которой пропускающий элемент представляет собой саморасщепляющийся пептид.

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

72. Генетическая конструкция по п. 62, в которой пропускающий элемент представляет собой внутренний участок посадки рибосомы (IRES).

73. Генетическая конструкция по п. 62, в которой промотор тяжелой цепи выбран из SEQ ID NO: 111 и 128.

74. Генетическая конструкция по п. 62, в которой промотор тяжелой цепи представляет собой IgVH1-69 или J558H10.

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

76. Генетическая конструкция по п. 62, в которой сигнальный пептид получен из тяжелой цепи IgH человека или легкой цепи IgL человека..

77. Генетическая конструкция по п. 62, в которой генетическая конструкция

содержит гомологичные плечи.

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

79. Генетическая конструкция по п. 62, в которой генетическая конструкция кодирует тэг.

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

81. Генетическая конструкция по п. 79, в которой тэг содержит SEQ ID NO: 122 или 195-204.

82. Генетическая конструкция по п. 62, в которой выбранное антитело представляет собой антитело к РСВ, содержащее паливизумаб, AB1128 или ab20745.

83. Генетическая конструкция по п. 62, в которой выбранное антитело представляет собой паливизумаб, содержащий тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO: 138, и легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 136; паливизумаб, содержащий тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO: 138, и легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 205; антитело к РСВ, содержащее тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO: 123, и легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 120; или антитело к РСВ, содержащее тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO: 123, и легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 206.

84. Генетическая конструкция по п. 62, в которой выбранное антитело представляет собой антитело к РСВ, содержащее CDRH1, содержащую SEQ ID NO: 207, CDRH2, содержащую SEQ ID NO: 208, CDRH3, содержащую SEQ ID NO: 209; CDRL1, содержащую SEQ ID NO: 210, CDRL2, содержащую SEQ ID NO: 211, и CDRL3, содержащую SEQ ID NO: 212.

85. Генетическая конструкция по п. 62, в которой выбранное антитело представляет собой антитело к ВИЧ, содержащее 10E8, VRC01, ab18633 или 39/5.4A.

86. Генетическая конструкция по п. 62, в которой выбранное антитело представляет собой антитело к ВИЧ, содержащее тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO: 150, и легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 149.

87. Генетическая конструкция по п. 62, в которой выбранное антитело представляет собой антитело к ВИЧ, содержащее CDRH1, содержащую SEQ ID NO: 213, CDRH2, содержащую SEQ ID NO: 214, CDRH3, содержащую SEQ ID NO: 215, CDRL1, содержащую SEQ ID NO: 216, CDRL2, содержащую SEQ ID NO: 217, и CDRL3, содержащую SEQ ID NO: 218 или CDRH1, содержащую SEQ ID NO: 219, CDRH2, содержащую SEQ ID NO: 220, CDRH3, содержащую SEQ ID NO: 221, CDRL1, содержащую QYGS, CDRL2, содержащую SGS, и CDRL3, содержащую SEQ ID NO: 222.

88. Генетическая конструкция по п. 62, в которой выбранное антитело представляет собой антитело к вирусу Денге, содержащее антитело 55, DB2-3, ab155042 или ab80914.

89. Генетическая конструкция по п. 62, в которой выбранное антитело представляет

собой антитело к вирусу Денге, содержащее CDRH1, содержащую SEQ ID NO: 223, CDRH2, содержащую SEQ ID NO: 224, CDRH3, содержащую SEQ ID NO: 225; CDRL1, содержащую SEQ ID NO: 226, CDRL2, содержащую SEQ ID NO: 227, и CDRKL3, содержащую SEQ ID NO: 228 или CDRH1, содержащую SEQ ID NO: 229, CDRH2, содержащую SEQ ID NO: 230, CDRH3, содержащую SEQ ID NO: 231, CDRL1, содержащую SEQ ID NO: 232, CDRL2, содержащую SEQ ID NO: 233, и CDRL3, содержащую SEQ ID NO: 234.

90. Генетическая конструкция по п. 62, в которой выбранное антитело представляет собой антитело к вирусу коклюша, содержащее тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO: 235, и легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 236.

91. Генетическая конструкция по п. 62, в которой выбранное антитело представляет собой антитело к вирусу гепатита С, содержащее MAB8694 или C7-50.

92. Генетическая конструкция по п. 62, в которой выбранное антитело представляет собой антитело к вирусу гепатита С, содержащее CDRH1, содержащую SEQ ID NO: 237, CDRH2, содержащую SEQ ID NO: 238, CDRH3, содержащую SEQ ID NO: 239, CDRL1, содержащую SEQ ID NO: 240, CDRL2, содержащую SEQ ID NO: 241, и CDRL3, содержащую SEQ ID NO: 242.

93. Генетическая конструкция по п. 62, в которой выбранное антитело представляет собой антитело к вирусу гриппа, содержащее C102.

94. Генетическая конструкция по п. 62, в которой выбранное антитело представляет собой антитело к вирусу гриппа, содержащее тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO: 159, и легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 158.

95. Генетическая конструкция по п. 62, в которой выбранное антитело представляет собой антитело к вирусу гриппа, содержащее CDRH1, содержащую SEQ ID NO: 243, CDRH2, содержащую SEQ ID NO: 244, CDRH3, содержащую SEQ ID NO: 245, CDRL1, содержащую SEQ ID NO: 246, CDRL2, содержащую KTS, и CDRL3, содержащую SEQ ID NO: 247.

96. Генетическая конструкция по п. 62, в которой выбранное антитело представляет собой антитело к МПВ, содержащее MPE8.

97. Генетическая конструкция по п. 62, в которой выбранное антитело представляет собой антитело к ЦМВ, содержащее MCMV5322A, MCMV3068A, LJP538 или LJP539.

98. Генетическая конструкция по п. 62, в которой выбранное антитело представляет собой антитело к ВЭБ, содержащее тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO: 168, и легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 166.

99. Генетическая конструкция по п. 62, в которой выбранное антитело представляет собой антитело к РСВ, содержащее CDRH1, содержащую SEQ ID NO: 248, CDRH2, содержащую SEQ ID NO: 249, CDRH3, содержащую SEQ ID NO: 250, CDRL1, содержащую SEQ ID NO: 251, CDRL2, содержащую SEQ ID NO: 252, и CDRL3, содержащую SEQ ID NO: 253.

100. Генетическая конструкция по п. 62, в которой выбранное антитело

представляет собой антитело к ВПГ, содержащее HSV8-N и MB66.

101. Генетическая конструкция по п. 62, в которой выбранное антитело представляет собой антитело к *Clostridium difficile*, содержащее актоксумаб или безлотоксумаб.

102. Генетическая конструкция по п. 62, в которой выбранное антитело представляет собой антитело к ФНО, содержащее инфликсимаб, адалимумаб, этанерцепт, цертолизумаб или их приемлемые биоаналоги.

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

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

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

106. Набор по п. 104, дополнительно содержащий нуклеазу.

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

108. Набор по п. 104, дополнительно содержащий наночастицу или вирусный вектор на основе аденоассоциированного вируса.

109. Набор по п. 106, в котором нРНК и нуклеаза связаны с наночастицей.

110. Набор по п. 104, в котором генетическая конструкция является частью вирусного вектора на основе аденоассоциированного вируса.

По доверенности

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Генетическая конструкция для модификации В-клетки для экспрессии выбранного антитела, причем генетическая конструкция содержит или кодирует (i) 5' гомологичное плечо, (ii) промотор тяжелой цепи, (iii) сигнальный пептид, (iv) полноразмерную легкую цепь выбранного антитела, (v) гибкий линкер или саморасщепляющийся пептид или внутренний участок посадки рибосомы (IRES), (vi) переменную область тяжелой цепи выбранного антитела, (vii) границу сплайсинга для экспрессии эндогенной константной области тяжелой цепи В-клетки и (viii) 3' гомологичное плечо.

2. Генетическая конструкция по п. 1, в которой

5' гомологичное плечо представлено в SEQ ID NO: 110 или 153 и 3' гомологичное плечо представлено в SEQ ID NO: 125;

5' гомологичное плечо представлено в SEQ ID NO: 92 и 3' гомологичное плечо представлено в SEQ ID NO: 93;

5' гомологичное плечо представлено в SEQ ID NO: 94 и 3' гомологичное плечо представлено в SEQ ID NO: 95;

5' гомологичное плечо представлено в SEQ ID NO: 127 и 3' гомологичное плечо представлено в SEQ ID NO: 140;

5' гомологичное плечо представлено в SEQ ID NO: 90 и 3' гомологичное плечо представлено в SEQ ID NO: 91; или

5' гомологичное плечо представлено в SEQ ID NO: 142 и 3' гомологичное плечо представлено в SEQ ID NO: 143.

3. Генетическая конструкция по п. 1, в которой тяжелая цепь промотора содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 111 или SEQ ID NO: 128.

4. Генетическая конструкция по п. 1, в которой сигнальный пептид имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 118, 134, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193 или 194.

5. Генетическая конструкция по п. 1, в которой гибкий линкер кодируется нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 116; имеет аминокислотную последовательность, представленную в одной из SEQ ID NO: 122, 180-184; и/или представляет собой линкер Gly-Ser, содержащий 50-80 аминокислот.

6. Генетическая конструкция по п. 1, в которой саморасщепляющийся пептид имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 176, 177, 178 или 179.

7. Генетическая конструкция по п. 1, в которой граница сплайсинга содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 124, SEQ ID NO: 139 или SEQ ID NO: 151.

8. Генетическая конструкция по п. 1, отличающаяся тем, что генетическая конструкция дополнительно кодирует тэг, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO: 122, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203 или 204.

9. Генетическая конструкция по п. 1, в которой выбранное антитело представляет

собой

антитело к РСВ, содержащее

(а) переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 138, и переменную область легкой цепи, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 136,

(б) переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 138, и переменную область легкой цепи, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 205,

(с) переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 123, и переменную область легкой цепи, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 120, или

(д) переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 123, и переменную область легкой цепи, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 206;

антитело к вирусу иммунодефицита человека (ВИЧ), содержащее переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 150, и переменную область легкой цепи, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 149;

антитело к вирусу коклюша, содержащее переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 235, и переменную область легкой цепи, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 236;

антитело к вирусу гриппа, содержащее переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 159, и переменную область легкой цепи, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 158;

антитело к вирусу Эпштейна-Барра, содержащее переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 168, и переменную область легкой цепи, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 166; или

антитело к фактору некроза опухоли (ФНО), содержащее переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 254, и переменную область легкой цепи, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 255.

10. Генетическая конструкция по п. 1, в которой выбранное антитело представляет собой

антитело к РСВ, содержащее CDRH1, представленную в SEQ ID NO: 207, CDRH2, представленную в SEQ ID NO: 208, CDRH3, представленную в SEQ ID NO: 209, CDRL1, представленную в SEQ ID NO: 210, CDRL2, представленную в SEQ ID NO: 211, и CDRL3, представленную в SEQ ID NO: 212;

антитело к ВИЧ, содержащее CDRH1, представленную в SEQ ID NO: 213, CDRH2, представленную в SEQ ID NO: 214, CDRH3, представленную в SEQ ID NO: 215, CDRL1, представленную в SEQ ID NO: 216, CDRL2, представленную в SEQ ID NO: 217, и CDRL3, представленную в SEQ ID NO: 218;

антитело к ВИЧ, содержащее CDRH1, представленную в SEQ ID NO: 219, CDRH2, представленную в SEQ ID NO: 220, CDRH3, представленную в SEQ ID NO: 221, CDRL1, представленную QYGS, CDRL2, представленную SGS, и CDRL3, представленную в SEQ ID NO: 222;

антитело к вирусу Денге, содержащее CDRH1, представленную в SEQ ID NO: 223, CDRH2, представленную в SEQ ID NO: 224, CDRH3, представленную в SEQ ID NO: 225, CDRL1, представленную в SEQ ID NO: 226, CDRL2, представленную в SEQ ID NO: 227, и CDRL3, представленную в SEQ ID NO: 228;

антитело к вирусу Денге, содержащее CDRH1, представленную в SEQ ID NO: 229, CDRH2, представленную в SEQ ID NO: 230, CDRH3, представленную в SEQ ID NO: 231, CDRL1, представленную в SEQ ID NO: 232, CDRL2, представленную в SEQ ID NO: 233, и CDRL3, представленную в SEQ ID NO: 234;

антитело к гепатиту С, содержащее CDRH1, представленную в SEQ ID NO: 237, CDRH2, представленную в SEQ ID NO: 238, CDRH3, представленную в SEQ ID NO: 239, CDRL1, представленную в SEQ ID NO: 240, CDRL2, представленную в SEQ ID NO: 241, и CDRL3, представленную в SEQ ID NO: 242;

антитело к вирусу гриппа, содержащее CDRH1, представленную в SEQ ID NO: 243, CDRH2, представленную в SEQ ID NO: 244, CDRH3, представленную в SEQ ID NO: 245, CDRL1, представленную в SEQ ID NO: 246, CDRL2, представленную KTS, и CDRL3, представленную в SEQ ID NO: 247;

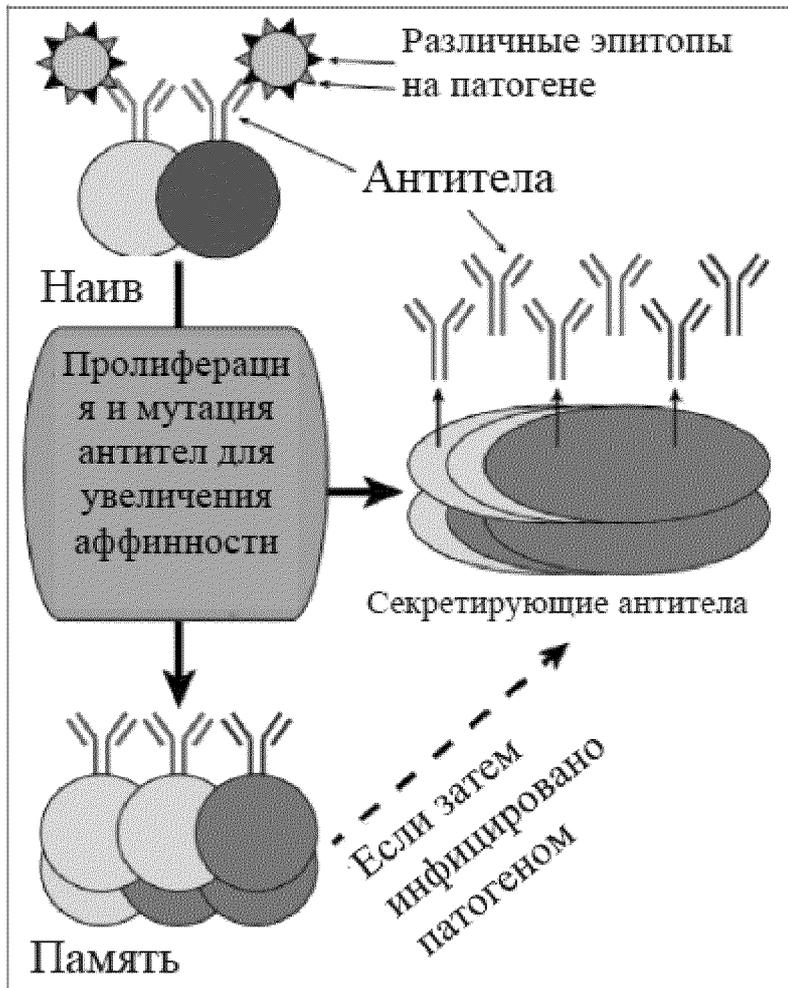
антитело к ВЭБ, содержащее CDRH1, представленную в SEQ ID NO: 248, CDRH2, представленную в SEQ ID NO: 249, CDRH3, представленную в SEQ ID NO: 250, CDRL1, представленную в SEQ ID NO: 251, CDRL2, представленную в SEQ ID NO: 252, и CDRL3, представленную в SEQ ID NO: 253;

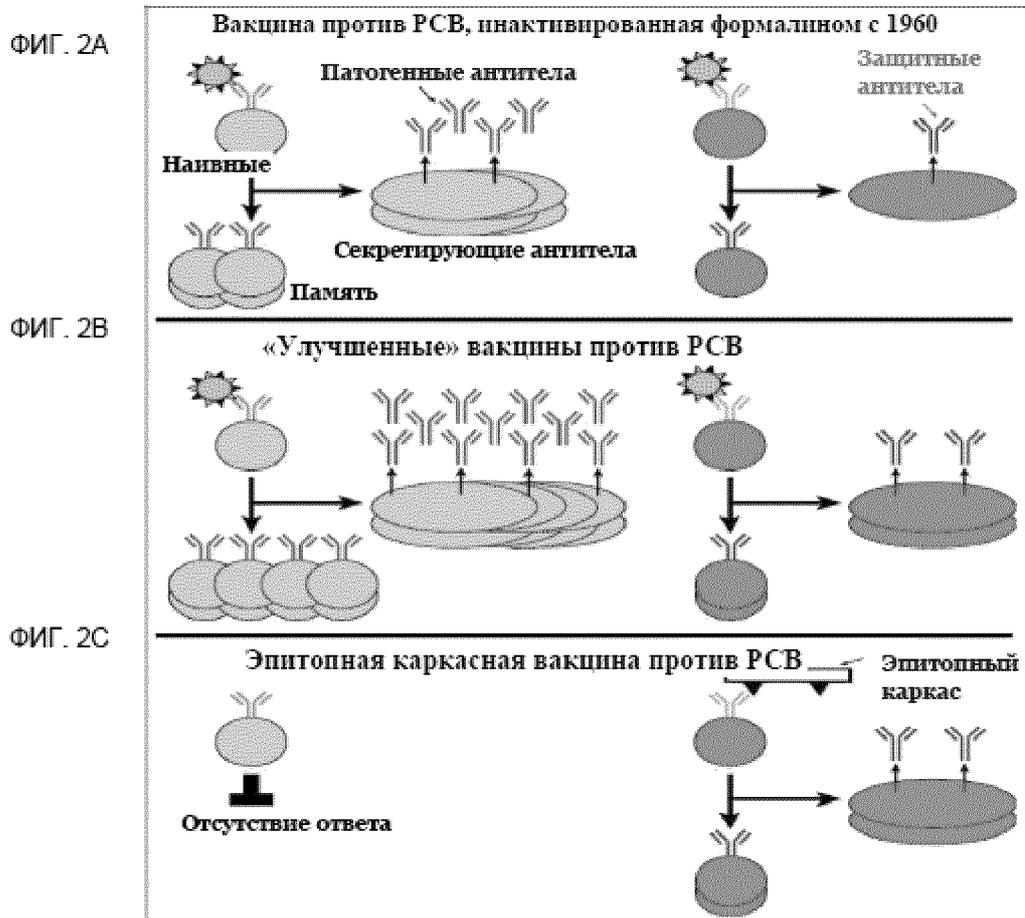
антитело к ФНО, содержащее CDRH1, представленную в SEQ ID NO: 256, CDRH2, представленную в SEQ ID NO: 257, CDRH3, представленную в SEQ ID NO: 258, CDRL1, представленную в SEQ ID NO: 259, CDRL2, представленную в SEQ ID NO: 260, и CDRL3, представленную в SEQ ID NO: 261;

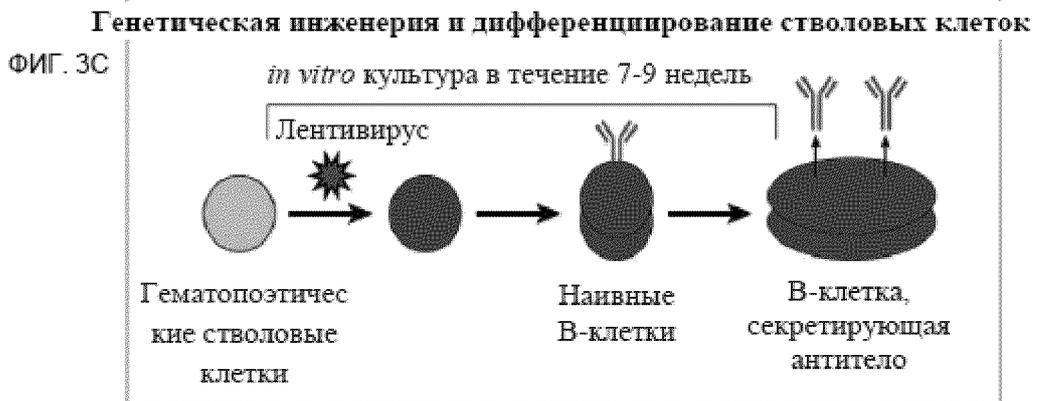
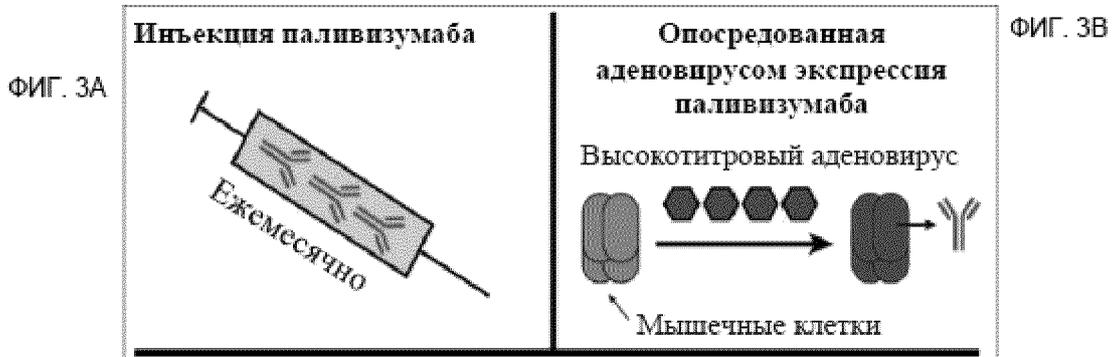
антитело к ФНО, содержащее CDRH1, представленную в SEQ ID NO: 262, CDRH2, представленную в SEQ ID NO: 263, CDRH3, представленную в SEQ ID NO: 264, CDRL1, представленную в SEQ ID NO: 265, CDRL2, представленную в SEQ ID NO: 266, и CDRL3, представленную в SEQ ID NO: 267; или

антитело к ФНО, содержащее CDRH1, представленную в SEQ ID NO: 268, CDRH2, представленную в SEQ ID NO: 269, CDRH3, представленную в SEQ ID NO: 270, CDRL1, представленную в SEQ ID NO: 271, CDRL2, представленную в SEQ ID NO: 272, и CDRL3, представленную в SEQ ID NO: 273.

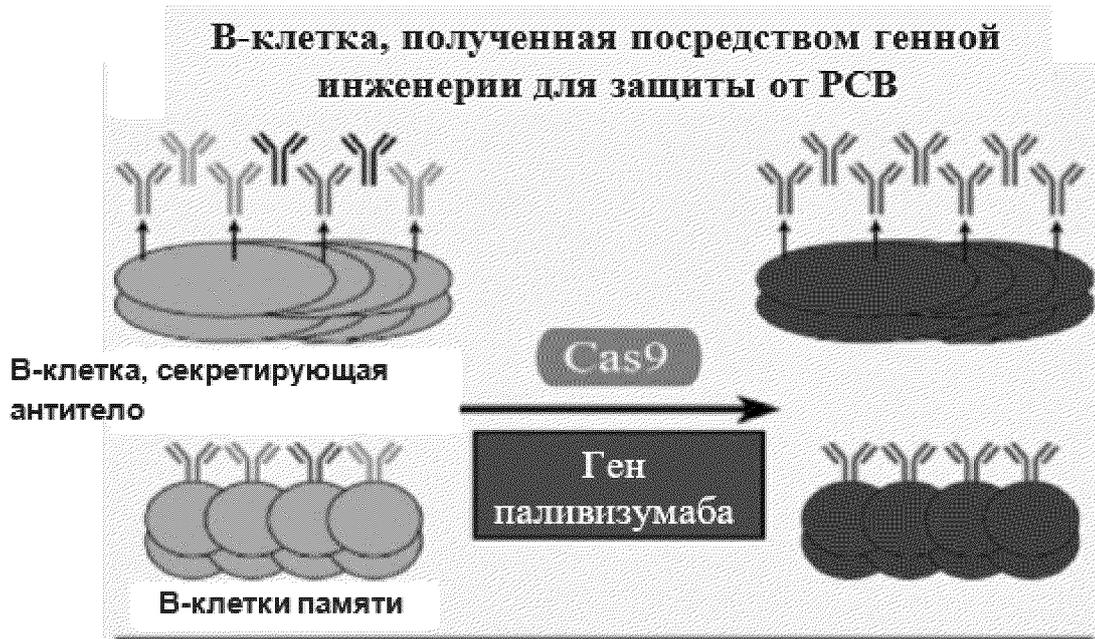
ФИГ. 1



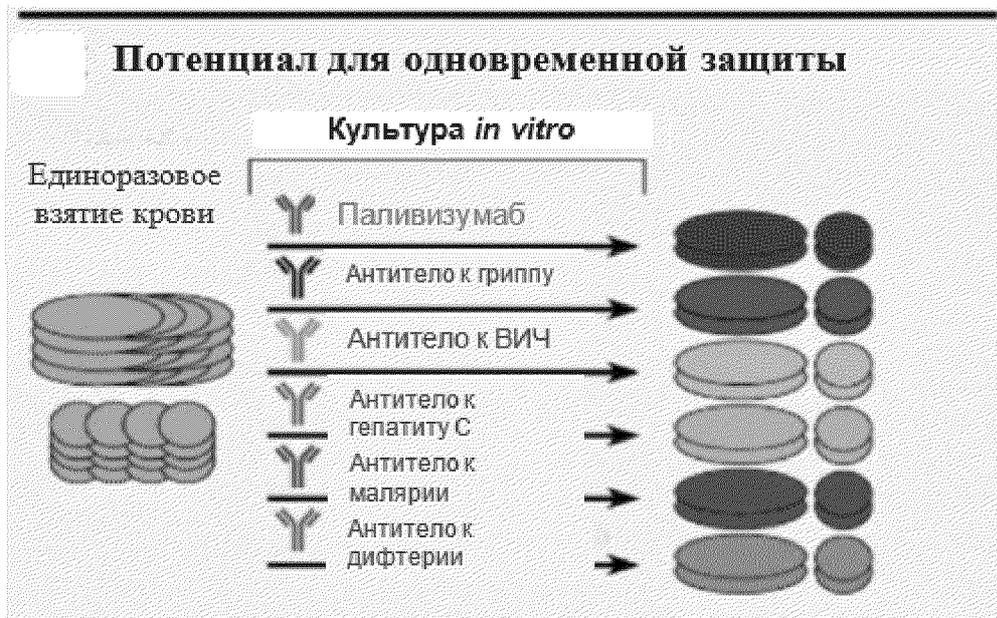




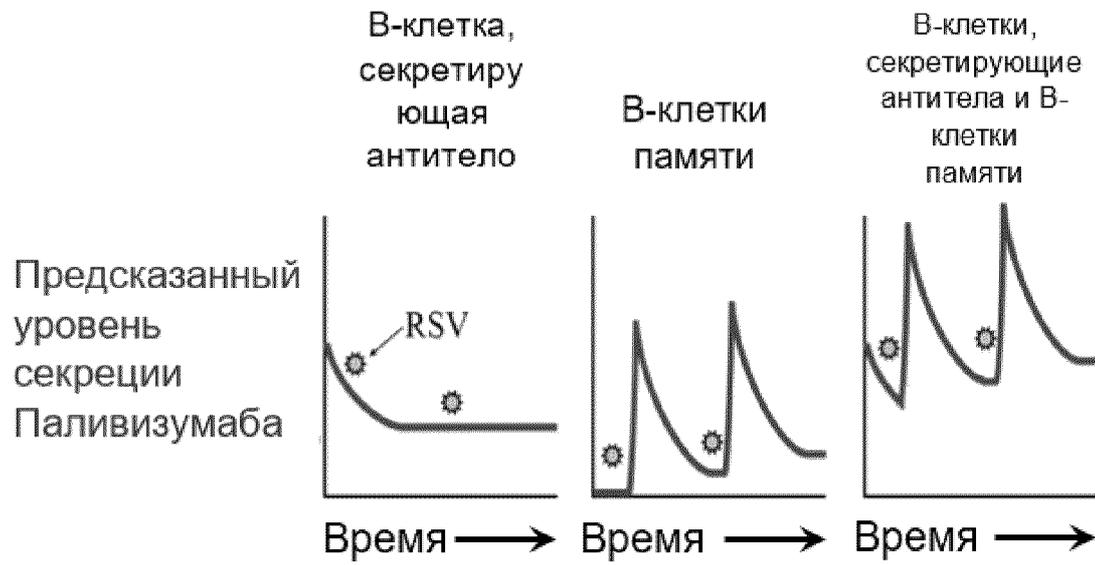
ФИГ. 4А



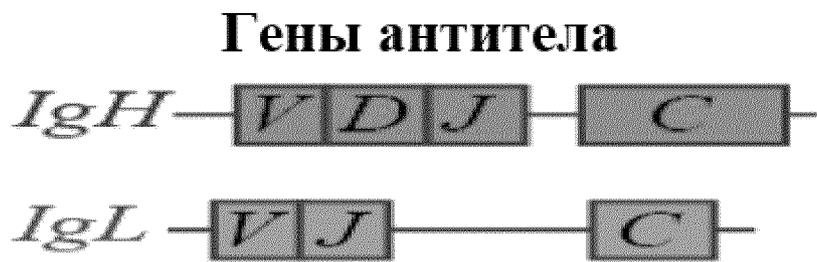
ФИГ. 4В



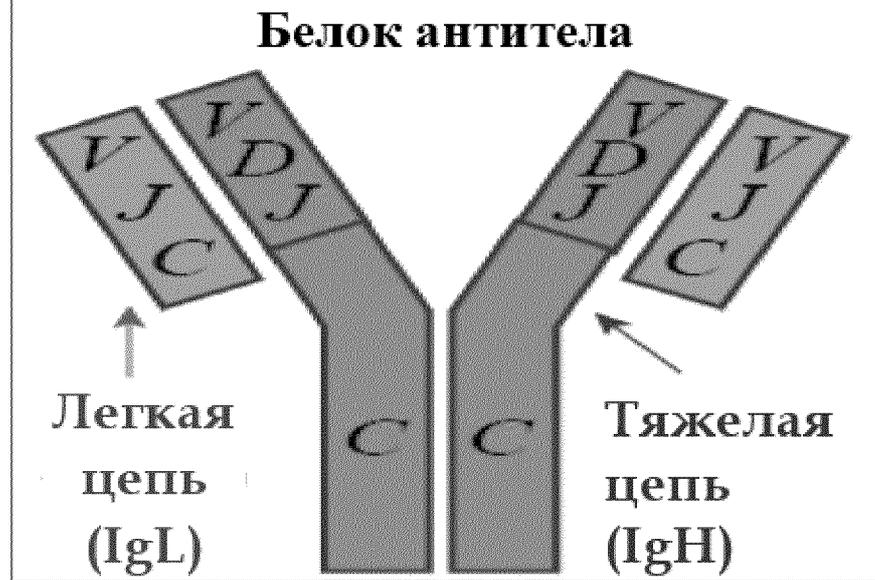
ФИГ. 5



ФИГ. 6А

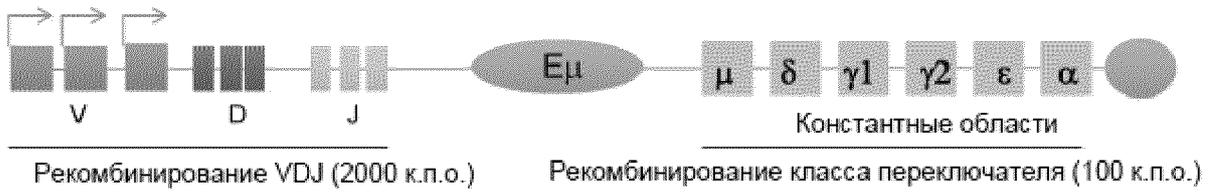


ФИГ. 6В

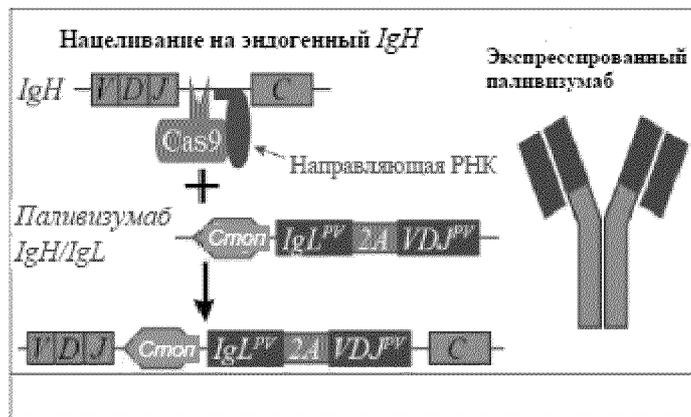


7/110

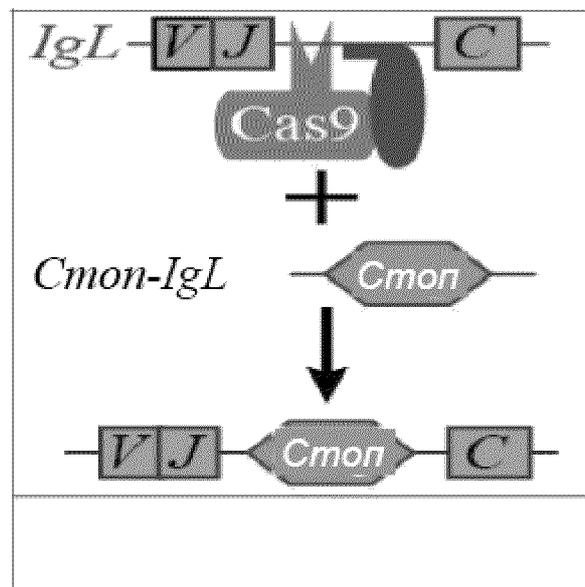
ФИГ. 7



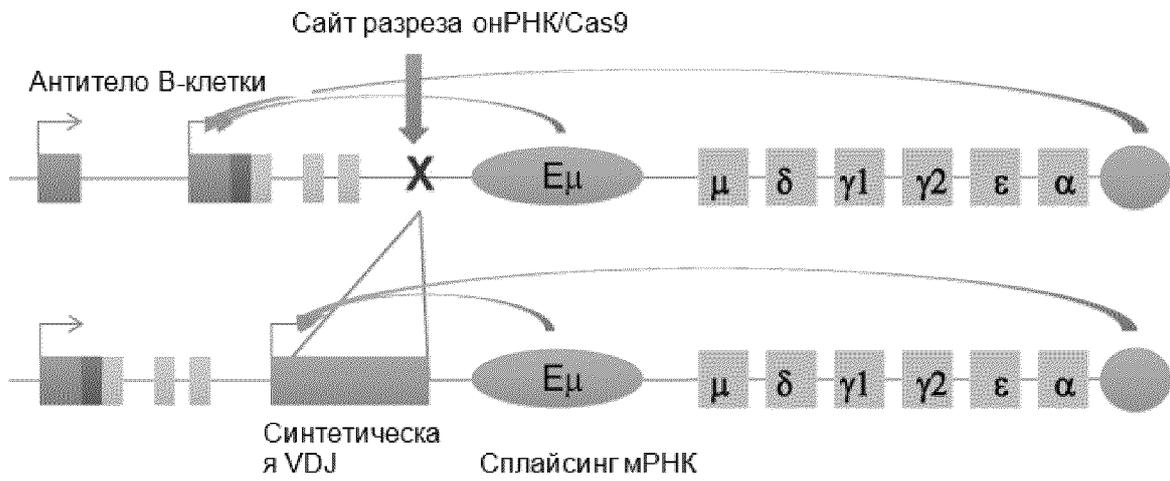
ФИГ. 8А



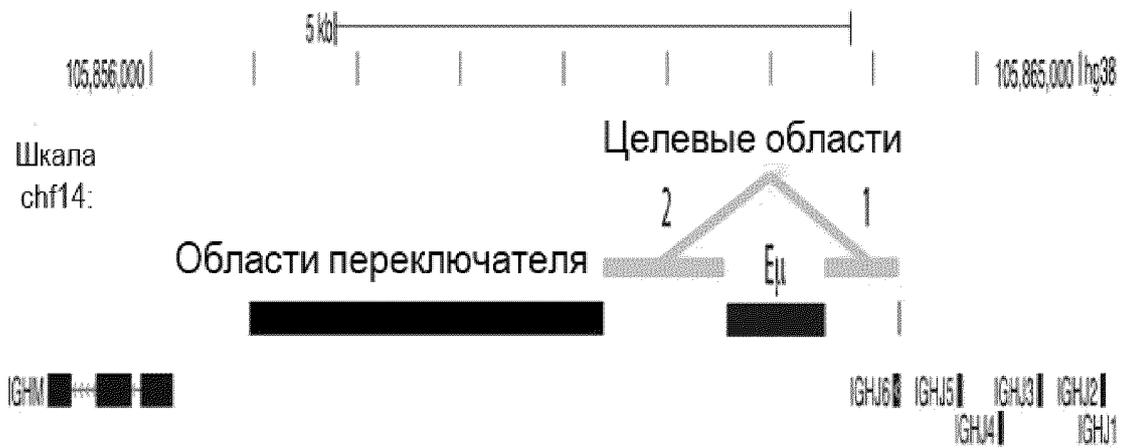
ФИГ. 8В



ФИГ. 9



ФИГ. 10



9/110

ФИГ. 11А

Последовательность интронного энхансера Е μ человека:

GTAGTTGAAAAGTGGTCTTGAAAAATACTAAAATGAAGGCCACTCTATCAGAATATCAAAGT
GTTTCTCCTTAATCACAAAGAGAAAACGAGTTAACCTAAAAAGATTGTGAACACAGTCATTA
TGAAAATAATGCTCTGAGGTATCGAAAAAGTATTTGAGATTAATTATCACATGAAGGGATAA
CAAGCTAATTTAAAAAACTTTTTGAATACAGTCATAAACTCTCCCTAAGACTGTTAATTTCT
TAAACATCTTACTTTAAAAATGAATGCAGTTTAGAAGTTGATATGCTGTTTGCACAAACTAGC
AGTTGATAAGCTAAGATTGGAAATGAAATTCAGATAGTTAAAAAAAGCCTTTTCAGTTTCGG
TCAGCCTCGCCTTATTTTAGAAACGCAAATTGTCCAGGTGTTGTTTTGCTCAGTAGAGCACT
TTCAGATCTGGGCCTGGGCAAAACCACCTCTTCACAACCAGAAGTGATAAATTTACCAATT
GTGTTTTTTTTGCTTCCTAAAATAGACTCTCGCGGTGACCTGCTTCCTGCCACCTGCTGTGG
GTGCCGGAGACCCCATGCAGCCATCTTGACTCTAATTCATCATCTGCTTCCAGCTTCGCT
CAATTAATTAAAAAAATAAACTTGATTTATGATGGTCAAAACGCAGTCCCGCATCGGGGCCG
ACAGCACTGTGCTAGTATTTCTTAGCTGAGCTTGCTTTGGCCTCAATTCCAGACACATATCA
CTCATGGGTGTTAATCAAATGATAAGAATTTCAAATACTTGGACAGTTAAAAAAATTAATATA
CTTGAAAATCTCTCACATTTTTAAGTCA (SEQ ID NO: 85)

Область интрона человека 1 для нацеливания для вставки генетической конструкции:

CTACATGGACGTCTGGGGCAAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGGTAAGAATGGCCA
CTCTAGGGCCTTTGTTTTCTGCTACTGCCTGTGGGGTTTCCTGAGCATTGCAGGTTGGTCC
TCGGGGCATGTTCCGAGGGGACCTGGGCGGACTGGCCAGGAGGGGATGGGCACTGGGG
TGCTTGAGGATCTGGGAGCCTCTGTGGATTTTCCGATGCCTTTGGAAAATGGGACTCAG
GTTGGGTGCGTCTGATGGAGTAACTGAGCCTGGGGGCTTGGGGAGCCACATTTGGACGA
GATGCCTGAACAAACCAGGGGTCTTAGTGATGGCTGAGGAATGTGTCTCAGGAGCGGTGT
CTGTAGGACTGCAAGATCGCTGCACAGCAGCGAATCGTGAATATTTCTTTAGAATTATGA
GGTGCCTGTGTGTCAACCTGCATCTTAAATTCCTTATTGGCTGGAAAGAGAACTGTCGGA
GTGGGTGAATCCAGCCAGGAGGGACGCGTAGCCCCGGTCTTGATGAGAGCAGGGTTGGG
GGCAGGGGTAGCCAGAAACGGTGGCTGCCGTCTGACAGGGGCTTAGGGAGGCTCCAG
GACCTCAGTGCCTTGAAGCTGTTTTCCATGAGAAAAGGATTGTTTATCTTAGGAGGCATGC
TACTGTAAAAAGACAGGATATGTTTGAAGTGGCTTCTGA GAAAAATGGTTAAGAAAATTAT
(SEQ ID NO: 1)

ФИГ. 11В

Область человека_1_нРНК_1 GGCCTCGGGGCATGTTCCGGAGG (SEQ ID NO: 5)
Область человека_1_нРНК_2 GGGCATGTTCCGAGGGGACCTTGG (SEQ ID NO: 6)
Область человека_1_нРНК_3 GCATTGCAGGTTGGTCCTCGGGG (SEQ ID NO: 7)
Область человека_1_нРНК_4 TCCTCGGGGCATGTTCCGAGGGG (SEQ ID NO: 8)
Область человека_1_нРНК_5 GGCATGTTCCGAGGGGACCTGGG (SEQ ID NO: 9)
Область человека_1_нРНК_6 GTCTCAGGAGCGGTGTCTGTAGG (SEQ ID NO: 10)
Область человека_1_нРНК_7 AGCATTGCAGGTTGGTCCTCGGG (SEQ ID NO: 11)
Область человека_1_нРНК_8 CCTGGGCGGACTGGCCAGGGAGG (SEQ ID NO: 12)
Область человека_1_нРНК_9 ACTGGGGTGCCTTGAGGATCTGG (SEQ ID NO: 13)
Область человека_1_нРНК_10 CCCAGTGCCCATCCCCTCCTTGG (SEQ ID NO: 14)
Область человека_1_нРНК_11 CTAAGACCCCTGGTTTGTTCAGG (SEQ ID NO: 15)
Область человека_1_нРНК_12 TGTGGATTTTCCGATGCCTTTTGG (SEQ ID NO: 16)
Область человека_1_нРНК_13 AGGACCAACCTGCAATGCTCAGG (SEQ ID NO: 17)
Область человека_1_нРНК_14 CTCAGGTTGGGTGCGTCTGATTGG (SEQ ID NO: 18)
Область человека_1_нРНК_15 CCCTCCTGGCCAGTCCGCCCAGG (SEQ ID NO: 19)
Область человека_1_нРНК_16 GGCCAGGAGGGGATGGGCACTTGG (SEQ ID NO: 20)
Область человека_1_нРНК_17 GAGATGCCTGAACAAACCAGGGG (SEQ ID NO: 21)
Область человека_1_нРНК_18 AGGGGTCTTAGTGATGGCTGAGG (SEQ ID NO: 22)
Область человека_1_нРНК_19 ATGGGCACTGGGGTGCCTTGAGG (SEQ ID NO: 23)
Область человека_1_нРНК_20 TTCCGATGCCTTTGGAAAATTGGG (SEQ ID NO: 24)

ФИГ. 11В (продолжение)

Человек_1_нРНК1	GGUCCUCGGGGCAUGUUC CG (SEQ ID NO: 290)
Человек_1_нРНК2	GGGCAUGUUC CGAGGGGACC (SEQ ID NO: 291)
Человек_1_нРНК3	GCAUUGCAGGUUGGUCCUCG (SEQ ID NO: 88)
Человек_1_нРНК4	UCCUCGGGGCAUGUUC CGAG (SEQ ID NO: 292)
Человек_1_нРНК5	GGCAUGUUC CGAGGGGACCU (SEQ ID NO: 293)
Человек_1_нРНК6	GUCUCAGGAGCGGUGUCUGU (SEQ ID NO: 89)
Человек_1_нРНК7	AGCAUUGCAGGUUGGUCCUC (SEQ ID NO: 294)
Человек_1_нРНК8	CCUGGGCGGACUGGCCAGGA (SEQ ID NO: 295)
Человек_1_нРНК9	ACUGGGGUGCCUUGAGGAUC (SEQ ID NO: 296)
Человек_1_нРНК10	CCCCAGUGCCCAUCCCCUCC (SEQ ID NO: 297)
Человек_1_нРНК11	CUAAGACCCCUGGUUUGUUC (SEQ ID NO: 298)
Человек_1_нРНК12	UGUGGAUUUUC CGAUGCCUU (SEQ ID NO: 299)
Человек_1_нРНК13	AGGACCAACCGCAAUGCUC (SEQ ID NO: 300)
Человек_1_нРНК14	CUCAGGUUGGGUGCGUCUGA (SEQ ID NO: 301)
Человек_1_нРНК15	CCCUCCUGGCCAGUCCGCC (SEQ ID NO: 302)
Человек_1_нРНК16	GGCCAGGAGGGGAUGGGCAC (SEQ ID NO: 303)
Человек_1_нРНК17	GAGAUGCCUGAACAAACCAG (SEQ ID NO: 304)
Человек_1_нРНК18	AGGGGUCUAGUGAUGGCUG (SEQ ID NO: 305)
Человек_1_нРНК19	AUGGGCACUGGGGUGCCUUG (SEQ ID NO: 306)
Человек_1_нРНК20	UCCGAUGCCUUUGGAAAAU (SEQ ID NO: 307)

12/110

ФИГ. 12А

Область интрона человека 2 для нацеливания для вставки генетической конструкции

CTCACTTTAGGATAAGTTTTAGGTAAAATGTGCATCATTATCCTGAATTATTTCAAGTTAAGCA
TGTTAGTTGGTGGCATAAGAGAAAACCAATCAGATAGTGCTGAAGACAGGACTGTGGAGA
CACCTTAGAAGGACAGATTCTGTTCCGAATCACCGATGCGGCGTCAGCAGGACTGGCCTA
GCGGAGGCTCTGGGAGGGTGGCTGCCAGGCCCGGCTGGGCTTTGGGTCTCCCCGGAC
TACCCAGA GCTGGGATGCGTGGCTTCTGCTGCCGGGCGGACTGGCTGCTCAGGCCCA
GCCCTTGTTAATGGACTTGGAGGAATGATTCCATGCCAAAGCTTTGCAAGGCTCGCAGTGA
CCAGGCGCCCGACATGGTAAGAGACAGGCAGCCGCGCTGCTGCATTTGCTTCTTAAA
ACTTTGATTTGACGTCTTATTTCCACTAGAAGGGGAAGTGGTCTTAATTGCTTGATGAAGA
GCAGGAGACTCATTATGTGAGTCTTTTGAGTGACCATTGTCTGGGTCACTCCCATTTAACT
TTCCCTAAAGCCCATTTGAAGGAGAGGTTCGCACGAGCTGCTCCACAACCTCTGAATGGGG
ATGGCATGGGTAATGATGCTTGAGAACATACCAAGCCCACTGGCATCGCCCTTGTCTAAG
TCATTGACTGTAGGTCATCATCGCACCCCTTGAAAGTAGCCCATGCCTTCCAAAGCGATTTAT
GGTAAATGGCAGAAATTTAAGTGGCAAATTCAGATAAAATGCATTTCTTGGTTGTTTCCAAT
GATGACTGTT ATCTAGAGGGGAATTTAAAGGCAGGGGTTTACTGCAGACTCAGAAGGGAGG
GGATGCTCCGGGAAGGTGGAGGCTCTGAGCATCTCAATACCCTCCTCTTGGTGCAGAAGA
TATGCTGCCACTTCTAGAGCAAGGGGACCTGCTCATTTTTATCACAGCACAGGCTCCTAAA
TTCTTGGTCTCATTCTCAAGATGTTTTAATGACTTTAAAGCAGCAAAGAAATATTCACCCA
GGTAGTGGAGGGTGGTAATGATTGGTAATGCTTTGGAACCAAACCCAGGTGGCGCTGGG
GCAGGAC TGCAGGGAAGTGGGGTATCAAGTAGAGGGAGACAAAAGATGGAAGCCAGC
CTGGCTGTGCAGGAACCCGGCAATGAGATGGCTTTAGCTGAGACAAGCAGGTCTGGTGG
GCTGACCATTTCTGGCCATGACAACCTCCATCCAGCTTTCAGAAATGGACTCAGATGGGCAA
AACTGACCTAAGCTGACCTAGACTAAACAAGGCTGAAC (SEQ ID NO: 2)

13/110

ФИГ. 12В

Область человека_2_нРНК1	CTGACGCCGCATCGGTGATT <u>CGG</u> (SEQ ID NO: 25)
Область человека_2_нРНК2	TTAGACAAGGGCGATGCCAGT <u>TGG</u> (SEQ ID NO: 26)
Область человека_2_нРНК3	CGTGCGACCTCTCCTTCAAAT <u>TGG</u> (SEQ ID NO: 27)
Область человека_2_нРНК4	AGCATATCTTCTGCACCAAG <u>AGG</u> (SEQ ID NO: 28)
Область человека_2_нРНК5	ATATTCCACCCAGGTAGTGG <u>AGG</u> (SEQ ID NO: 29)
Область человека_2_нРНК6	GTGCGACCTCTCCTTCAAAT <u>GGG</u> (SEQ ID NO: 30)
Область человека_2_нРНК7	AGGTCCCCTTGCTCTAGAAGT <u>TGG</u> (SEQ ID NO: 31)
Область человека_2_нРНК8	CTCTAGATAACAGTCATCAT <u>TGG</u> (SEQ ID NO: 32)
Область человека_2_нРНК9	TTGTCTAAGTCATTGACTGT <u>AGG</u> (SEQ ID NO: 33)
Область человека_2_нРНК10	CCAAAGCGATTTATGGTAAAT <u>TGG</u> (SEQ ID NO: 34)
Область человека_2_нРНК11	TCTTTTGAGTGACCATTGTCT <u>TGG</u> (SEQ ID NO: 35)
Область человека_2_нРНК12	CCATTTACCATAAATCGCTT <u>TGG</u> (SEQ ID NO: 36)
Область человека_2_нРНК13	AGGGCGATGCCAGTGGGGCT <u>TGG</u> (SEQ ID NO: 37)
Область человека_2_нРНК14	AGCTAAAGCCATCTCATTGCC <u>CGG</u> (SEQ ID NO: 38)
Область человека_2_нРНК15	CCACAACCTCTGAATGGGGAT <u>TGG</u> (SEQ ID NO: 39)
Область человека_2_нРНК16	TTAATTGCTTGATGAAGAGC <u>AGG</u> (SEQ ID NO: 40)
Область человека_2_нРНК17	TAGACAAGGGCGATGCCAGT <u>GGG</u> (SEQ ID NO: 41)
Область человека_2_нРНК18	AAGCTGACCTAGACTAAACA <u>AGG</u> (SEQ ID NO: 42)
Область человека_2_нРНК19	GCAGGAACCCGGCAATGAGAT <u>TGG</u> (SEQ ID NO: 43)
Область человека_2_нРНК20	TCTGTTCCGAATCACCGATGC <u>CGG</u> (SEQ ID NO: 44)

ФИГ. 12В (продолжение)

Человек_2_нРНК_1	CUGACGCCGCAUCGGUGAUU (SEQ ID NO: 308)
Человек_2_нРНК_2	UUAGACAAGGGCGAUGCCAG (SEQ ID NO: 309)
Человек_2_нРНК_3	CGUGCGACCUCUCCUUCAAA (SEQ ID NO: 310)
Человек_2_нРНК_4	AGCAUAUCUUCUGCACCAAG (SEQ ID NO: 311)
Человек_2_нРНК_5	AUAUCCACCCAGGUAGUGG (SEQ ID NO: 312)
Человек_2_нРНК_6	GUGCGACCUCUCCUUCAAAU (SEQ ID NO: 313)
Человек_2_нРНК_7	AGGUCCCCUUGCUCUAGAAG (SEQ ID NO: 314)
Человек_2_нРНК_8	CUCUAGAUAACAGUCAUCAU (SEQ ID NO: 315)
Человек_2_нРНК_9	UUGUCUAAGUCAUUGACUGU (SEQ ID NO: 316)
Человек_2_нРНК_10	CCAAAGCGAUUUUAUGGUAUU (SEQ ID NO: 317)
Человек_2_нРНК_11	UCUUUUGAGUGACCAUUGUC (SEQ ID NO: 318)
Человек_2_нРНК_12	CCAUUUACCAUAAAUCGCUU (SEQ ID NO: 319)
Человек_2_нРНК_13	AGGGCGAUGCCAGUGGGGCU (SEQ ID NO: 320)
Человек_2_нРНК_14	AGCUAAAGCCAUCUCAUUGC (SEQ ID NO: 321)
Человек_2_нРНК_15	CCACAACCUCUGAAUGGGGA (SEQ ID NO: 322)
Человек_2_нРНК_16	UUAAUUGCUUGAUGAAGAGC (SEQ ID NO: 323)
Человек_2_нРНК_17	UAGACAAGGGCGAUGCCAGU (SEQ ID NO: 324)
Человек_2_нРНК_18	AAGCUGACCUAGACUAAACA (SEQ ID NO: 325)
Человек_2_нРНК_19	GCAGGAACCCGGCAAUGAGA (SEQ ID NO: 326)
Человек_2_нРНК_20	UCUGUUCGAAUCACCGAUG (SEQ ID NO: 327)

15/110

ФИГ. 13А

Последовательность интронного энхансера Ер мыши:

AGTCTAGATAAATTGCATTCATTTAAAAAAAAGTCTTTCTCCTAAAATGAATACTCAGAAAGT
GGTCTTGAAAAAGATTTGTGAAGCCGTTTTGACCAGAATGTCAAAGTCTTAATAGTAAGGCA
AAACAAACAACSTAAAAAGATCATGAACAAAGTCACTGTAAATGCTTCGGGTATTGGAAAAG
AATTGAATGGAGACCAATAATCAGAGGGGAAGAATAATAGAGTAATTTAAGAAGTTTTCTAA
ATATATTAGAAATTAAGACACTAAAGTCCTTCAATTTCTTACATAACCTAATTTTGAAAATGA
ATTCTAAATACATTTTAGAAGTCGATAAACTTAAAGTTTTGGGGAAACTAGAACTACTCAAGCT
AAAATTAAGGTTGAACTCAATAAGTTAAAAGAGGACCTCTCCAGTTTCGGCTGAATCCTC
AACTTATTTAGAAATGCAAATTACCCAGGTGGTGTGTTTTGCTCAGCCTGGACTTTTCGGTTTG
GTGGGGCTGGACAGAGTGTTCAAAACCACTTCTTCAAACCACAGCTACAAGTTTACCTAG
TGGTTTTATTTCCCTTCCCCAAATAGCCTTGCCACATGACCTGCTTCCCTGCCAGCTGCTGC
AGGTGTTCTGGTTCTGATCGGCCATCTTGACTCCAACATGCTCAATTCATTTAAAA
ATATTTGAACTTAATTTATTATTGTTAAAAGTCAGTTCTGAATAGGTTATGAGAGAGCCTCA
CTCCCATTCCTCGGTAAACTTTAAGTAATATCAGTTCTACACAAACAAGACCTCAAACCTGA
TTGACAAGAATTTGGACATTTAAAAAATGAGTACTTGAAAACCCTCTCACATTTTAAAGTC
ACAGTATTTAACTATTTTCTAGGAACCAACTTAAAGATAAAAGCAACATCTTCTAATATTC
CATACACATACTTCTGTGTTCCCTTTGAAAGCTGGACTTTTGCAGGCTCCACCAGACCTCTCT
AGACA (SEQ ID NO: 86)

Область интрона мыши 1 для нацеливания для вставки генетической конструкции:

GGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCAGGTAAGAATGGCCTCTCCAG
GTCTTTATTTTTAACCTTTGTTATGGAGTTTTCTGAGCATTGCAGACTAATCTTGGATATTTG
TCCCTGAGGGAGCCGGCTGAGAGAAGTTGGGAAATAAACTGTCTAGGGATCTCAGAGCCT
TTAGGACAGATTATCTCCACATCTTTGAAAACTAAGAATCTGTGTGATGGTGTGTTGGTGGAG
TCCCTGGATGATGGGATAGGGACTTTGGAGGCTCATTTGAAGAAGATGCTAAAACAATCCT
ATGGCTGGAGGGATAGTTGGGGCTGTAGTTGGAGATTTTCAGTTTTTAGAATAAAAGTATTA
GTTGTGGAATATACTTCAGGACCACCTCTGTGACAGCATTTATACAGTATCCGATGCATAG
GGACAAAGAGTGGAGTGGGGCACTTTCTTTAGATTTGTGAGGAATGTTCCGCACTAGATTG
TTTTAAACTT CATTTGTTGGAAGGAGAGCTGTCTTAGTGATTGAGTCAAGGGAGAAAGGC
ATCTAGCCTCGGTCTCAAAGGGTAGTTGCTG (SEQ ID NO: 3)

ФИГ. 13В

Мышь_область_1_НРНК_1	CAACTACCCTTTTGAGACCGAGG (SEQ ID NO: 45)
Мышь_область_1_НРНК_2	TTATACAGTATCCGATGCATAGG (SEQ ID NO: 46)
Мышь_область_1_НРНК_3	TATACAGTATCCGATGCATAGGG (SEQ ID NO: 47)
Мышь_область_1_НРНК_4	CATCTAGCCTCGGTCTCAAAAGG (SEQ ID NO: 48)
Мышь_область_1_НРНК_5	CACTCTTTGTCCCTATGCATCGG (SEQ ID NO: 49)
Мышь_область_1_НРНК_6	ATCTAGCCTCGGTCTCAAAAGGG (SEQ ID NO: 50)
Мышь_область_1_НРНК_7	AAGTTTTAAACAATCTAGTGCGG (SEQ ID NO: 51)
Мышь_область_1_НРНК_8	AAGATGCTAAAACAATCCTATGG (SEQ ID NO: 52)
Мышь_область_1_НРНК_9	TGCTAAAACAATCCTATGGCTGG (SEQ ID NO: 53)
Мышь_область_1_НРНК_10	AAGTCCCTATCCCATCATCCAGG (SEQ ID NO: 54)
Мышь_область_1_НРНК_11	GGGAGAAAGGCATCTAGCCTCGG (SEQ ID NO: 55)
Мышь_область_1_НРНК_12	TGAGCATTGCAGACTAATCTTGG (SEQ ID NO: 56)
Мышь_область_1_НРНК_13	TTAGTTGTGGAATATACTTCAGG (SEQ ID NO: 57)
Мышь_область_1_НРНК_14	TGGTGGAGTCCCTGGATGATGGG (SEQ ID NO: 58)
Мышь_область_1_НРНК_15	GTGGAGATAATCTGTCCTAAAGG (SEQ ID NO: 59)
Мышь_область_1_НРНК_16	AGTCCCTATCCCATCATCCAGGG (SEQ ID NO: 60)
Мышь_область_1_НРНК_17	ATCTTGGATATTTGTCCCTGAGG (SEQ ID NO: 61)
Мышь_область_1_НРНК_18	GGGATAGTTGGGGCTGTAGTTGG (SEQ ID NO: 62)
Мышь_область_1_НРНК_19	CAGGTAAGAATGGCCTCTCCAGG (SEQ ID NO: 63)
Мышь_область_1_НРНК_20	TCTCTCAGCCGGCTCCCTCAGGG (SEQ ID NO: 64)

ФИГ. 13В (продолжение)

Мышь_1_НРНК_1	CAACUACCCUUUUGAGACCG (SEQ ID NO: 328)
Мышь_1_НРНК_2	UUAUACAGUAUCCGAUGCAU (SEQ ID NO: 87)
Мышь_1_НРНК_3	UAUACAGUAUCCGAUGCAUA (SEQ ID NO: 329)
Мышь_1_НРНК_4	CAUCUAGCCUCGGUCUCAAA (SEQ ID NO: 330)
Мышь_1_НРНК_5	CACUCUUUGUCCCUAUGCAU (SEQ ID NO: 331)
Мышь_1_НРНК_6	AUCUAGCCUCGGUCUCAAAA (SEQ ID NO: 332)
Мышь_1_НРНК_7	AAGUUUAAAACAAUCUAGUG (SEQ ID NO: 333)
Мышь_1_НРНК_8	AAGAUGCUGAAAACAAUCCUA (SEQ ID NO: 334)
Мышь_1_НРНК_9	UGCUGAAAACAAUCCUAUGGC (SEQ ID NO: 335)
Мышь_1_НРНК_10	AAGUCCCUAUCCCAUCAUCC (SEQ ID NO: 336)
Мышь_1_НРНК_11	GGGAGAAAGGCAUCUAGCCU (SEQ ID NO: 337)
Мышь_1_НРНК_12	UGAGCAUUGCAGACUAAUCU (SEQ ID NO: 338)
Мышь_1_НРНК_13	UUAGUUGUGGAAUAUACUUC (SEQ ID NO: 339)
Мышь_1_НРНК_14	UGGUGGAGUCCCUUGGAUGAU (SEQ ID NO: 340)
Мышь_1_НРНК_15	GUGGAGAUAAUCUGUCCUAA (SEQ ID NO: 341)
Мышь_1_НРНК_16	AGUCCCUAUCCCAUCAUCCA (SEQ ID NO: 342)
Мышь_1_НРНК_17	AUCUUGGAUAUUUGUCCCUUG (SEQ ID NO: 343)
Мышь_1_НРНК_18	GGGAUAGUUGGGGCUGUAGU (SEQ ID NO: 344)
Мышь_1_НРНК_19	CAGGUAAGAAUGGCCUCUCC (SEQ ID NO: 345)
Мышь_1_НРНК_20	UCUCUCAGCCGGCUCCCUCA (SEQ ID NO: 346)

18/110

ФИГ. 14А

Область интрона мышцы 2 для нацеливания для вставки генетической конструкции

TTATTTCAAGTTGAACATGCTGGTTGGTGGTTGAGAGGACACTCAGTCAGTCAGTGACGTGA
AGGGCTTCTAAGCCAGTCCACATGCTCTGTGTGAACTCCCTCTGGCCCTGCTTATTGTTGA
ATGGGCCAAAGGTCTGAGACCAGGCTGCTGCTGGGTAGGCCTGGACTTTGGGTCTCCCAC
CCAGACCTGGGAATGTATGGTTGTGGCTTCTGCCACCCATCCACCTGGCTGCTCATGGAC
CAGCCAGCCTCGGTGGCTTTGAAGGAACAATTCCACACAAAGACTCTGGACCTCTCCGAA
ACCAGGCACCGCAAATGGTAAGCCAGAGGCAGCCACAGCTGTGGCTGCTGCTCTTAAAGC
TTGTAAACTGTTTCTGCTTAAAGAGGGACTGAGTCTTCAGTCATTGCTTTAGGGGGAGAAAG
AGACATTTGTGTGTCTTTTGAAGTACCGTTGTCTGGGTCACTCACATTTAACTTTCTTGAAA
AACTAGTAAAAGAAAAATGTTGCCTGTTAACCAATAATCATAGAGCTCATGGTACTTTGAGG
AAATCTTAGAAAGCGTGTATACAATTGTCTGGAATTATTTCAAGTAAAGTGTATTAGTTGAGGT
ACTGATGCTGTCTCTACTTCAGTTATACATGTGGGTTTTGAATTTTGAATCTATTCTGGCTCTT
CTTAAAGCAGAAAATTTAGATAAAAATGGATACCTCAGTGGTTTTTAAATGGTGGGTTTAAATATA
GAAGGAATTTAAATTGGAAGCTAATTTAGAATCAGTAAGGAGGGACCCAGGCTAAGAAGGC
AATCCTGGGATTCTGGAAGAAAAGATGTTTTTAGTTTTTATAGAAAACACTACTACATTCTTG
ATCTACAACCTCAATGTGGTTTTAATGAATTTGAAGTTGCCAGTAAATGTAATTCCTGGTTGTTA
AGAATGGTATCAAAGGACAGTGCTTAGATCCGAGGTGAGTGTGAGAGGACAGGGGCTGG
GGTATGGATACGCAGAAGGAAGGCCACAGCTGTACAGAATTGAGAAAGAATAGAGACCTG
CAGTTGAGGCCAGCAGGTCGGCTGGACTAACTCTCCAGCCACAGTAATGACCCAGACAGA
GAAAGCCAGACTCATAAAGCTTGCTGAGCAAAATTAAGGGAACAAGGTTGAGAGCCCTAGT
AAGCGAGGCTCTAAAAAGCACAGCTGAGCTGAGATGGGTGGGCTTCTCTGAGTGCTTCTA
AAATGCGCTAACTGAGGTGATTACTCTGAGGTAAGCAAAGCTGGGCTTGAGCCAAAATGA
AGTAGACTGTAATGAACTGGAATGAGCTGGGCCGCTAAGCTAACTAGGCTGGCTTAACC
GAGATGAGCCAACTGGAATGAACTTCATTAATCTAGGTTGAATAGAGCTAACTCTACTGC
CTACACTGGACTGTTCTGAGCTGAGATGAGCTGGGGTGAGCTCAGCTATGCTACGCTGTG
TTGGGGTGAGCTGATCTGAAATGAGATACTCTGGAGTAGCTGAGATGGGGTGAGATGGGG
TG (SEQ ID NO: 4)

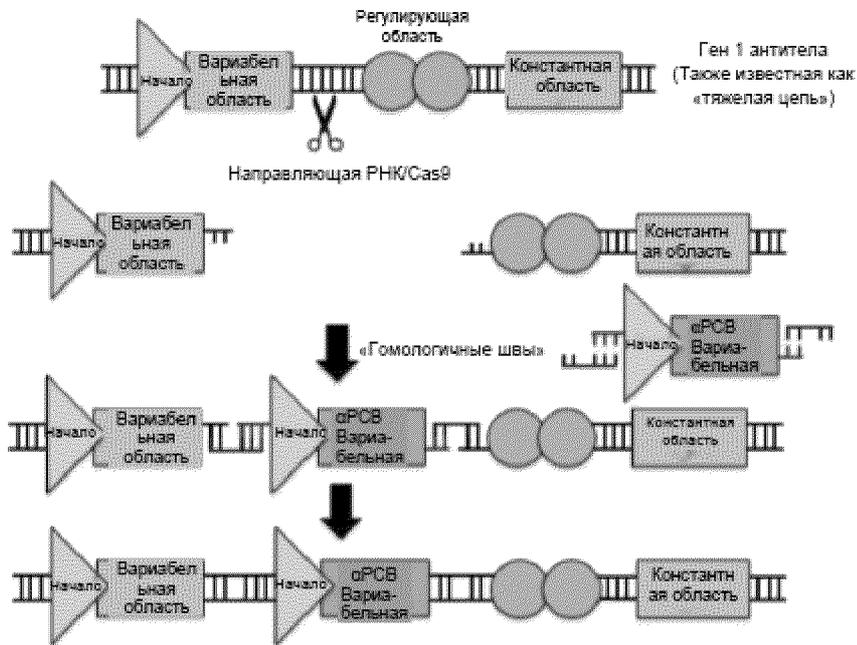
ФИГ. 14В

Мышь_область_2_нРНК__1	CCGAAACCAGGCACCGCAAATGG (SEQ ID NO: 65)
Мышь_область_2_нРНК__2	CACCGCAAATGGTAAGCCAGAGG (SEQ ID NO: 66)
Мышь_область_2_нРНК__3	GGCTTACCATTTGCGGTGCCTGG (SEQ ID NO: 67)
Мышь_область_2_нРНК__4	TGCGGTGCCTGGTTTCGGAGAGG (SEQ ID NO: 68)
Мышь_область_2_нРНК__5	CAGCTATGCTACGCTGTGTTGGG (SEQ ID NO: 69)
Мышь_область_2_нРНК__6	AAGGACAGTGCTTAGATCCGAGG (SEQ ID NO: 70)
Мышь_область_2_нРНК__7	TCAGTCAGTCAGTGACGTGAAGG (SEQ ID NO: 71)
Мышь_область_2_нРНК__8	CATGCTGGTTGGTGGTTGAGAGG (SEQ ID NO: 72)
Мышь_область_2_нРНК__9	TCTTTTGAGTACCGTTGTCTGGG (SEQ ID NO: 73)
Мышь_область_2_нРНК__10	TGGCCCATTCACAATAAGCAGG (SEQ ID NO: 74)
Мышь_область_2_нРНК__11	CTGGGCCGCTAAGCTAAACTAGG (SEQ ID NO: 75)
Мышь_область_2_нРНК__12	GCCAGCCTAGTTTAGCTTAGCGG (SEQ ID NO: 76)
Мышь_область_2_нРНК__13	TGAAGTAGACTGTAATGAACTGG (SEQ ID NO: 77)
Мышь_область_2_нРНК__14	GACCTGGGAATGTATGGTTGTGG (SEQ ID NO: 78)
Мышь_область_2_нРНК__15	GGTATGGATACGCAGAAGGAAGG (SEQ ID NO: 79)
Мышь_область_2_нРНК__16	GTTGAGAGCCCTAGTAAGCGAGG (SEQ ID NO: 80)
Мышь_область_2_нРНК__17	GCCGCTAAGCTAAACTAGGCTGG (SEQ ID NO: 81)
Мышь_область_2_нРНК__18	TCAGCTATGCTACGCTGTGTTGG (SEQ ID NO: 82)
Мышь_область_2_нРНК__19	TTTTAGAGCCTCGCTTACTAGGG (SEQ ID NO: 83)
Мышь_область_2_нРНК__20	CTCTATGATTATTGGTTAACAGG (SEQ ID NO: 84)

ФИГ. 14В (продолжение)

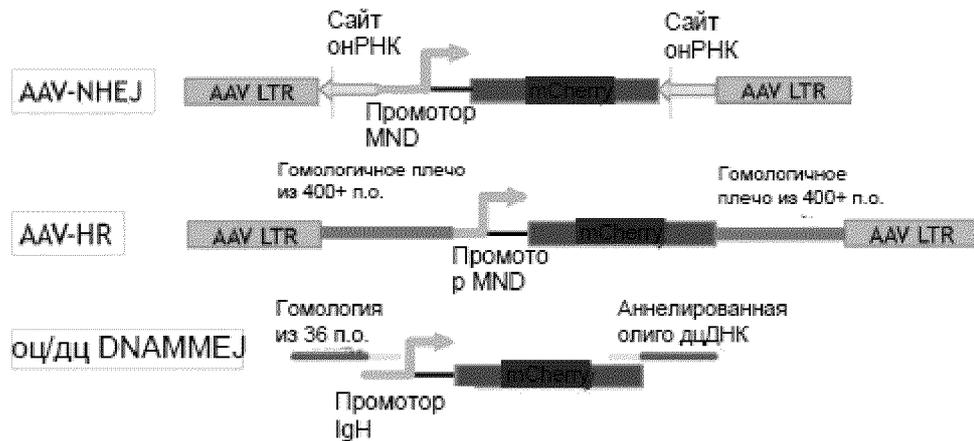
Мышь_2_нРНК__1	CCGAAACCAGGCACCGCAA (SEQ ID NO: 347)
Мышь_2_нРНК__2	CACCGCAAUUGGUAAGCCAG (SEQ ID NO: 348)
Мышь_2_нРНК__3	GGCUUACCAUUUGCGGUGCC (SEQ ID NO: 349)
Мышь_2_нРНК__4	UGCGGUGCCUGGUUUCGGAG (SEQ ID NO: 350)
Мышь_2_нРНК__5	CAGCUAUGCUACGCUGUGUU (SEQ ID NO: 351)
Мышь_2_нРНК__6	AAGGACAGUGCUUAGAUCGG (SEQ ID NO: 352)
Мышь_2_нРНК__7	UCAGUCAGUCAGUGACGUGA (SEQ ID NO: 353)
Мышь_2_нРНК__8	CAUGCUGGUUGGUGGUUGAG (SEQ ID NO: 354)
Мышь_2_нРНК__9	UCUUUUGAGUACCGUUGUCU (SEQ ID NO: 355)
Мышь_2_нРНК__10	UGGCCCAUUCAACAAUAAGC (SEQ ID NO: 356)
Мышь_2_нРНК__11	CUGGGCCGCUAAGCUAAACU (SEQ ID NO: 357)
Мышь_2_нРНК__12	GCCAGCCUAGUUUAGCUUAG (SEQ ID NO: 358)
Мышь_2_нРНК__13	UGAAGUAGACUGUAAUGAAC (SEQ ID NO: 359)
Мышь_2_нРНК__14	GACCUGGGAAUGUAUGGUUG (SEQ ID NO: 360)
Мышь_2_нРНК__15	GGUAUGGAUACGCAGAAGGA (SEQ ID NO: 361)
Мышь_2_нРНК__16	GUUGAGAGCCCUAGUAAGCG (SEQ ID NO: 362)
Мышь_2_нРНК__17	GCCGCUAAGCUAAACUAGGC (SEQ ID NO: 363)
Мышь_2_нРНК__18	UCAGCUAUGCUACGCUGUGU (SEQ ID NO: 364)
Мышь_2_нРНК__19	UUUUAGAGCCUCGCUUACUA (SEQ ID NO: 365)
Мышь_2_нРНК__20	CUCUAUGAUUAUUGGUUAAAC (SEQ ID NO: 366)

ФИГ. 15А

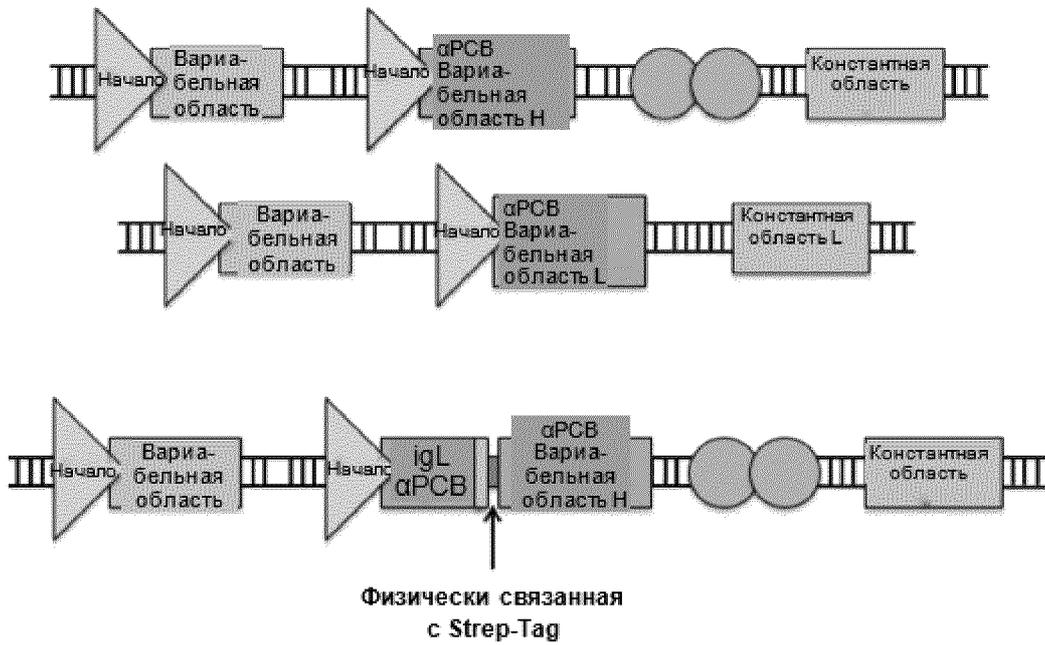


ФИГ. 15В

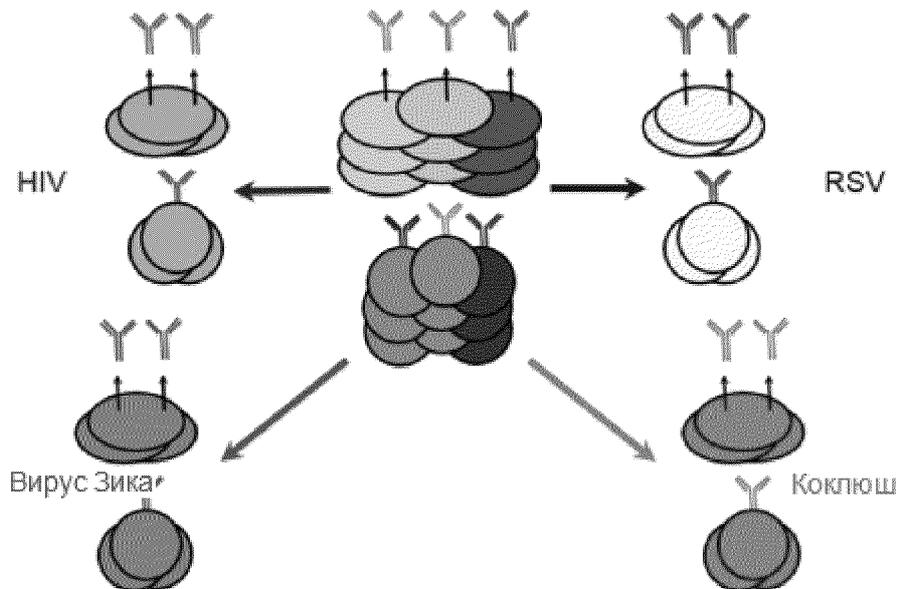
Шаблоны репарирования



ФИГ. 16



ФИГ. 17

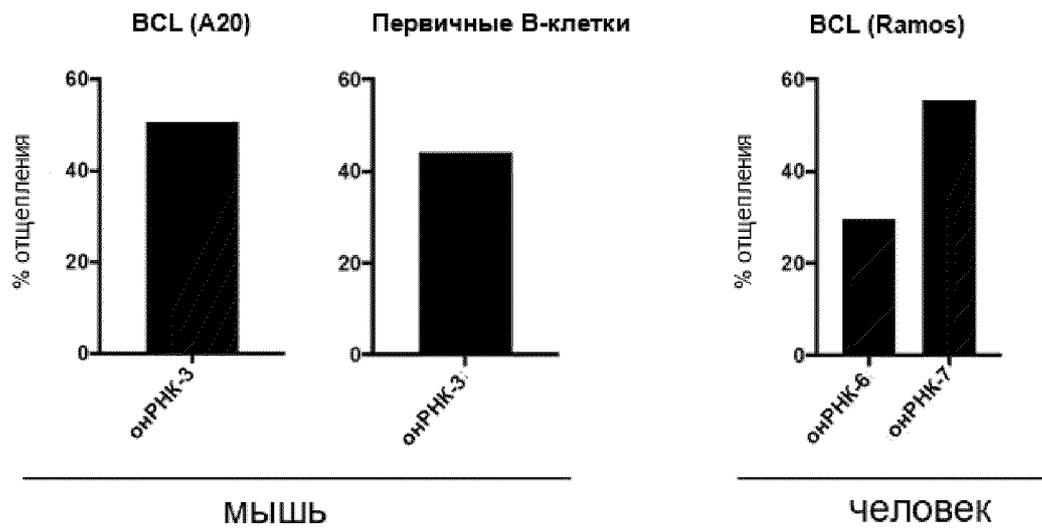


ФИГ. 18А

ФИГ. 18В

ФИГ. 18С

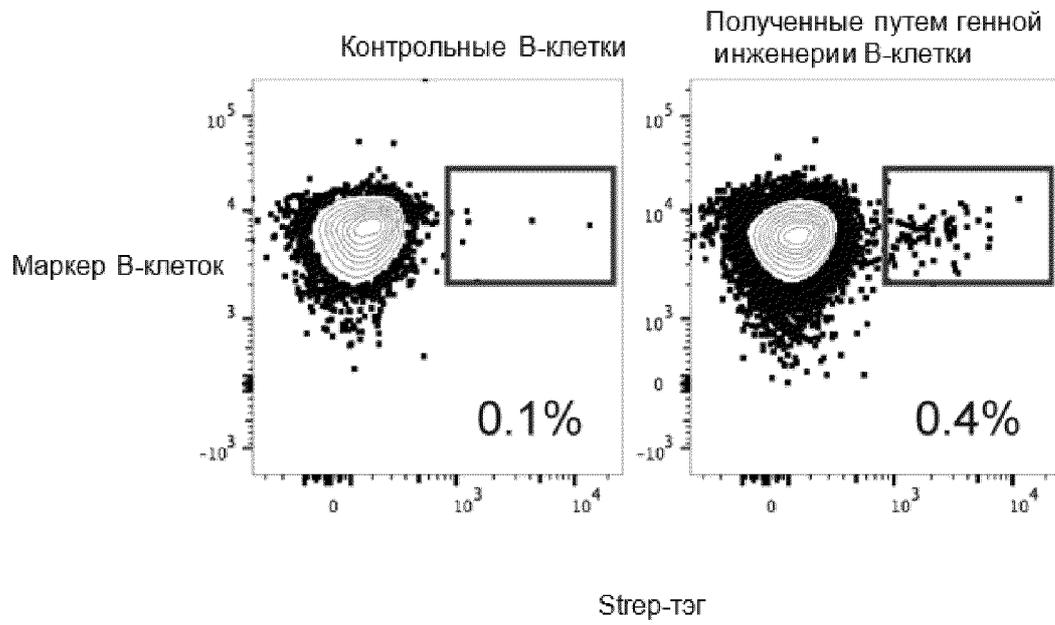
Клетки подвергшиеся электропорированию с помощью комплекса Cas9-онРНК



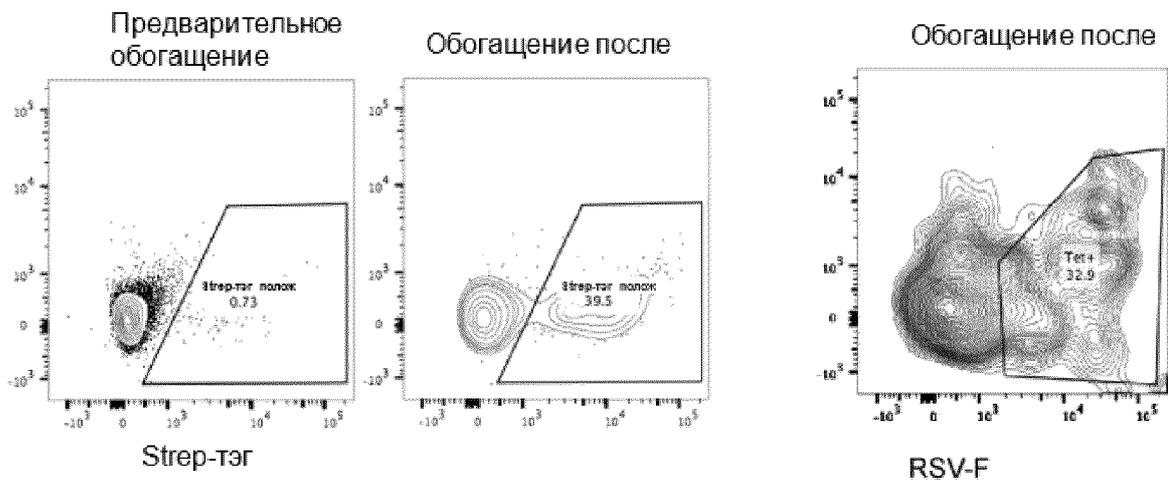
24/110

ФИГ. 19

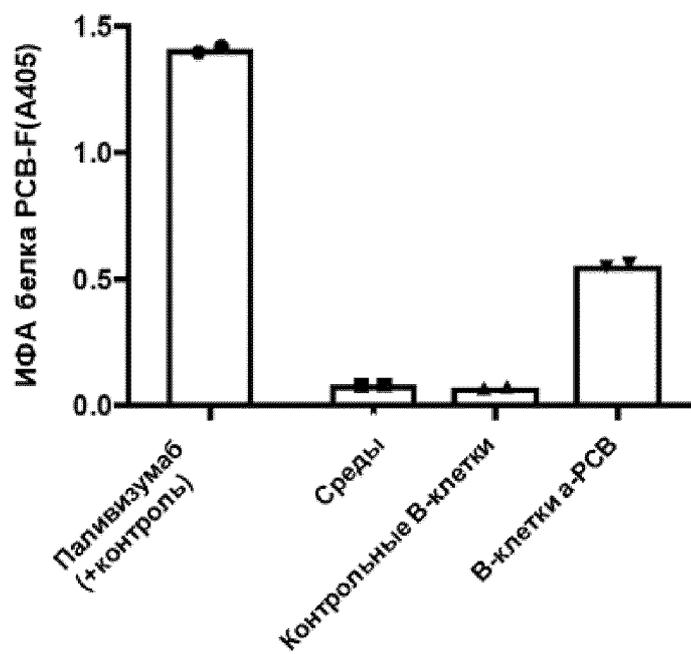
Цель: 1-10 %



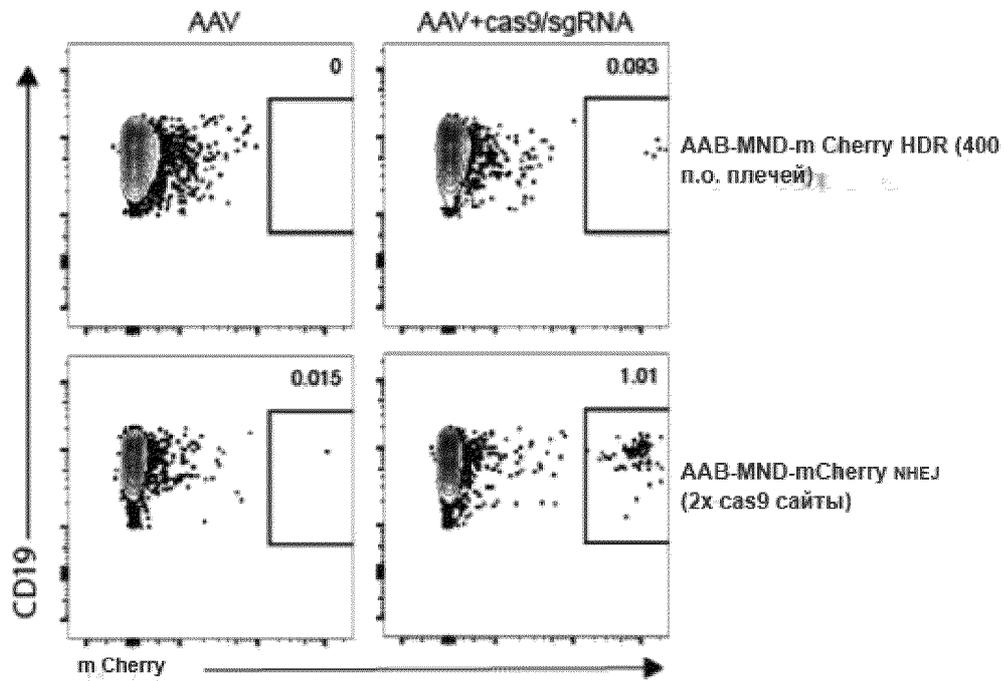
ФИГ. 20



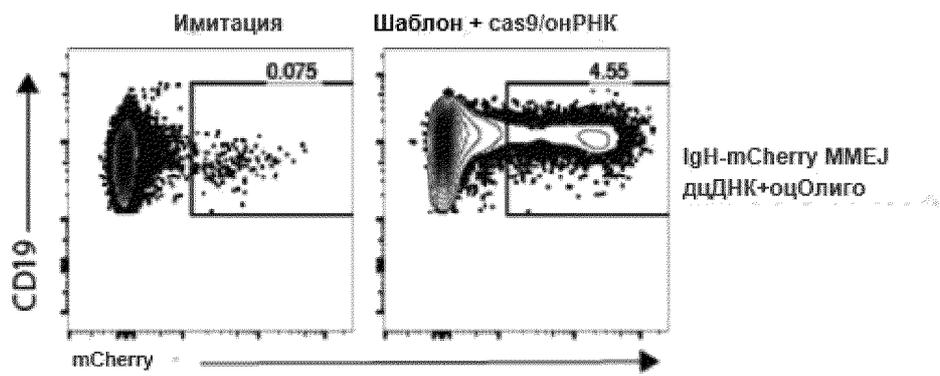
ФИГ. 21



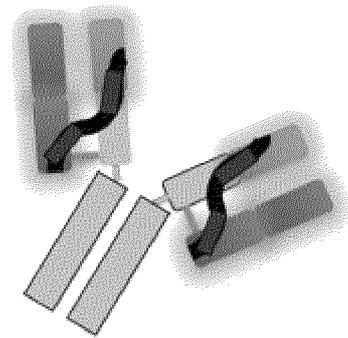
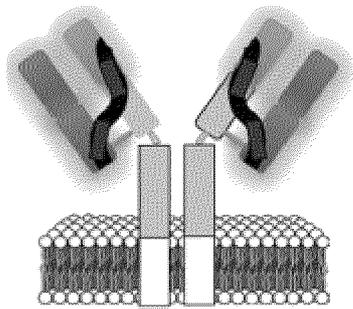
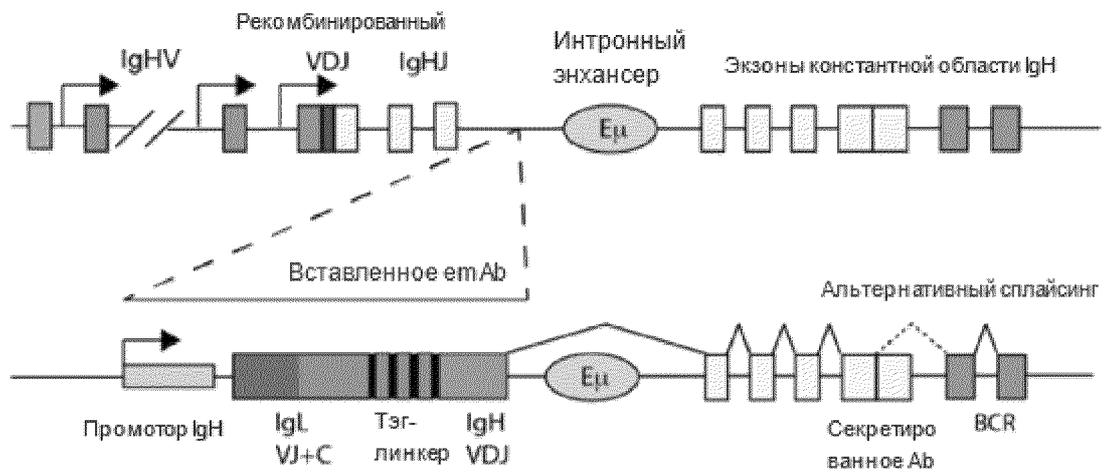
ФИГ. 22А



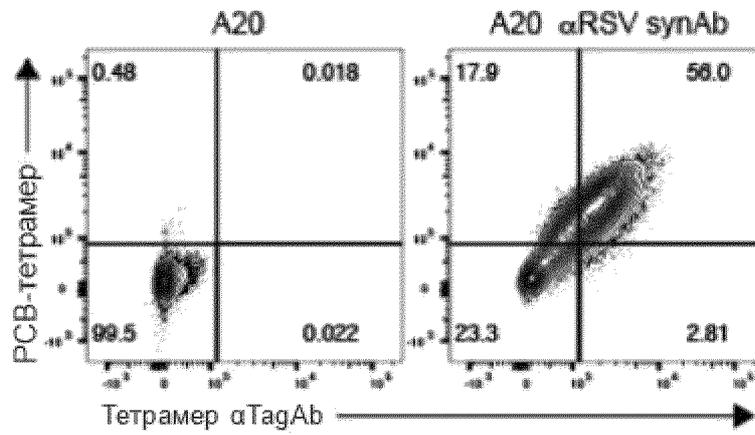
ФИГ. 22В



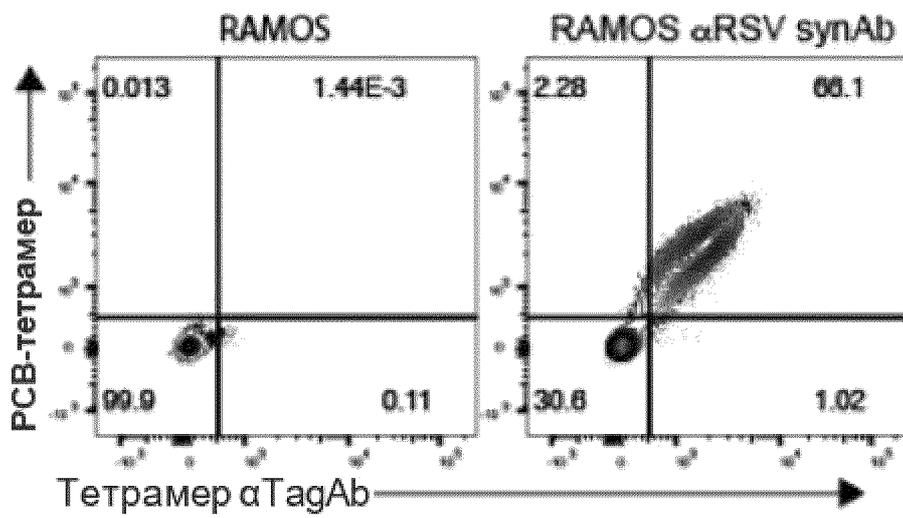
ФИГ. 23А



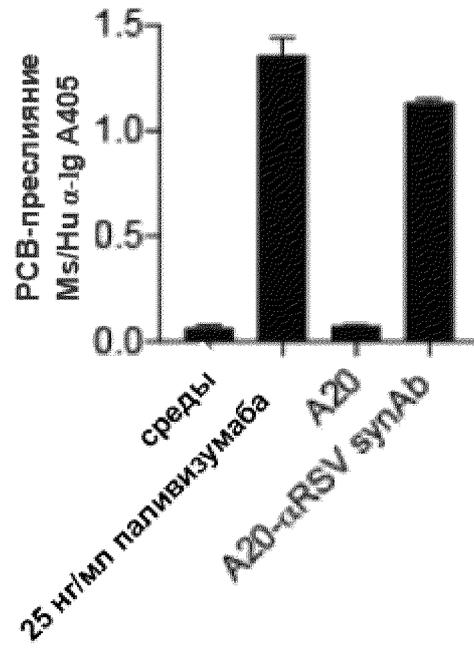
ФИГ. 23В



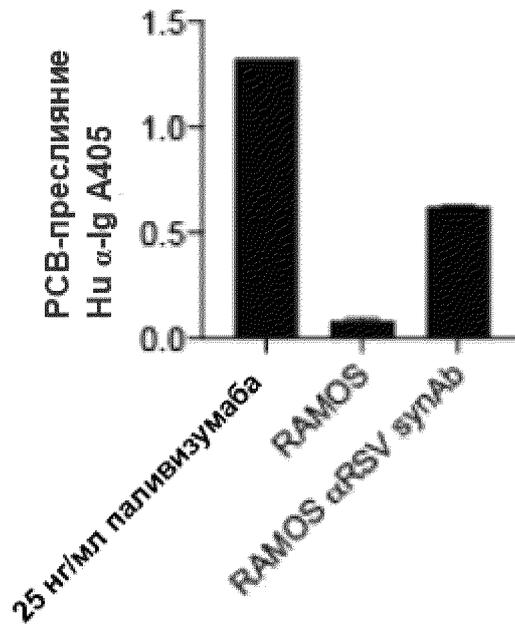
ФИГ. 23С



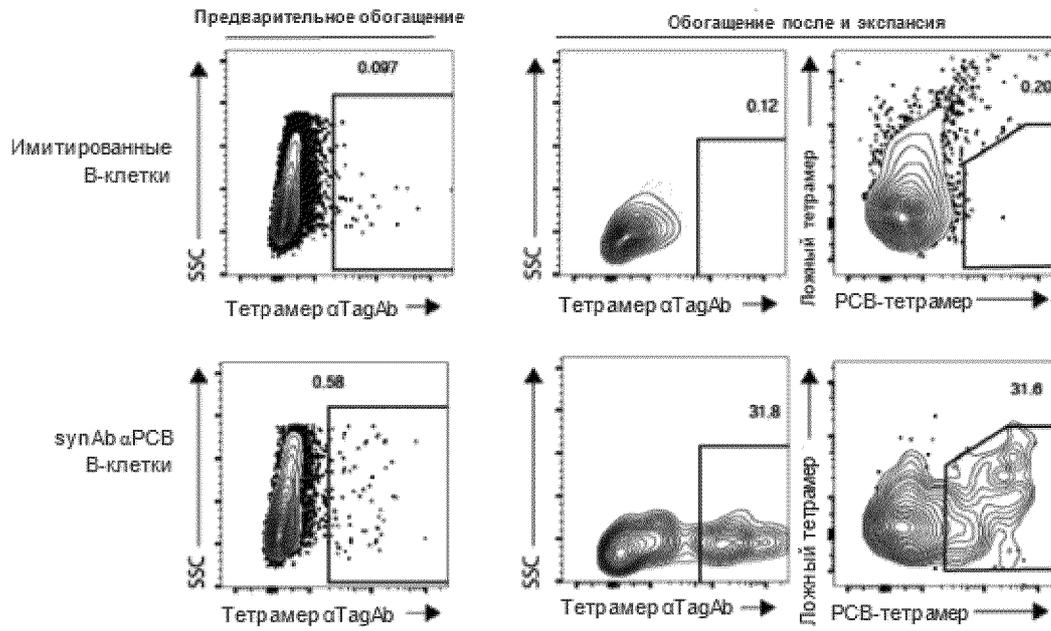
ФИГ. 23D



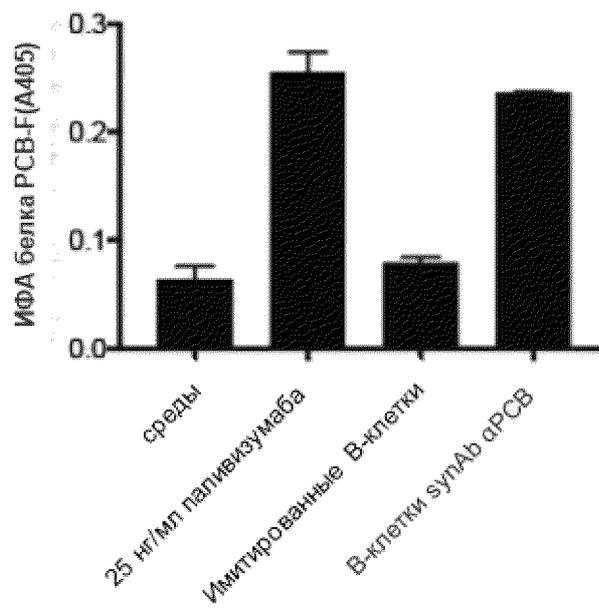
ФИГ. 23E



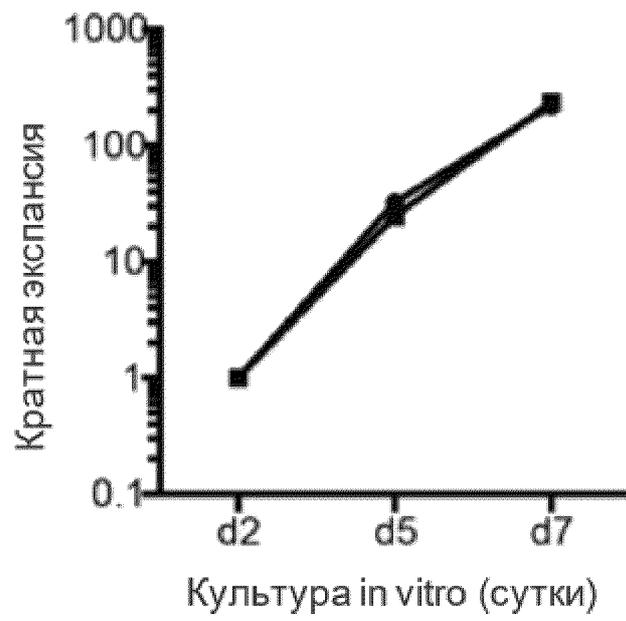
ФИГ. 24А



ФИГ. 24В



ФИГ. 24С



32/110

Последовательности онРНК:

ФИГ. 25А

Мышь: онРНК-mlgH_3: UUAUACAGUAUCCGAUGCAU (SEQ ID NO: 87)
Человек: онРНК-hlgH-6: GCAUUGCAGGUUGGUCCUCG (SEQ ID NO: 88)
онРНК-hlgH-7: GUCUCAGGAGCGGUGUCUGU (SEQ ID NO: 89)

Области гомологии генома мыши (для онРНК-mlgH_3):

Выше: CATCGGATACTGTATAAATGCTGTACAGAGGTGGT (SEQ ID NO: 90)
Ниже: CATAGGGACAAAGAGTGGAGTGGGGCACTTTCTTTA (SEQ ID NO: 91)

Области гомологии генома человека (для онРНК-hlgH-7):

GACACCGCTCCTGAGACACATTCCTCAGCCATCACT (SEQ ID NO: 92)
TGTAGGACTGCAAGATCGCTGCACAGCAGCGAATCG (SEQ ID NO: 93)

Области гомологии генома человека (для онРНК-hlgH-6):

GGGACCAACCTGCAATGCTCAGGAAACCCACAGGCA (SEQ ID NO: 94)
TTCGGGGCATGTTCCGAGGGGACCTGGGCGGACTGGC (SEQ ID NO: 95)

Сплайсинг-олигонуклеотиды (гомология геному обозначена жирным шрифтом):

Мышь(для онРНК-mlgH_3):

Выше: CTTCGAGACATGTACAGACCATTTAGATGTAGTATCAAAGCCTAATATCTCAATCTTAA
AATAGAATCCTAACCTGAGACACTCACTTGTCC**CATCGGATACTGTATAAATGCTGTCA**
CAGAGGTGGT (SEQ ID NO: 96)
Ниже: CTTCTCCCATTCTAAATGCATGTTGGGGGGATTCTGGGCCTTCAGGACCACATAGGG
ACAAAGAGTGGAGTGGGGCACTTTCTTTA (SEQ ID NO: 97)

Человек (для онРНК-hlgH-7):

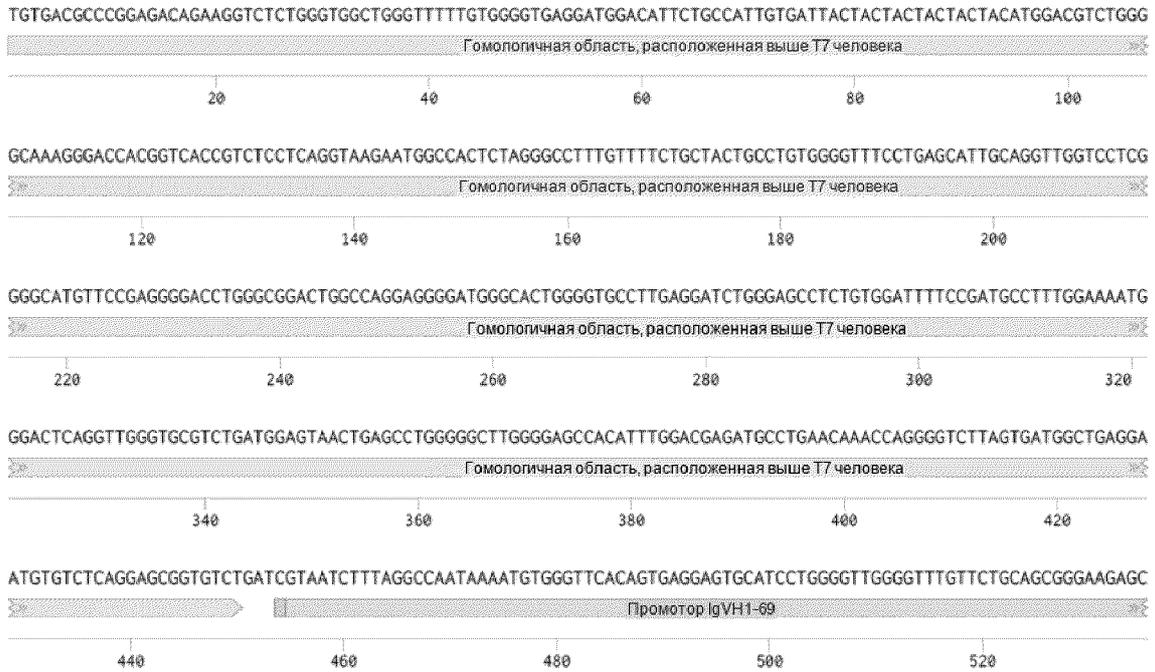
Выше: GTGCACAGCGCTCTTCCCGCTGCAGAACAAACCCCAACCCCAAGGATGCACTCCTCAC
TGTGAACCCACATTTTATTGGCCTAAAGATTAC**GGACACCGCTCCTGAGACACATTC**
CTCAGCCATCACT (SEQ ID NO: 98)
Ниже: GTCTGGGGATAGCGGGGAGCCAGGTGTACTGGGCCAGGCAAGGGCTTTGGTGTAG
GACTGCAAGATCGCTGCACAGCAGCGAATCG (SEQ ID NO: 99)

Человек (для онРНК-hlgH-6):

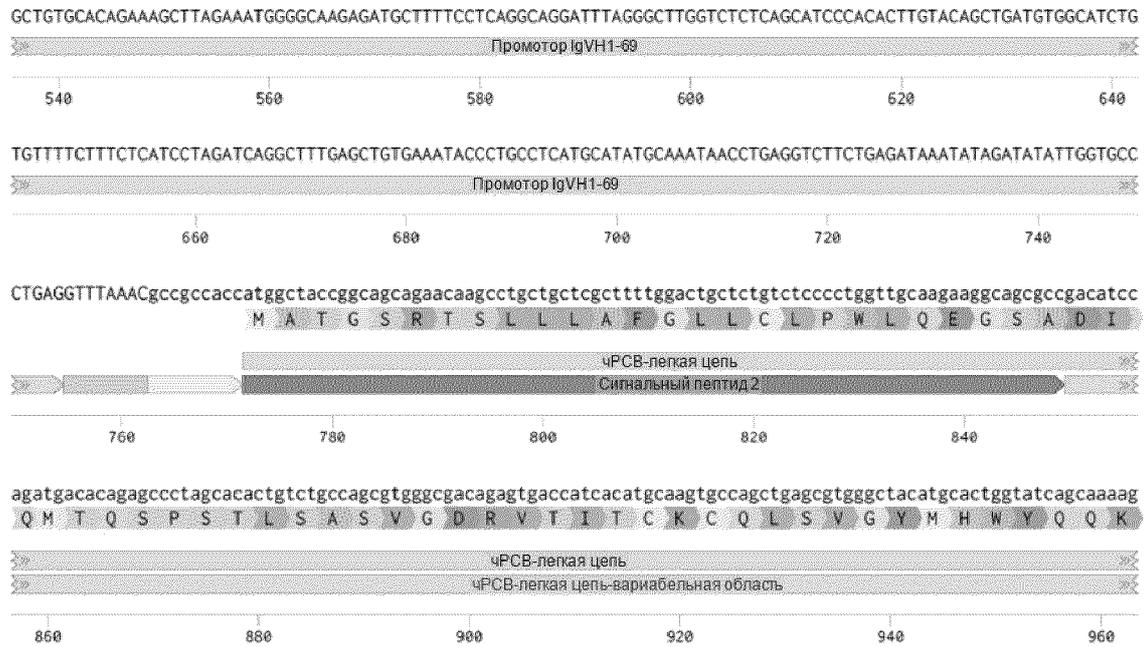
Выше: GTGCACAGCGCTCTTCCCGCTGCAGAACAAACCCCAACCCCAAGGATGCACTCCTCAC
TGTGAACCCACATTTTATTGGCCTAAAGATTAC**GGGGACCAACCTGCAATGCTCAGG**
AAACCCACAGGCA (SEQ ID NO: 100)
Ниже: GTCTGGGGATAGCGGGGAGCCAGGTGTACTGGGCCAGGCAAGGGCTTTGGTTCGG
GGCATGTTCCGAGGGGACCTGGGCGGACTGGC (SEQ ID NO: 101)

33/110

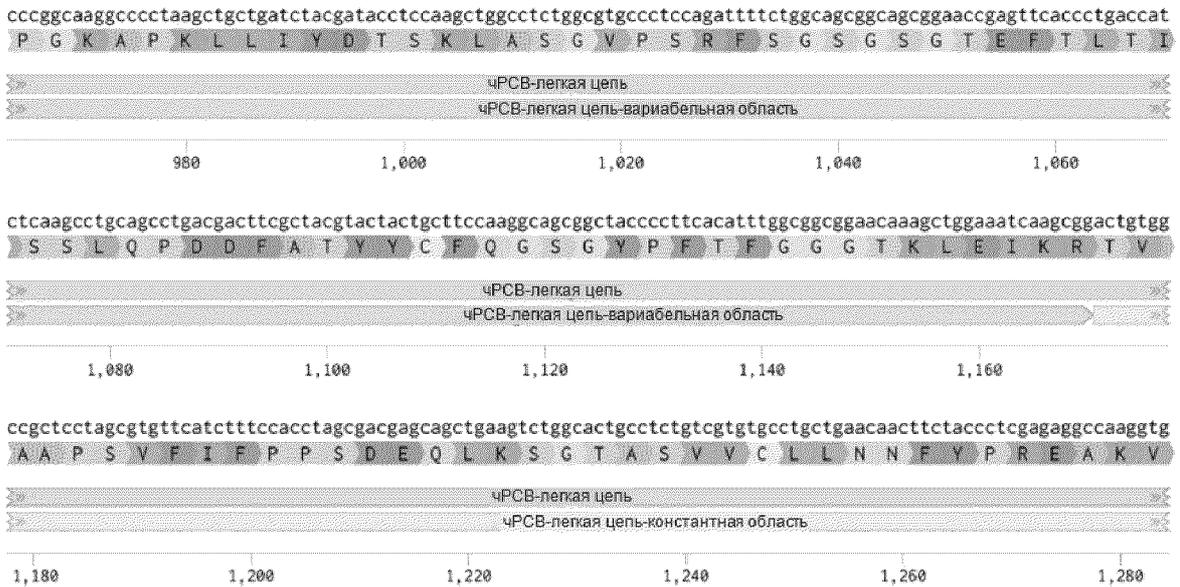
ФИГ. 25В
анти-PCB-эмАб ААВ человека (2531 п.о)



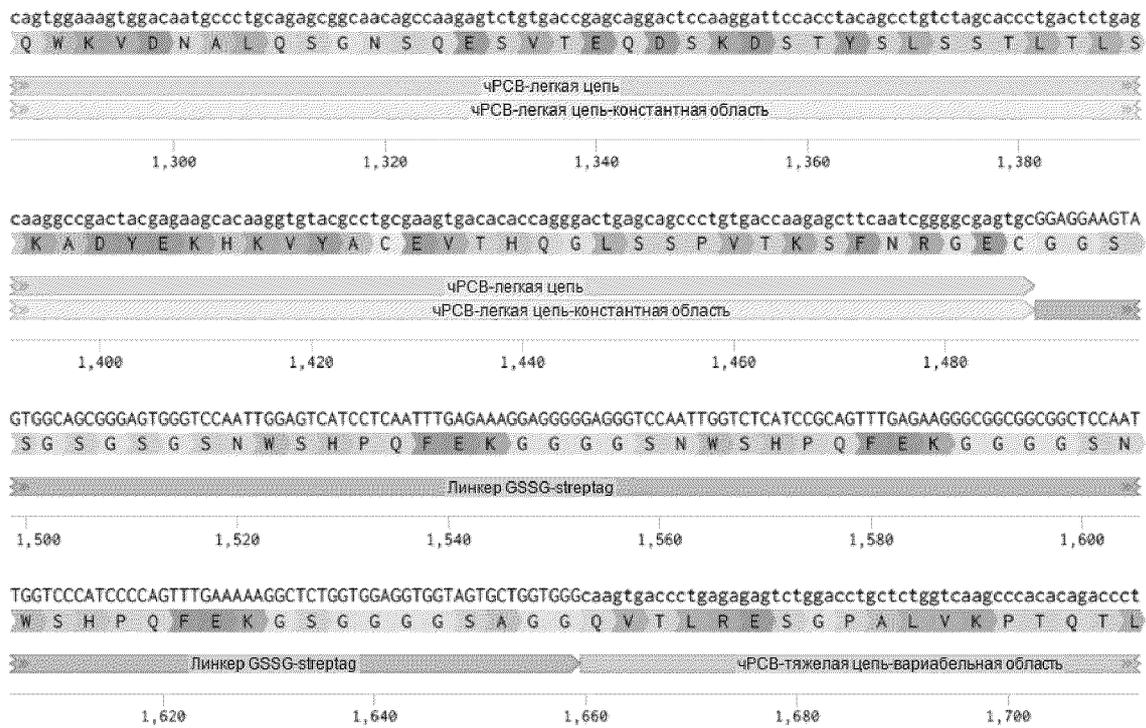
ФИГ. 25В (продолжение)



ФИГ. 25В (продолжение)

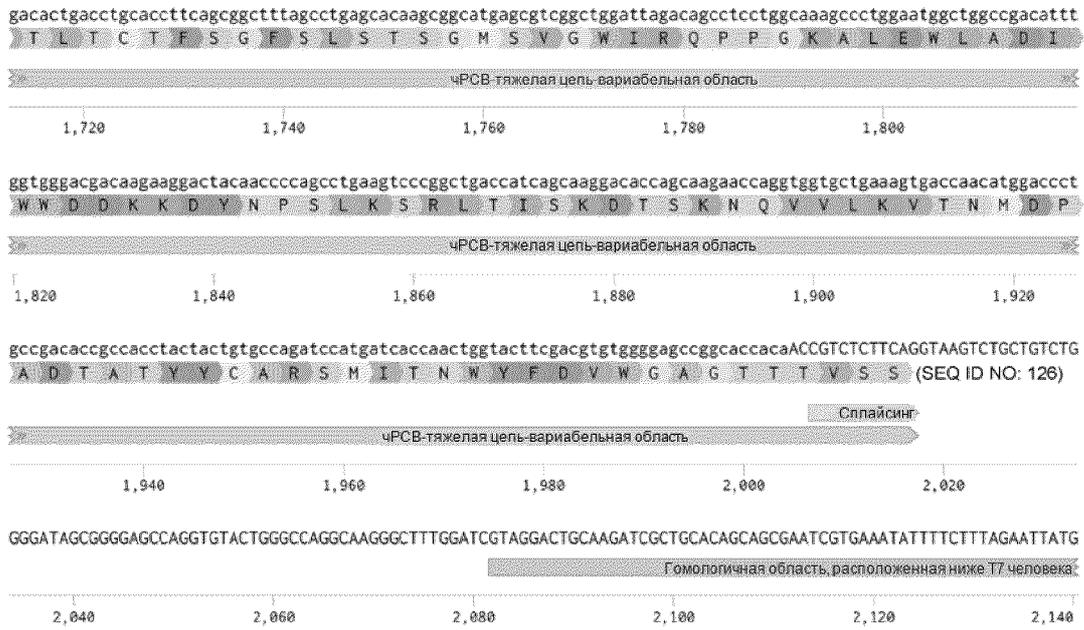


ФИГ. 25В (продолжение)

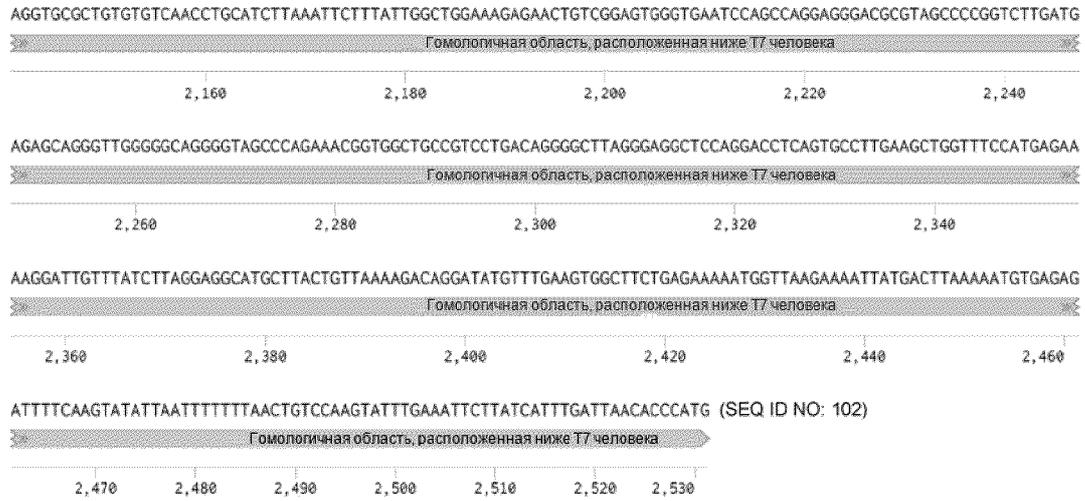


37/110

ФИГ. 25В (продолжение)



ФИГ. 25В (продолжение)



ФИГ. 25В (продолжение)

>Гомологичная область, расположенная выше Т7 человека, в анти-PCB эмAb AAB человека
TGTGACGCCCCGAGACAGAAAGGTCTCTGGGTGGCTGGGTTTTTGTGGGGTGAGGATGGACATTCTGCCATTGTGATTACTACTA
CTACTACTACATGGACGTCTGGGGCAAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGGTAAGAATGGCCACTCTAGGGCCTTTGTTTT
CTGCTACTGCCTGTGGGGTTTCTGAGCATTGCAGTTGGTCTCGGGGCATGTTCCGAGGGGACCTGGGCGGACTGGCCAG
GAGGGGATGGGCACTGGGGTGCCTTGAGGATCTGGGAGCCTCTGTGGATTTCCGATGCCTTTGGAAAATGGGACTCAGGTTG
GGTGCCTCTGATGGAGTAACTGAGCCTGGGGGCTTGGGGAGCCACATTTGGACGAGATGCCTGAACAAAACAGGGGTCTTAGT
GATGGCTGAGGAATGTGTCTCAGGAGCGGTGTCT (SEQ ID NO: 110)

>Промотор IgVH1-69 в анти-PCB эмAb ABB человека
GTAATCTTTAGGCCAATAAAATGTGGGTTCCACAGTGAGGAGTGCATCCTGGGGTTGGGTTTGTCTGCAGCGGGAAGAGCGCT
GTGCACAGAAAGCTTAGAAATGGGGCAAGAGATGCTTTTCTCAGGCAGGATTTAGGGCTTGGTCTCTCAGCATCCACACTTG
TACAGCTGATGTGGCATCTGTGTCTTTCTTCTCATCCTAGATCAGGCTTTGAGCTGTGAAATACCCTGCCTCATGCATATGCAAA
AACCTGAGGTCTTCTGAGATAAATATAGATATATTGGTGCCCTGAG (SEQ ID NO: 111)

>Последовательность, кодирующая сигнальный пептид в анти-PCB эмAb AAB человека
ATGGCTACCGGCAGCAGAAACAAGCCTGCTGCTCGCTTTTGGACTGCTCTGTCTCCCCTGGTTGCAAGAAGGCAGCGCC (SEQ ID
NO: 112)

>Последовательность, кодирующая легкую цепь чPCB в анти-PCB эмAb AAB человека
ATGGCTACCGGCAGCAGAAACAAGCCTGCTGCTCGCTTTTGGACTGCTCTGTCTCCCCTGGTTGCAAGAAGGCAGCGCCGACAT
CCAGATGACACAGAGCCCTAGCACACTGTCTGCCAGCCTGGGGCAGAGTGACCATCACATGCAAGTGCCAGCTGAGCGTGG
GCTACATGCACTGGTATCAGCAAAAAGCCCGGCAAGGCCCTAAAGCTGCTGATCTACGATACCTCAAAGCTGGCCTCTGGCGTG
CCCTCCAGATTTTCTGGCAGCGGCAAGCGGAACCGAGTTCAACCTGACCATCTCAAGCCTGCAGCCTGACGACTTCGCTACGTAC
TACTGCTTCCAAGGCAGCGGCTACCCCTTACATTTGGCGCGGAACAAGCTGGAATCAAGCGGACTGTGGCCGCTCCTAG
CGTGTTCATCTTTCCACCTAGCGAGCAGCAGCTGAAGTCTGGCACTGCCTCTGTCTGTGCTGCTGAAACAACCTTACCCCTG
AGAGGCCAAGGTGCAAGTGAAGTGAACAATGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAAGAGTCTGTGACCGAGCAGGACTCCAAG
GATTCACCTACAGCCTGTCTAGCACCTGACTCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCCTGCGAAGTGAC
ACACCAGGGACTGAGCAGCCCTGTGACCAAGAGCTTCAATCGGGGCGAGTGC (SEQ ID NO: 113)

40/110

ФИГ. 25В (продолжение)

>Последовательность, кодирующая переменную область легкой цепи κ PCB в анти-PCB эмAb AAB человека
GACATCCAGATGACACAGAGCCCTAGCACACTGTCTGCCAGCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACATGCAAGTGCCAGCTGAG
CGTGGGCTACATGCACTGGTATCAGCAAAAGCCCGGCAAGGCCCTAAGCTGCTGATCTACGATACCTCCAAGCTGGCCTCTG
GCGTGCCCTCCAGATTTTCTGGCAGCGGCAGCGGAACCGAGTTACCCCTGACCATCTCAAGCCTGCAGCCTGACGACTTCGCT
ACGTACTACTGCTTCCAAGGACGCGGCTACCCCTTACATTTGGCGGCGGAACAAAGCTGGAATCAAGCGG (SEQ ID NO: 114)

>Последовательность, кодирующая константную область легкой цепи каппа в анти-PCB эмAb AAB человека
ACTGTGGCCGCTCCTAGCGTGTTCATCTTTCCACCTAGCGACGAGCAGCTGAAGTCTGGCACTGCCTCTGTGCTGTGCCTGCTG
AACAACTTCTACCTCGAGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAAGTGGACAATGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAAGAGTCTGTGAC
CGAGCAGGACTCCAAGGATTCACCTACAGCCTGTCTAGCACCTGACTCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGT
ACGCCTGCGAAGTGACACACCAGGGACTGAGCAGCCCTGTGACCAAGAGCTTCAATCGGGGCGAGTGC (SEQ ID NO: 115)

>Последовательность, кодирующая линкер GSSG-streptag в анти-PCB эмAb AAB человека
GGAGGAAGTAGTGGCAGCGGGAGTGGGTCCAATTGGAGTCACTCAATTTGAGAAAGGAGGGGAGGGTCCAATTGGTCTCA
TCCGCAGTTTGAGAAGGGCGGGCGGCTCCAATTGGTCCATCCCCAGTTTGAAAAGGCTCTGGTGGAGGTGGTAGTCTG
GTGGG (SEQ ID NO: 116)

>Последовательность, кодирующая переменную область тяжелой цепи γ PCB в анти-PCB эмAb AAB человека
CAAGTGACCTGAGAGAGTCTGGACCTGCTCTGGTCAAGCCCACACAGACCTTGACACTGACCTGCACCTTCAGCGGCTTTAG
CCTGAGCACAAGCGGCATGAGCGTCGGCTGGATTAGACAGCCTCCTGGCAAAGCCCTGGAATGGCTGGCCGACATTTGGTGG
GACGACAAGAAGGACTACAACCCAGCCTGAAGTCCCGCTGACCATCAGCAAAGGACACCAGCAAGAACCAGGTGGTGTGAA
AGTGACCAACATGGACCCTGCCGACACCGCCACCTACTACTGTGCCAGATCCATGATCACCAACTGGTACTTCGACGTGTGGG
AGCCGGCACCAACAACCGTCTCTTCA (SEQ ID NO: 117)

>Аминокислотная последовательность сигнального пептида в анти-PCB эмAb AAB человека
MATGSRTSLLAFGLLCLPWLEGS (SEQ ID NO: 118)

ФИГ. 25В (продолжение)

>Аминокислотная последовательность легкой цепи чPCB в анти-PCB emAb AAB человека

MATGSRISLLAFGLLCLPWLEQGSADIQMTQSPSTLSASVGDRTITCKCQLSVGYMHWYQQKPGKAPKLLIYDTSKLAGVPSRFS
GSGSGTEFTLTISLQPDFFATYYCFQGGSGYPFTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPRFAKVVQWKVD
NALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 119)

>Аминокислотная последовательность варибельной области легкой цепи чPCB в анти-PCB emAb AAB человека

DIQMTQSPSTLSASVGDRTITCKCQLSVGYMHWYQQKPGKAPKLLIYDTSKLAGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDFFATYYCF
QGGSGYPFTFGGGTKLEIKR (SEQ ID NO: 120)

>Аминокислотная последовательность константной области легкой цепи каппа чPCB в анти-PCB emAb AAB человека

TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPRFAKVVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEV
THQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 121)

>Аминокислотная последовательность линкера GSSG-streptag в анти-PCB emAb AAB человека

GGSSGSGSNWHPQFEKGGGSGSNWHPQFEKGGGSGSNWHPQFEKGGGSGGGSAGG (SEQ ID NO: 122)

>Аминокислотная последовательность варибельной тяжелой цепи чPCB в анти-PCB emAb AAB человека

QVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGMSVGVIRQPPGKALEWLADIWDDKDD
YNPSLKSRLTISKDTSKNQVVLKVTNMDPADTATYYCARSMITNWFYFDVWGAGTTTVSS (SEQ ID NO: 123)

>Граница сплайсинга с фланкирующей последовательностью в анти-PCB emAb AAB человека

CAGGTAAGTCTGCTGTCTGGGGATAGCGGGGAGCCAGGTGTACTGGGCCAGGCAAGGGCTTTGGATC (SEQ ID NO: 124)

>Гомологичная область, расположенная ниже T7 человека в анти-PCB emAb AAB человека

GTAGGACTGCAAGATCGCTGCACAGCAGCGAATCGTGAAATATTTCTTTAGAAATTATGAGGTGCGCTGTGTGTCAACCTGCATC
TTAAATTCCTTATTGGCTGGAAAGAGAACTGTCGGAGTGGGTGAATCCAGCCAGGAGGGACGCGTAGCCCCGGTCTTGATGAGA
GCAGGGTTGGGGCAGGGGTAGCCAGAAACGGTGGCTGCCGTCTGACAGGGGCTTAGGGAGGCTCCAGGACCTCAGTGC
CTTGAAGCTGGTTTCCATGAGAAAAGGATTGTTTATCTTAGGAGGCATGCTTACTGTTAAAAGACAGGATATGTTTGAAGTGGCTT
CTGAGAAAAATGGTTAAGAAAAATTGACTTAAAAATGTGAGAGATTTTCAAGTATATTAATTTTTTAACTGTCCAAGTATTTGAAA
TTCTTATCATTGATTAACACCCATG (SEQ ID NO: 125)

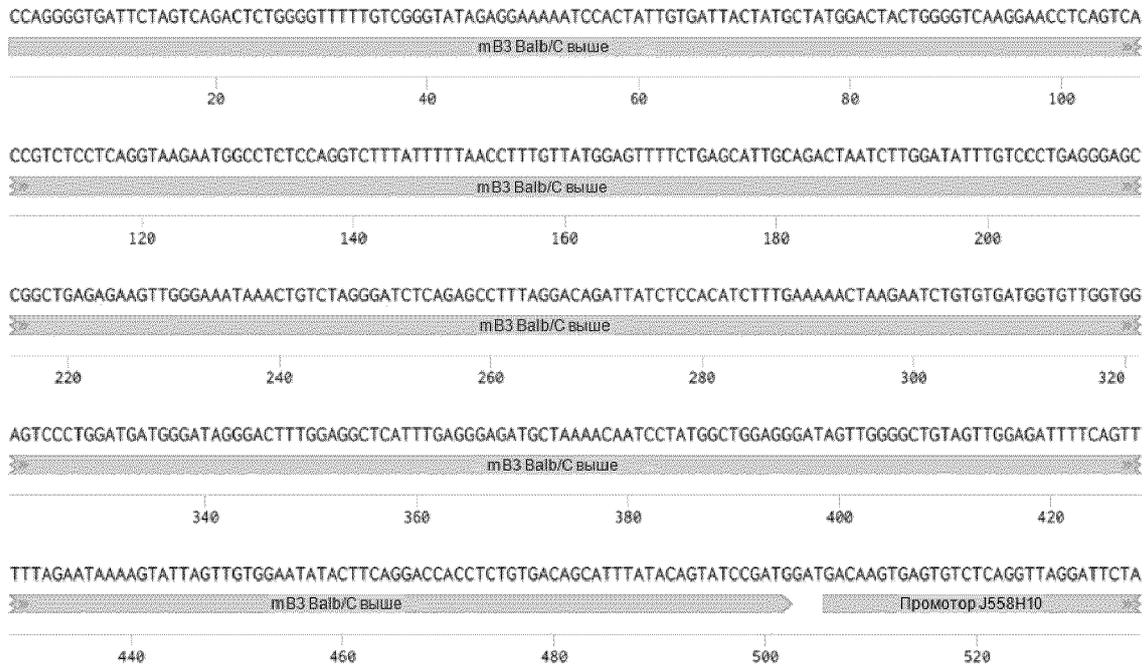
ФИГ. 25В (продолжение)

>Последовательность, кодирующая легкую цепь чPCB без сигнальной последовательности в анти-PCB emAb AAB человека
GACATCCAGATGACACAGAGCCCTAGCACACTGTCTGCCAGCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACATGCAAGTGCCAGCTGAG
CGTGGGCTACATGCACTGGTATCAGCAAAAGCCCGGCAAGGCCCTAAGCTGCTGATCTACGATACCTCCAAGCTGGCCTCTG
GCGTGCCCTCCAGATTTTCTGGCAGCGGCAGCGGAACCGAGTTCACCCCTGACCATCTCAAGCCTGCAGCCTGACGACTTCGCT
ACGTACTACTGCTTCCAAGGCAGCGGCTACCCCTTACATTTGGCGCGGAACAAAGCTGGAAATCAAGCGGACTGTGGCCGC
TCCTAGCGTGTTTCATCTTTCCACCTAGCGACGAGCAGCTGAAGTCTGGCACTGCCTCTGTCTGTGCTGCTGAACAATTCTA
CCCTCGAGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAAGTGGACAATGCCCTGCAGAGCGCAACAGCCAAGAGTCTGTGACCGAGCAGGAC
TCCAAGGATTCCACCTACAGCCTGTCTAGCACCCCTGACTCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGCCA
AGTGACACACCAGGGACTGAGCAGCCCTGTGACCAAGAGCTTCAATCGGGGCGAGTGC (SEQ ID NO: 280)

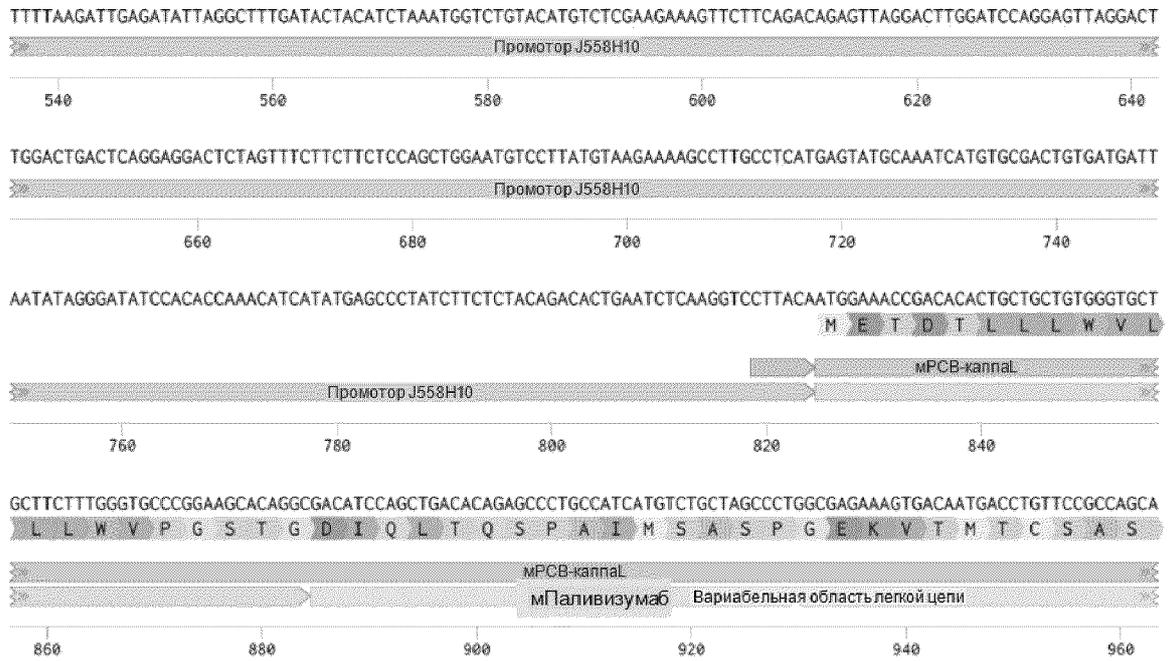
>Аминокислотная последовательность легкой цепи чPCB без сигнального пептида в анти-PCB emAb AAB человека
DIQMTQSPSTLSASVGDRTITCKQLSVGYMHWYQQKPKAPKLLIYDTSKLAGVPSRFGSGSGTEFTLTISSLPDDFATYYCF
QSGYPFTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLS
STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 285)

43/110

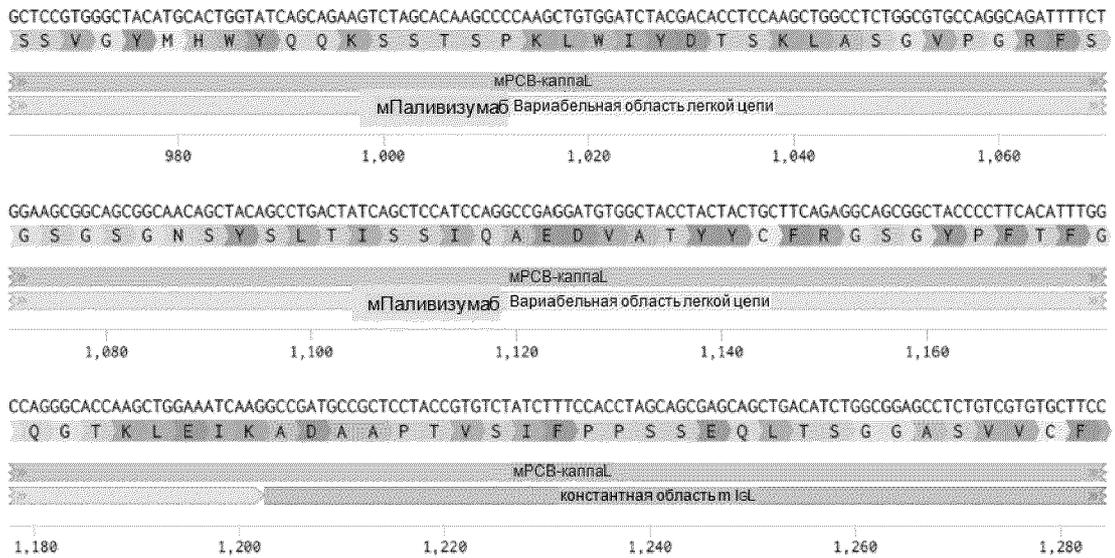
ФИГ. 25С
анти-PCB-емAb AAB мыши (3134 п.о)



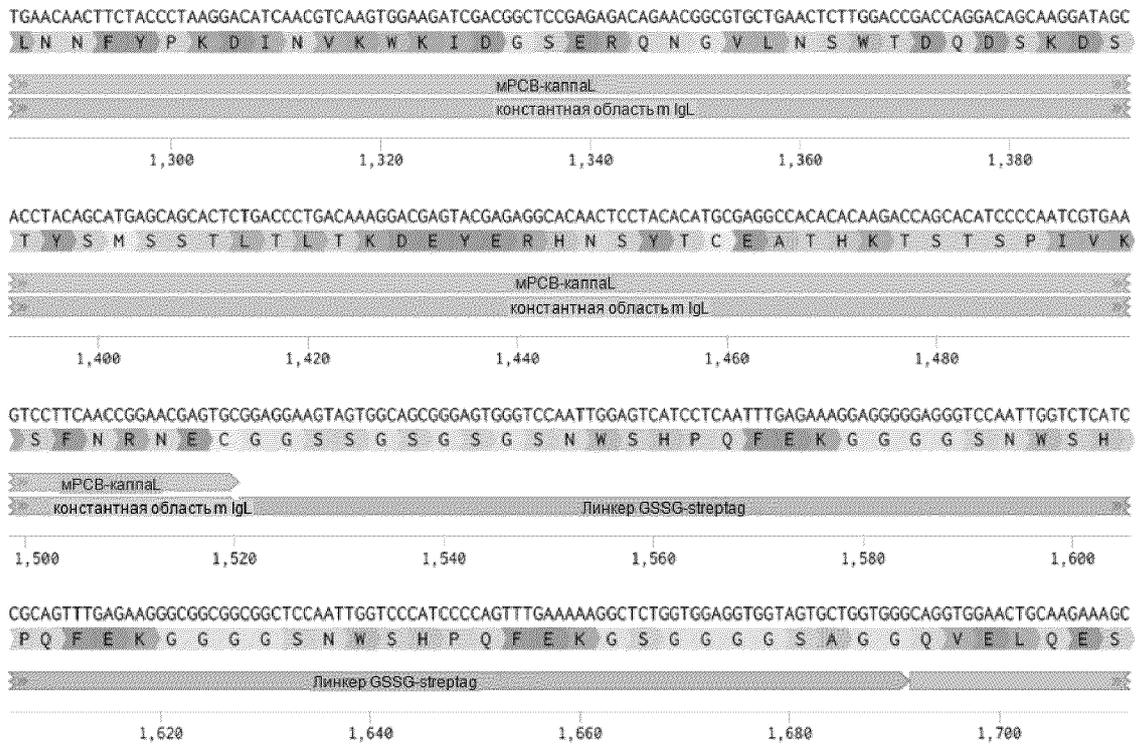
ФИГ. 25С (продолжение)



ФИГ. 25С (продолжение)

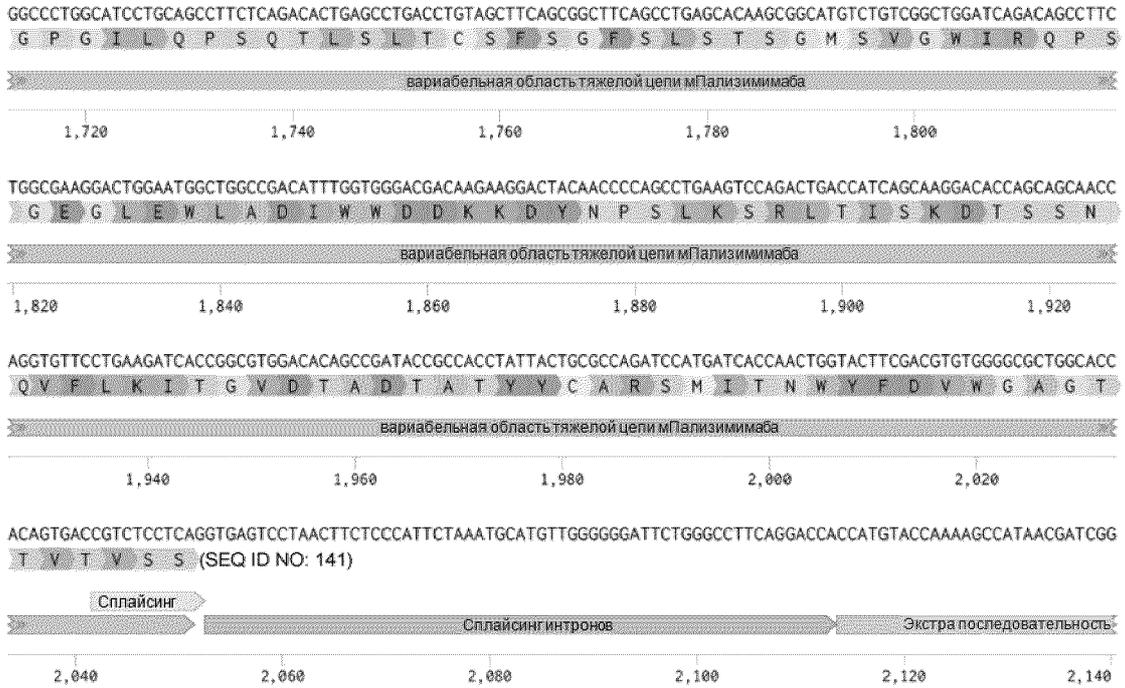


ФИГ. 25С (продолжение)

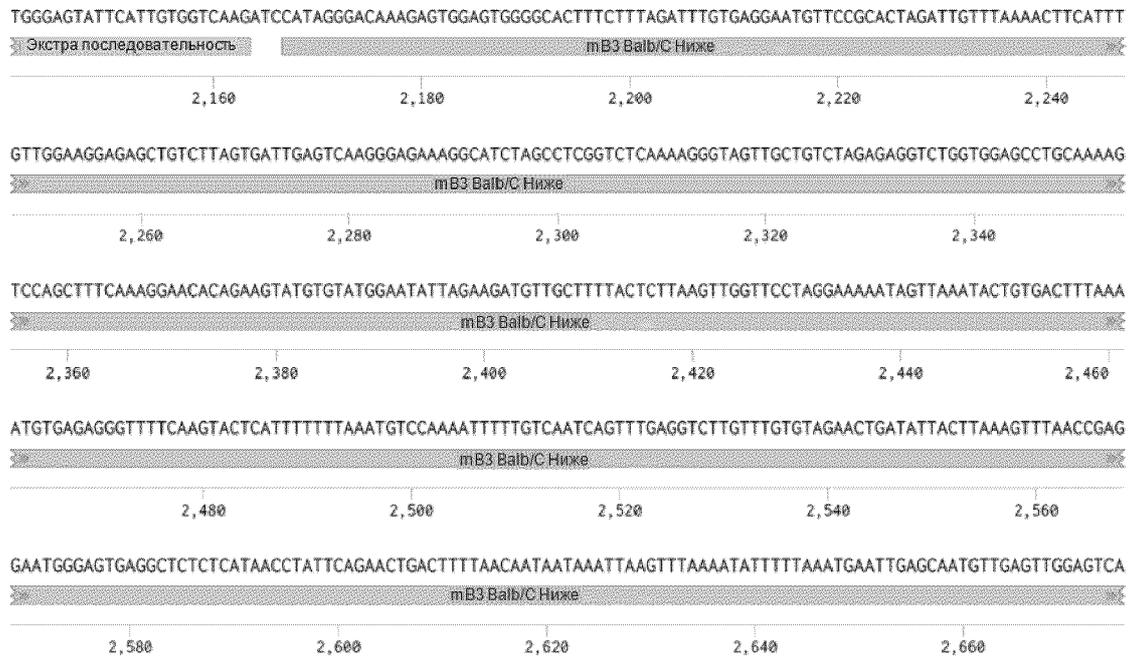


47/110

ФИГ. 25С (продолжение)

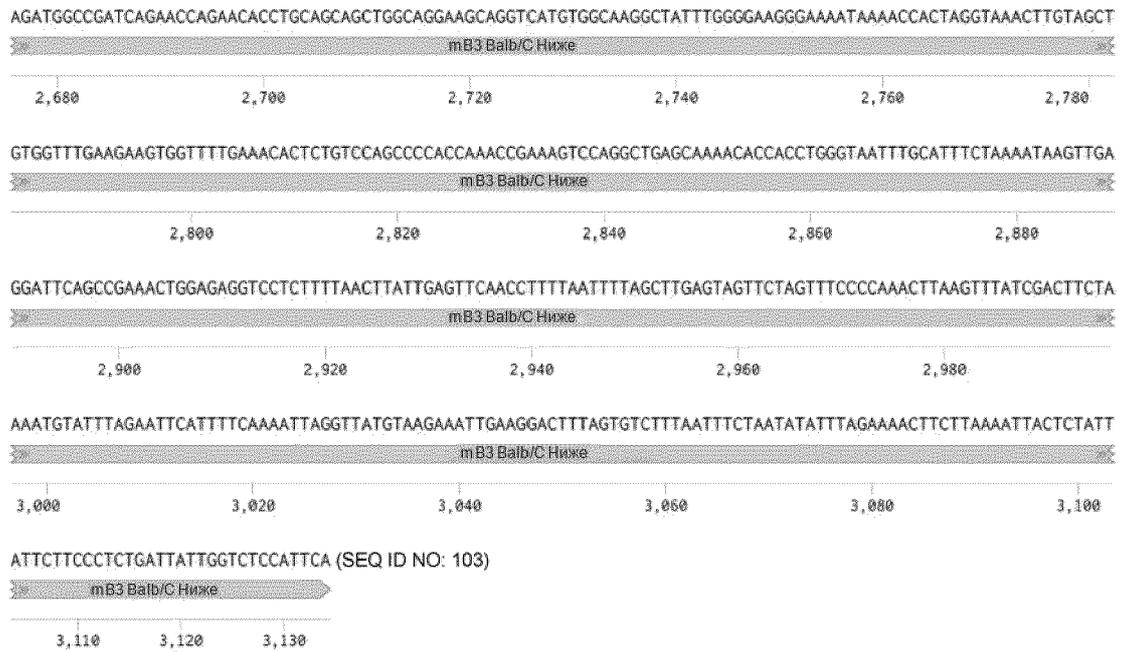


ФИГ. 25С (продолжение)



49/110

ФИГ. 25С (продолжение)



50/110

ФИГ. 25С (продолжение)

>Область, расположенная выше mB3 Balb/C мыши в анти-PCB emAb AAB мыши

```
CCAGGGGTGATTCTAGTCAGACTCTGGGGTTTTTGTCCGGTATAGAGGAAAAATCCACTATTGTGATTACTATGCTATGGACTAC
TGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCAGGTAAGAATGGCCTCTCCAGGTCTTTATTTTAACTTTGTTATGGAGTTTTC
TGAGCATTGCAGACTAATCTTGGATATTTGTCCCTGAGGGAGCCGGCTGAGAGAAAGTTGGGAAATAAACTGTCTAGGGATCTCA
GAGCCTTTAGGACAGATTATCTCCACATCTTTGAAAACTAAGAATCTGTGTGATGGTGTGGTGGAGTCCCTGGATGATGGGAT
AGGGACTTTGGAGGCTCATTTGAGGGAGATGCTAAAAAATCCTATGGCTGGAGGGATAGTTGGGGCTGTAGTTGGAGATTTTC
AGTTTTTAGAATAAAAGTATTAGTTGTGGAATATACTTCAGGACCACCTCTGTGACAGCATTATACAGTATCCGATG (SEQ ID
NO: 127)
```

>Промотор J558H10 в анти-PCB emAb AAB мыши

```
GACAAGTGAGTGTCTCAGGTTAGGATTCTATTTTAAAGATTGAGATATTAGGCTTTGATACTACATCTAAATGGTCTGTACATGTCT
CGAAGAAAGTCTTTCAGACAGAGTTAGGACTTGGATCCAGGAGTTAGGACTTGGACTGACTCAGGAGGACTCTAGTTTCTTCTTC
TCCAGCTGGAATGCCTTATGTAAGAAAAGCCTTGCCCTCATGAGTATGCAAATCATGTGCGACTGTGATGATTAATATAGGGATAT
CCACACCAAAACATCATATGAGCCCTATCTTCTCAGACACTGAATCTCAAGGTCCTTACA (SEQ ID NO: 128)
```

>Последовательность, кодирующая сигнальный пептид в анти-PCB emAb AAB мыши

```
ATGGAAACCGACACACTGCTGCTGTTGGGTGCTGCTTCTTTGGGTGCCCGGAAGCACAGGC (SEQ ID NO: 129)
```

>Последовательность, кодирующая легкую цепь kappa мPCB в анти-PCB emAb AAB мыши

```
ATGGAAACCGACACACTGCTGCTGTTGGGTGCTGCTTCTTTGGGTGCCCGGAAGCACAGGC
GACATCCAGCTGACACAGAGCCCTGCCATCATGTCTGCTAGCCCTGGCGAGAAAGTGACAATGACCTGTTCCGCCAGCAGCTC
CGTGGGCTACATGCACTGGTATCAGCAGAAGCTAGCACAAAGCCCAAGCTGTGGATCTACGACACCTCCAAGCTGGCCTCTG
GCGTGCCAGGCAGATTTCTGGAAGCGGCAGCGGCAACAGCTACAGCCTGACTATCAGCTCCATCCAGGCCGAGGATGTGGCT
ACCTACTGCTTTCAGAGGCAGCGGCTACCCCTTACATTTGGCCAGGGCACCAAGCTGGAAATCAAGGCCGATGCCGCTCC
TACCGTGTCTATCTTCCACCTAGCAGCGAGCAGCTGACATCTGGCGGAGCCTCTGTCGTGTGCTTCTGAACAACTTCTACCCCT
AAGGACATCAACGTCAAGTGAAGATCGACGGCTCCGAGAGACAGAAACGGCGTGTGAACTCTTGGACCGACCAGGACAGCAA
GGATAGCACCTACAGCATGAGCAGCACTTGACCCTGACAAAGGACGAGTACGAGAGGCCACAACCTACACATGCGAGGCCA
CACACAAGACCAGCACATCCCAATCGTGAAGTCTTCAACCGGAACGAGTGC (SEQ ID NO: 130)
```

ФИГ. 25С (продолжение)

>Последовательность, кодирующая переменную область легкой цепи мПаливизумаба в анти-PCB emAb AAB мыши
GACATCCAGCTGACACAGAGCCCTGCCATCATGTCTGCTAGCCCTGGCGAGAAAAGTGACAATGACCTGTTCCGCCAGCAGCTC
CGTGGGCTACATGCACTGGTATCAGCAGAAGTCTAGCACAAAGCCCAAGCTGTGGATCTACGACACCTCCAAGCTGGCCTCTG
GCGTGCCAGGCAGATTTTCTGGAAGCGGCAGCGGCAACAGCTACAGCCTGACTATCAGCTCCATCCAGGCCGAGGATGTGGCT
ACCTACTACTGCTTCAGAGGCAGCGGCTACCCCTTCACATTTGGCCAGGCCACCAAGCTGGAATCAAG (SEQ ID NO: 131)

>Последовательность, кодирующая константную область легкой цепи kappa mIgL в анти-PCB emAb AAB мыши
GCCGATGCCGCTCCTACCGTGTSTATCTTTCCACCTAGCAGCGAGCAGCTGACATCTGGCGGAGCCTCTGTCGTGTGCTTCTCTG
AACAATTCTACCTAAGGACATCAACGTCAAGTGAAGATCGACGGCTCCGAGAGACAGAACGGCGTGCTGAACTCTTGGACC
GACCAGGACAGCAAGGATAGCACCTACAGCATGAGCAGCACTGTACCCTGACAAAGGACGAGTACGAGAGGCCACAACCTCTA
CACATGCGAGGCCACACACAAGACCAGCACATCCCCAATCGTGAAGTCTTCAACCGGAACGAGTGC (SEQ ID NO: 132)

>Последовательность, кодирующая линкер GSSG-streptag в анти-PCB emAb AAB мыши представляет собой SEQ ID NO: 116

>Последовательность, кодирующая переменную области тяжелой цепи мПаливизумаба в анти-PCB emAb AAB мыши
CAGGTGGAAGTCAAGAAAGCGGCCCTGGCATCCTGCAGCCTTCTCAGACACTGAGCCTGACCTGTAGCTTCAGCGGCTTCAG
CCTGAGCACAAAGCGGCATGTCTGTGGCTGGATCAGACAGCCTTCTGGCGAAGGACTGGAATGGCTGGCCGACATTTGGTGGG
ACGACAAGAGGACTACAACCCAGCCTGAAGTCCAGACTGACCATCAGCAAGGACACCAGCAGCAACCAGGTGTTCTGAAAG
ATCACCGGCGTGGACACAGCCGATACCGCCACCTATTAAGTGGCCAGATCCATGATCACCAACTGGTACTTCGACGTGTGGGG
CGCTGGCACACAGTGACCGTCTCTCA (SEQ ID NO: 133)

>Аминокислотная последовательность сигнального пептида в анти-PCB emAb AAB мыши
METDTLLLWLLLWVPGSTG (SEQ ID NO: 134)

>Аминокислотная последовательность легкой цепи kappa mPCB в анти-PCB emAb AAB мыши
METDTLLLWLLLWVPGSTGDIQLTQSPAIMASAPGEKVTMTCSASSVGYMHWYQQKSSTSPKLWYDTSKLAGVPGRFSGSGSG
NSYSLTISSIQAEVDVATYYCFRSGYPFTFGQGTKLEIKADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNMFYPKDINVKWKIDGSRQNGV
LNSWTDQDSKDYSTYSMSSTLTLTKEYERHNSYTCETHKTTSTSPIVKSFNRRNEC (SEQ ID NO: 135)

52/110

ФИГ. 25С (продолжение)

>Аминокислотная последовательность варибельной области легкой цепи мПаливизумаба в анти-PCB emAb AAB мыши
DIQLTQSPAIMASPGKVTMTCSASSSVGYMHWYQKSSSTSPKLWYDTSKLASGVPGRFSGSGNSYSLTISSIAEDVATYYCF
RGSGYPFTFGQGTLEIK (SEQ ID NO: 136)

>Аминокислотная последовательность константной области легкой цепи kappa mIgL в анти-PCB emAb AAB мыши
ADAAPTYSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSEKQVGLNSWTDQDQSKDSTYSMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEA
THKTSTSPIVKSFNRNEC (SEQ ID NO: 137)

>Аминокислотная последовательность линкера GSSG-streptag в анти-PCB emAb AAB мыши представляет собой SEQ ID NO: 122

>Аминокислотная последовательность варибельной области тяжелой цепи мПаливизумаба в анти-PCB emAb AAB мыши
QVELQESGPGILQPSQTLTLTCSFSGFLSTSGMSVGVWRQPSGEGLEWLADIWDDKKDYNFLKSRRLTISKDTSSNQVFLKITGVD
TADTATYYCARSMITNWFYFDVWGAGTTVTVSS (SEQ ID NO: 138)

>Граница сплайсинга с фланкирующей последовательностью в анти-PCB emAb AAB мыши
CAGGTGAGTCCCTAACTTCTCCCATTTCTAAATGCATGTTGGGGGATTTCTGGCCCTTCAGGACCA (SEQ ID NO: 139)

>Область, расположенная ниже mB3 Balb/C мыши в анти-PCB emAb AAB мыши
CATAGGGACAAGAGTGGAGTGGGGCACTTTCTTTAGATTTGTGAGGAATGTTCCGCACTAGATTGTTAAAACCTTCATTTGTTG
GAAGGAGAGCTGTCTTAGTGATTGAGTCAAGGGAGAAAGGCATCTAGCCTCGGTCTCAAAAGGGTAGTTGCTGTCTAGAGAGGT
CTGGTGGAGCCTGCAAAAAGTCCAGCTTTCAAAGGAACACAGAAGTATGTGTATGGAATATTAGAAAGATGTTGCTTTTACTCTTAA
GTTGGTCCCTAGGAAAAATAGTTAAACTGTGACTTTAAAATGTGAGAGGGTTTCAAGTACTCATTTTTTAAATGTCCAAAATT
TTTGTCAATCAGTTTGAGGTCTTTGTTGTGTAGAAGTATTAAGTTTAAAGTTTAAACCGAGGAATGGGAGTGGAGCTCTCTCATAA
CCTATTCAGAACTGACTTTTAAACAATAATAAATTAAGTTTAAATATTTTTAAATGAATTGAGCAATGTTGAGTTGGAGTCAAGATG
GCCGATCAGAACCAGAACACCTGCAGCAGCTGGCAGGAAGCAGGTCATGTGGCAAGGCTATTTGGGGAAGGAAAAATAAACCC
ACTAGGTAACCTGTAGCTGTGGTTTGAAGAAGTGGTTTGAACACTCTGTCCAGCCCAACCAACCGAAAGTCCAGGCTGAG
CAAAACACCACCTGGGTAATTTGCATTTCTAAATAAGTTGAGGATTCAGCCGAACTGGAGAGGTCTCTTTTAACTTATTGAGT
TCAACCTTTTAAATTTAGCTTGTAGTGTCTAGTTTCCCAAACTTAAAGTTTATCGACTTCTAAAATGATTTAGAAATTCATTTTCAA
AATTAGGTTATGTAAGAAATTGAAGGACTTTAGTGTCTTAAATTTCTAATATATTAGAAAACCTCTTAAAATTAAGTCTATTATTTCTT
CCTCTGATTATTGGTCTCCATTC (SEQ ID NO: 140)

53/110

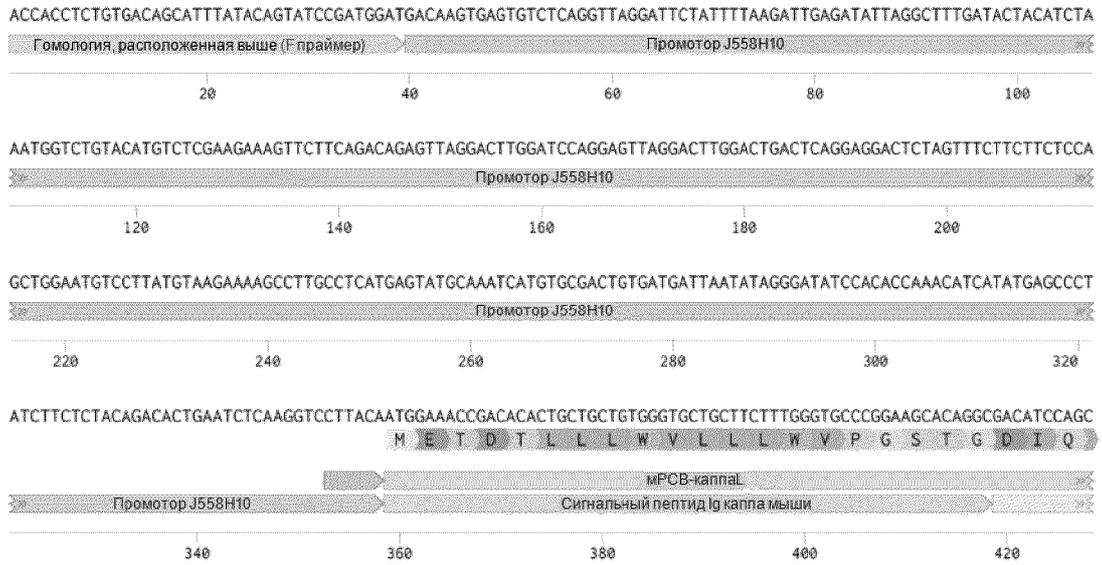
ФИГ. 25С (продолжение)

>Последовательность, кодирующая легкую цепь kappa mPCB без сигнальной последовательности в анти-PCB emAb AAB мыши
GACATCCAGCTGACACAGAGCCCTGCCATCATGTCTGCTAGCCCTGGCGAGAAAAGTGACAAATGACCTGTTCCGCCAGCAGCTC
CGTGGGCTACATGCACTGGTATCAGCAGAAGTCTAGCACAAGCCCAAGCTGTGGATCTACGACACCTCCAAGCTGGCCTCTG
GCGTGCCAGGCAGATTTTCTGGAAGCGGCAGCGGCAACAGCTACAGCCTGACTATCAGCTCCATCCAGGCCGAGGATGTGGCT
ACCTACTACTGCTTCAGAGGCAGCGGCTACCCCTTCACATTTGGCCAGGGCACCAGCTGGAAATCAAGGCCGATGCCGCTCC
TACCGTGTCTATCTTTCCACCTAGCAGCGAGCAGCTGACATCTGGCCGAGCCTCTGTCGTGTGCTTCTGAACAACCTTACCCT
AAGGACATCAACGTCAAGTGAAGATCGACGGCTCCGAGAGACAGAACGGCGTGCTGAACTCTTGACCAGCCAGGACAGCAA
GGATAGCACCTACAGCATGAGCAGCACTCTGACCCCTGACAAAGGACGAGTACGAGAGGCACAACCTCTACACATGCGAGGCCA
CACACAAGACCAGCACATCCCCAATCGTGAAGTCCTTCAACCGGAACGAGTGC (SEQ ID NO: 281)

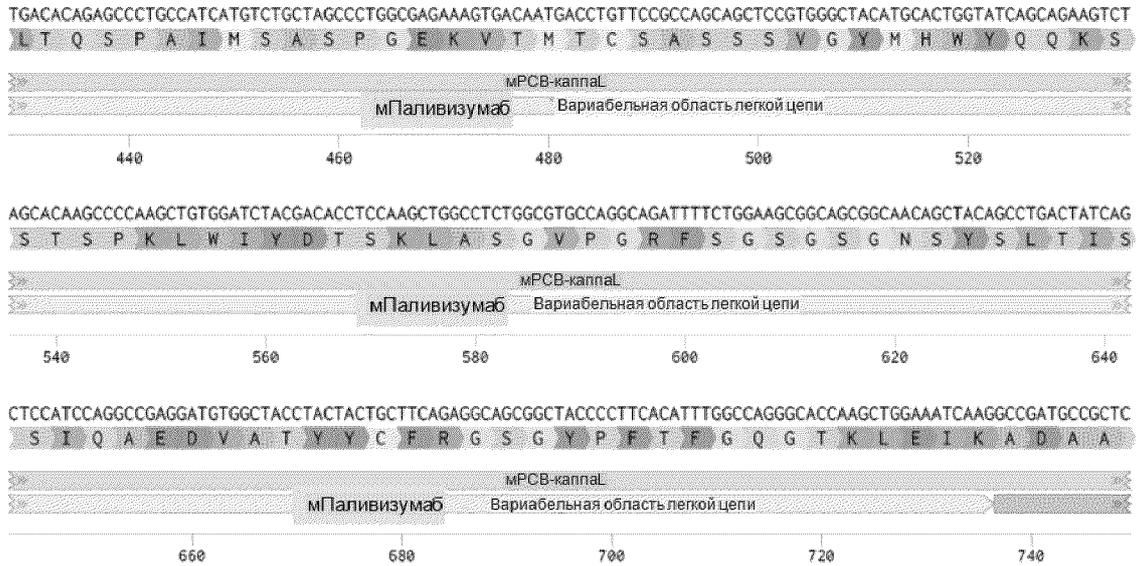
>Аминокислотная последовательность легкой цепи kappa mPCB без сигнального пептида в анти-PCB emAb AAB мыши
DIQLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVGYMHWYQKSTSPKLWYDTSKLAGVPGRFSGSGSGNSYSLTISIIQAEDVATYYCF
RSGYPFTFGQGTKLEIKADAAPTVISIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNFPKIDINVKWKIDGSERQGNVLSWTDQDSKDYSTYSMSST
LTLTKDEYERHNSYTCETHKSTSPIVKSFNRNEC (SEQ ID NO: 286)

54/110

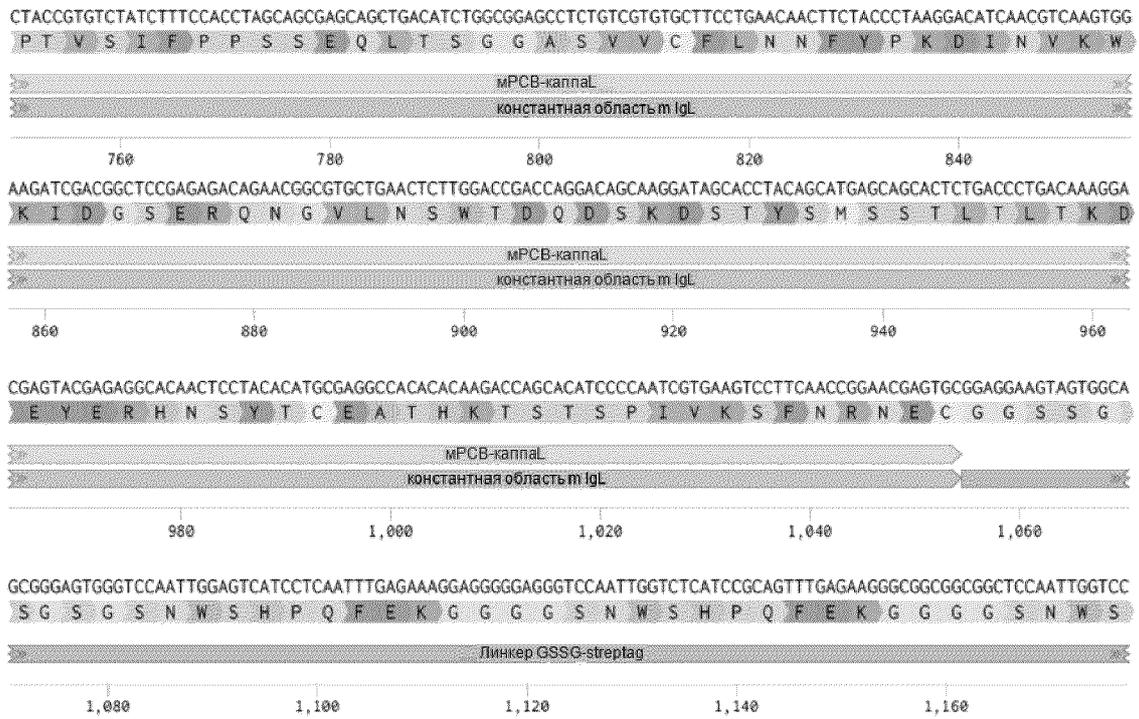
ФИГ. 25D
ms-emAb-RSV-дцДНК (1736 н.о.)



ФИГ. 25D (продолжение)

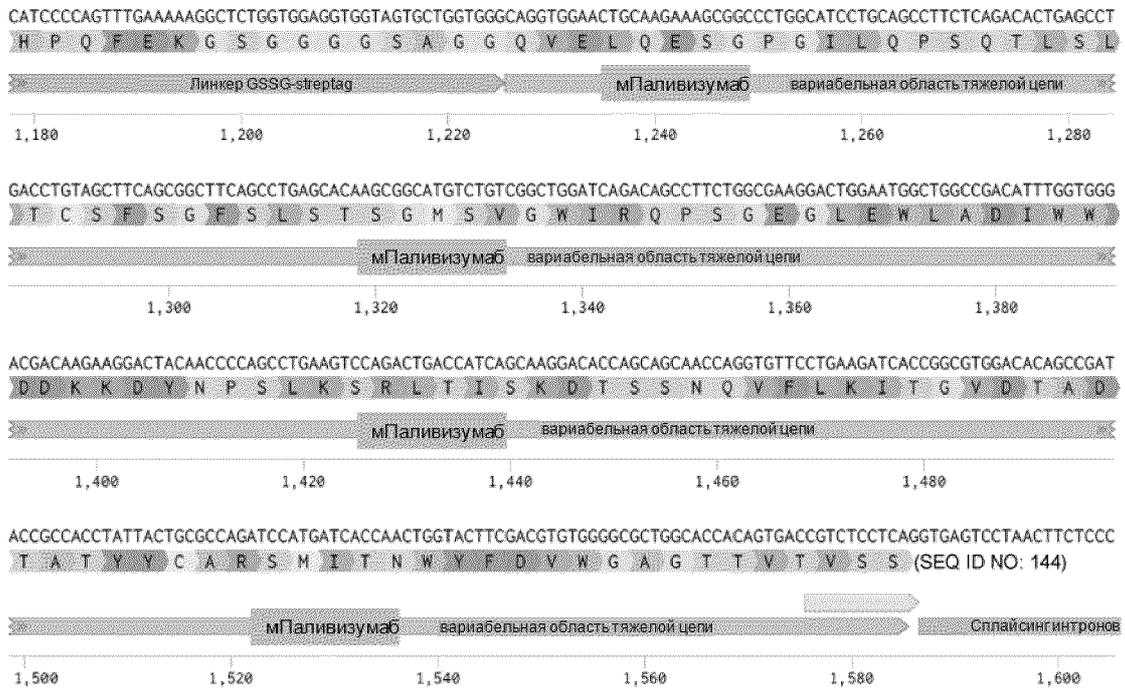


ФИГ. 25D (продолжение)



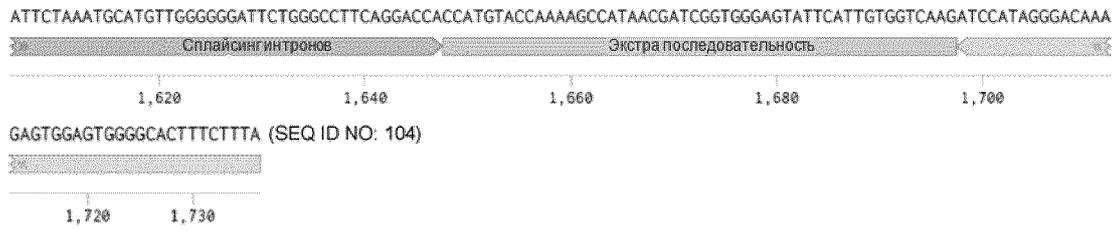
57/110

ФИГ. 25D (продолжение)



58/110

ФИГ. 25D (продолжение)



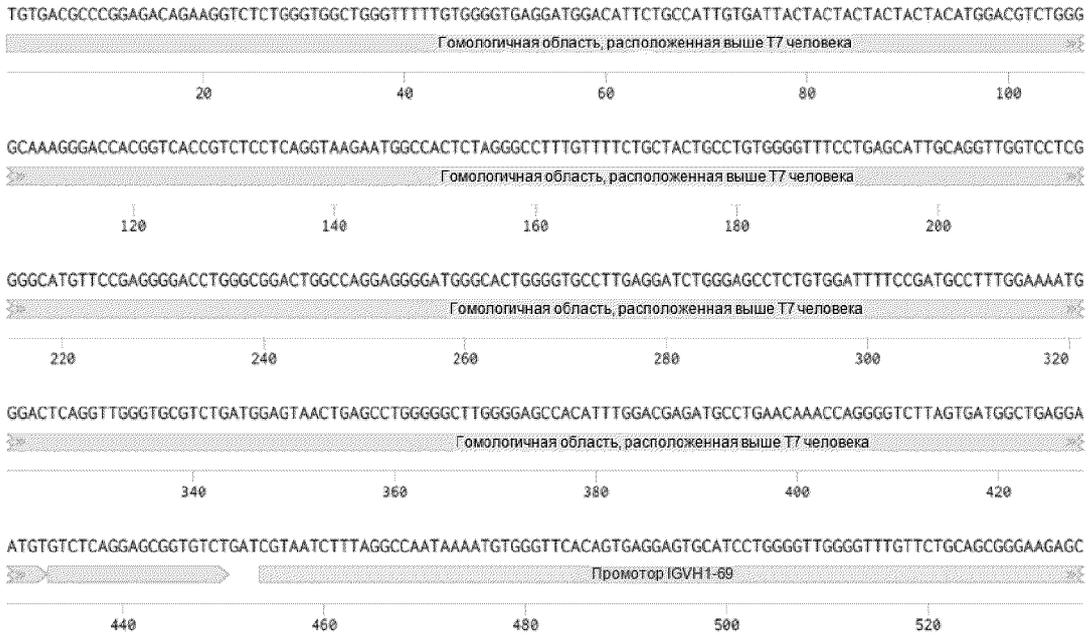
59/110

ФИГ. 25D (продолжение)

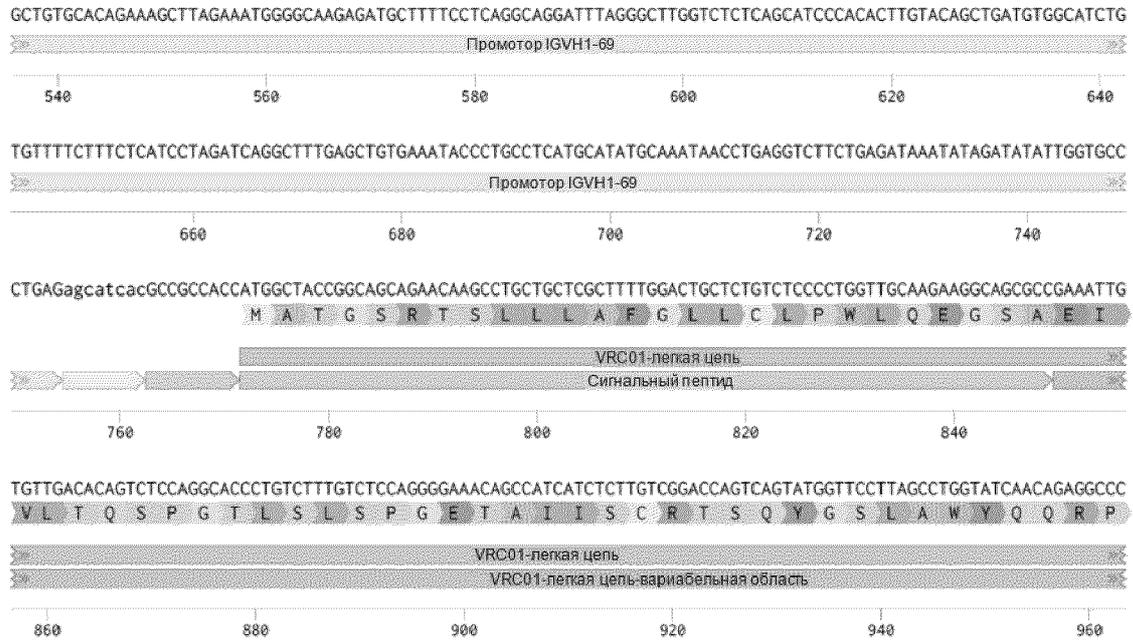
- >Последовательность гомологичной области, расположенной выше (F праймер) в ms-emAb-RSV-дцДНК
ACCACCTCTGTGACAGCATTTATACAGTATCCGATGGAT (SEQ ID NO: 142)
- >Промотор J558H10 в ms-emAb-PCB-дцДНК в SEQ ID NO: 128
- >Последовательность, кодирующая сигнальный пептид в ms-emAb-RSV-дцДНК представляет собой SEQ ID NO: 129
- >Последовательность, кодирующая легкую цепь мПаливизумаба в ms-emAb-RSV-дцДНК представляет собой SEQ ID NO: 130
- >Последовательность, кодирующая переменную область легкой цепи мПаливизумаба в ms-emAb-RSV-дцДНК представляет собой SEQ ID NO: 131
- >Последовательность, кодирующая константную область легкой цепи каппа мПаливизумаба в ms-emAb-RSV-дцДНК представляет собой SEQ ID NO: 132
- >Последовательность, кодирующая линкер GSSG-streptag в ms-emAb-RSV-дцДНК представляет собой SEQ ID NO: 116
- >Последовательность, кодирующая переменную область тяжелой цепи мПаливизумаба в ms-emAb-RSV-дцДНК представляет собой SEQ ID NO: 133
- >Аминокислотная последовательность сигнального пептида в ms-emAb-RSV-дцДНК представляет собой SEQ ID NO: 134
- >Аминокислотная последовательность легкой цепи мПаливизумаба в ms-emAb-RSV-дцДНК представляет собой SEQ ID NO: 135
- >Аминокислотная последовательность переменной области легкой цепи мПаливизумаба в ms-emAb-RSV-дцДНК представляет собой SEQ ID NO: 136
- >Аминокислотная последовательность константной области легкой цепи каппа мПаливизумаба представляет собой ms-emAb-RSV-дцДНК представляет собой SEQ ID NO: 137
- >Аминокислотная последовательность линкера GSSG-streptag в ms-emAb-RSV-дцДНК представляет собой SEQ ID NO: 122
- >Аминокислотная последовательность переменной области тяжелой цепи мПаливизумаба представляет собой ms-emAb-RSV-дцДНК представляет собой SEQ ID NO: 138
- >Граница сплайсинга с фланкирующей последовательностью в ms-emAb-RSV-дцДНК представляет собой SEQ ID NO: 139
- >Последовательность гомологичной области, расположенной ниже в ms-emAb-RSV-дцДНК
ATCCATAGGGACAAAGAGTGGAGTGGGGCACTTTCTTTA (SEQ ID NO: 143)
- >Последовательность, кодирующая легкую цепь мПаливизумаба без сигнальной последовательности в ms-emAb-RSV-дцДНК представляет собой SEQ ID NO: 281
- >Аминокислотная последовательность легкой цепи мПаливизумаба без сигнального пептида в ms-emAb-RSV-дцДНК представляет собой SEQ ID NO: 286

60/110

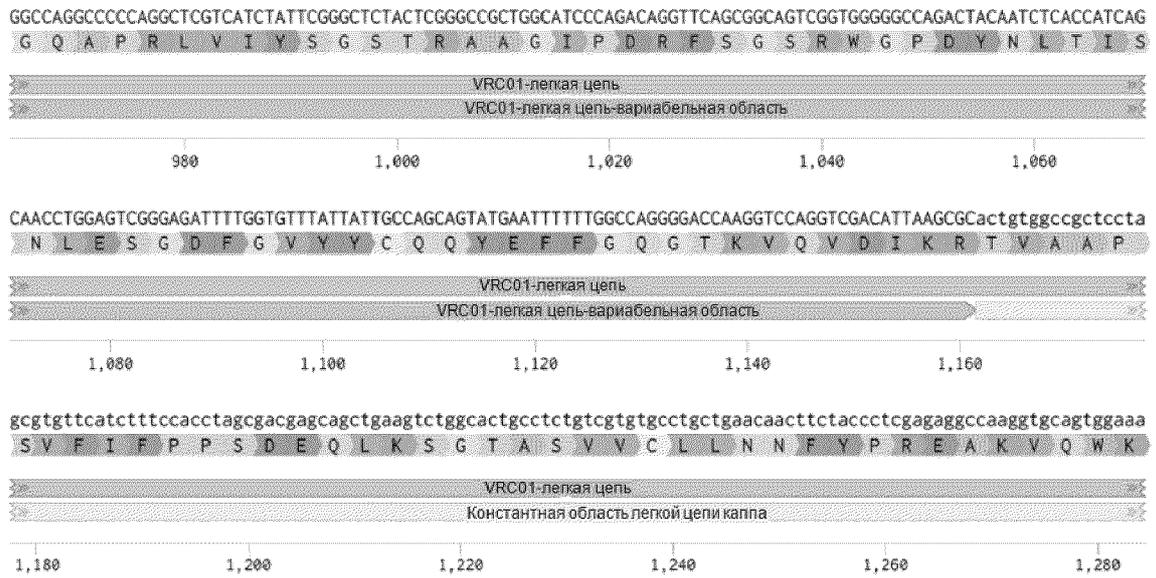
ФИГ. 25Е
hu-emAb-VRC01-AAV (2551 п.о.)



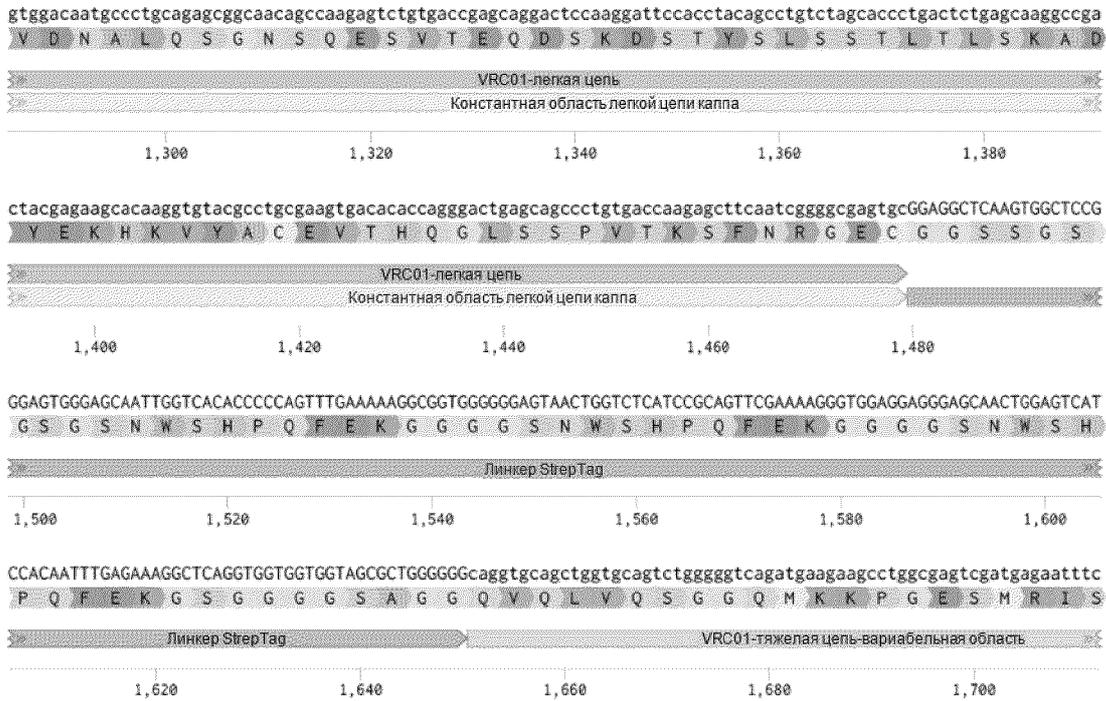
ФИГ. 25Е (продолжение)



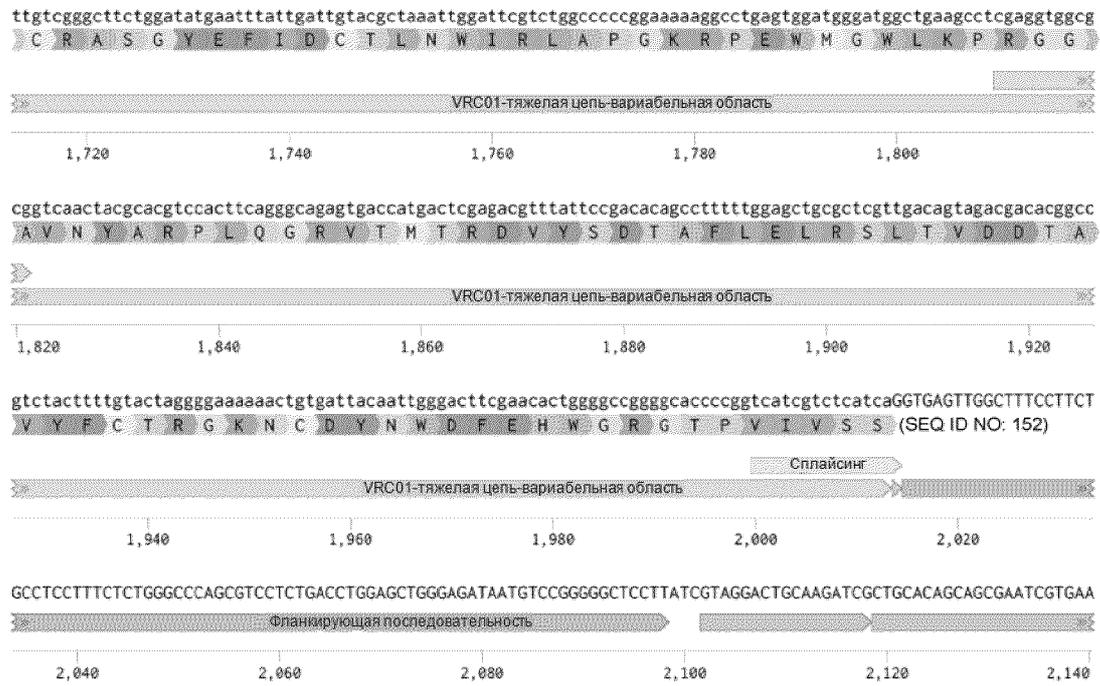
ФИГ. 25Е (продолжение)



ФИГ. 25Е (продолжение)

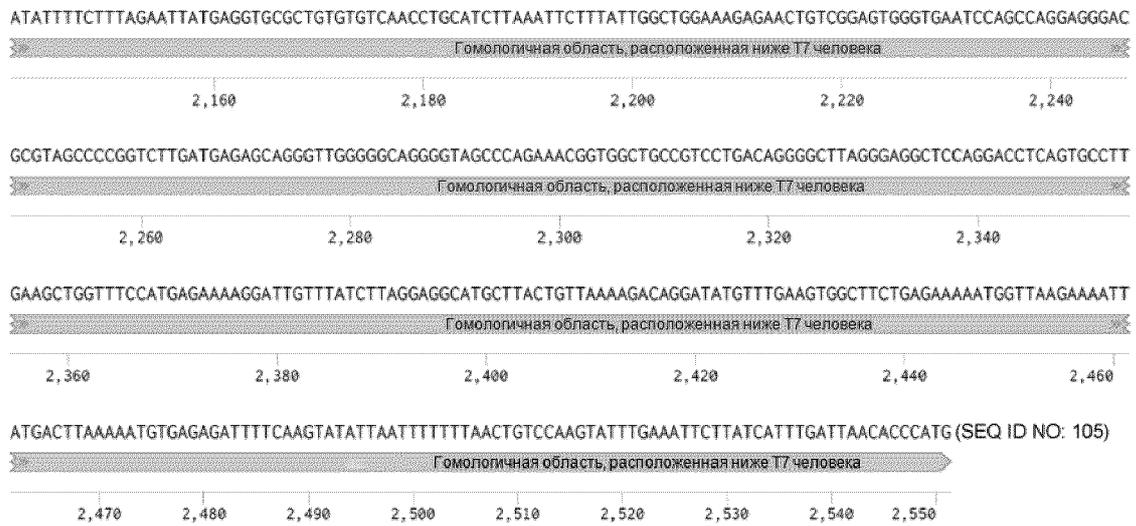


ФИГ. 25Е (продолжение)



65/110

ФИГ. 25Е (продолжение)



66/110

ФИГ. 25Е (продолжение)

>Гомологичная область, расположенная выше Т7 человека в Hu-emAb-VRC01-AAV представляет собой SEQ ID NO: 110

>Промотор IgVH1-69 в Hu-emAb-VRC01-AAV представляет собой SEQ ID NO: 111

>Последовательность, кодирующая сигнальный пептид в Hu-emAb-VRC01-AAV представляет собой SEQ ID NO: 112

>Последовательность, кодирующая легкую цепь VRC01 в Hu-emAb-VRC01-AAV

```
ATGGCTACCGGCAGCAGAACAAGCCTGCTGCTCGCTTTTGGACTGCTCTGTCTCCCCTGGTTGCAAGAAGGCAGCGCCGAAATT
GTGTTGACACAGTCTCCAGGCACCCGTCTTTGTCTCCAGGGGAAACAGCCATCATCTCTTGTGGACCAGTCAGTATGGTTCC
TTAGCCTGGTATCAACAGAGGCCCGGCCAGGCCCCAGGCTCGTCACTATTCGGGCTCTACTCGGGCCGCTGGCATCCCAGA
CAGGTTTCAGCGGCAGTCGGTGGGGGCCAGACTACAATCTCACCATCAGCAACCTGGAGTCGGGAGATTTTGGTGTATTATTG
CCAGCAGTATGAATTTTTGGCCAGGGGACCAAGGTCCAGGTGACATTAAGCGCACTGTGGCCGCTCCTAGCGTGTTCATCTT
TCCACCTAGCGCAGCAGCTGAAGTCTGGCACTGCCTGTGCTGTGCCTGCTGAACAACCTTACCCCTCGAGAGGCCAAGG
TGCAGTGGAAAGTGGACAATGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAAGAGTCTGTGACCGAGCAGGACTCCAAGGATCCACCTAC
AGCCTGTCTAGCACCCCTGACTCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAAGGTGTACGCCCTGCGAAGTGACACACCAGGGACT
GAGCAGCCCTGTGACCAAGAGCTTCAATCGGGGCGAGTGC (SEQ ID NO: 145)
```

>Последовательность, кодирующая переменную область легкой цепи VRC01 в Hu-emAb-VRC01-AAV

```
GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGGCACCCGTCTTTGTCTCCAGGGGAAACAGCCATCATCTCTTGTGGACCAGTCAGTATG
GTTCTTAGCCTGGTATCAACAGAGGCCCGGCCAGGCCCCAGGCTCGTCACTATTCGGGCTCTACTCGGGCCGCTGGCATC
CCAGACAGGTTTCAGCGGCAGTCGGTGGGGGCCAGACTACAATCTCACCATCAGCAACCTGGAGTCGGGAGATTTTGGTGTTA
TTATTGCCAGCAGTATGAATTTTTGGCCAGGGGACCAAGGTCCAGGTGACATTAAGCGC (SEQ ID NO: 146)
```

>Последовательность, кодирующая константную область легкой цепи kappa в Hu-emAb-VRC01-AAV представляет собой SEQ ID NO: 115

>Последовательность, кодирующая GSSG-streptag линкера в Hu-emAb-VRC01-AAV представляет собой SEQ ID NO: 116

>Последовательность, кодирующая переменную область тяжелой цепи VRC01 в Hu-emAb-VRC01-AAV

```
CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGTGCAGATGAAGAAGCCTGGCGAGTCGATGAGAATTTCTTGTGGGCTTCTGGATATGA
ATTTATTGATTGTACGCTAAATTGGATTCTGCTGGCCCCGAAAGGCCTGAGTGGATGGGATGGCTGAAGCCTCGAGGTGG
CGCGGTCAACTACGCACGTCCTCACTTCAGGGCAGAGTGACCATGACTCGAGACGTTTATTCGACACAGCCCTTTTGGAGCTGCG
CTCGTTGACAGTAGACGACACGGCCGTCTACTTTTGTACTAGGGGAAAAAACTGTGATTACAATTGGGACTTCGAACACTGGGG
CCGGGGCACCCGGTCTATCTCATCA (SEQ ID NO: 147)
```

67/110

ФИГ. 25E (продолжение)

- >Аминокислотная последовательность сигнального пептида в Hu-emAb-VRC01-AAV представляет собой SEQ ID NO: 118
- >Аминокислотная последовательность легкой цепи VRC01 в Hu-emAb-VRC01-AAV
MATGSRTSLLLAFLGLCLPWLQEGSAEIVLTQSPGTLSPGETAIIISCRTSQYGLAWYQQRPGQAPRLVIYSGSTRAAGIPDRFSGS
RWGPDYNLTISNLESGDFGVYYCQQYEFFGQGTKVQVDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNIFYPREAKVQWKVDNAL
QSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 148)
- >Аминокислотная последовательность переменной области легкой цепи VRC01 в Hu-emAb-VRC01-AAV
EIVLTQSPGTLSPGETAIIISCRTSQYGLAWYQQRPGQAPRLVIYSGSTRAAGIPDRFSGSRWGPDYNLTISNLESGDFGVYYCQQ
YEFFGQGTKVQVDIKR (SEQ ID NO: 149)
- >Аминокислотная последовательность константной области легкой цепи каппа в Hu-emAb-VRC01-AAV представляет собой SEQ ID NO: 121
- >Аминокислотная последовательность линкера GSSG-streptag в Hu-emAb-VRC01-AAV представляет собой SEQ ID NO: 122
- >Аминокислотная последовательность переменной области тяжелой цепи VRC01 в Hu-emAb-VRC01-AAV
QVQLVQSGGQMKKPGESMRISCRASGYEFIDCTLNWIRLAPGKRPEWWMGWLKPGRGGAVNYARPLQGRVTMTROVYSDTAFLELRSL
TVDDTAVYFCTRGKNCYDYNWDFEHWGRGTPVIVSS (SEQ ID NO: 150)
- >Граница слайсинга с фланкирующей последовательностью в конструкциях настоящего изобретения
CAGGTGAGTTGGCTTTCTTCTGCCTCCTTTCTCTGGGCCAGCGTCTCTGACCTGGAGCTGGGAGATAATGTCCGGGGGCT
CCTT (SEQ ID NO: 151)
- >Гомологичная область, расположенная ниже T7 человека в Hu-emAb-VRC01-AAV представляет собой SEQ ID NO: 125

68/110

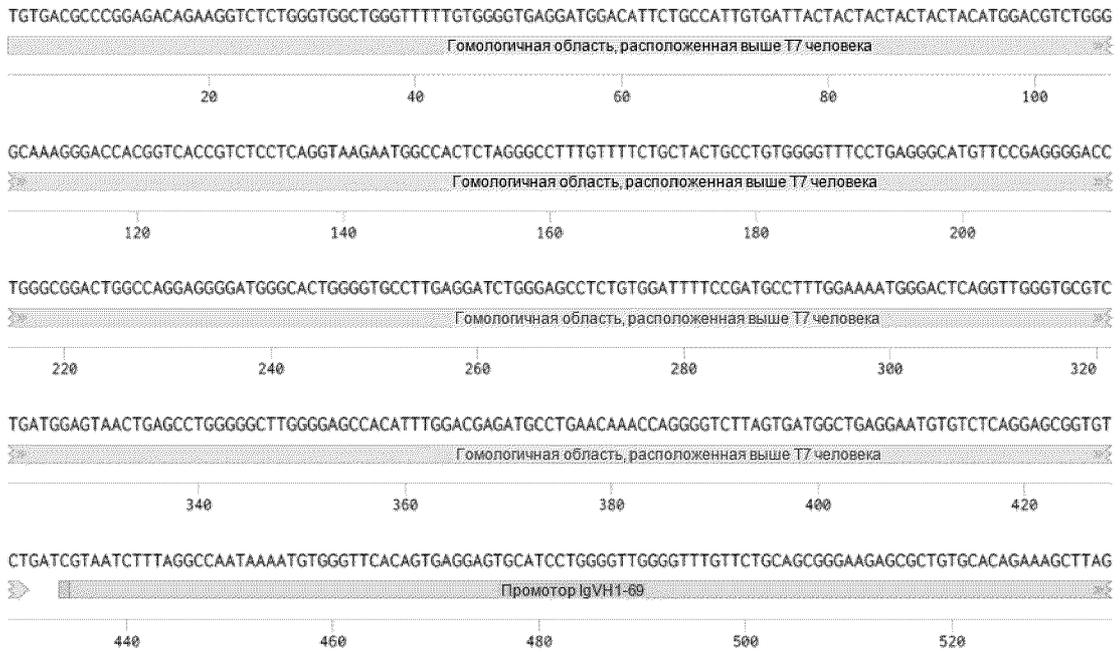
ФИГ. 25Е (продолжение)

>Последовательность, кодирующая легкую цепь VRC01 без сигнальной последовательности в Hu-emAb-VRC01-AAV
GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAACAGCCATCATCTCTTGTGCGGACCAGTCAGTATG
GTTCTTAGCCTGGTATCAACAGAGGCCCGGCCAGGCCCCAGGCTCGTCATCTATTGGGGCTCTACTCGGGCCGCTGGCATC
CCAGACAGGTTCAAGCGGCAGTCGGTGGGGGCCAGACTACAATCTCACCATCAGCAACCTGGAGTCGGGAGATTTTGGTGTTTA
TTATTGCCAGCAGTATGAATTTTTGGCCAGGGGACCAAGGTCCAGGTCGACATTAAGCGCACTGTGGCCGCTCCTAGCGTGTT
CATCTTTCCACCTAGCGACGAGCAGCTGAAGTCTGGCACTGCCTCTGTGCTGTGCCTGCTGAACAACCTTCTACCCTCGAGAGGC
CAAGGTGCAGTGAAAAGTGGACAATGCCCTGCAGAGCGGCCAACAGCCAAGAGTCTGTGACCGAGCAGGACTCCAAGGATTCCA
CCTACAGCCTGTCTAGCACCCCTGACTCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGCGAAGTGACACACCAG
GGACTGAGCAGCCCTGTGACCAAGAGCTTCAATCGGGGCGAGTGC (SEQ ID NO: 282)

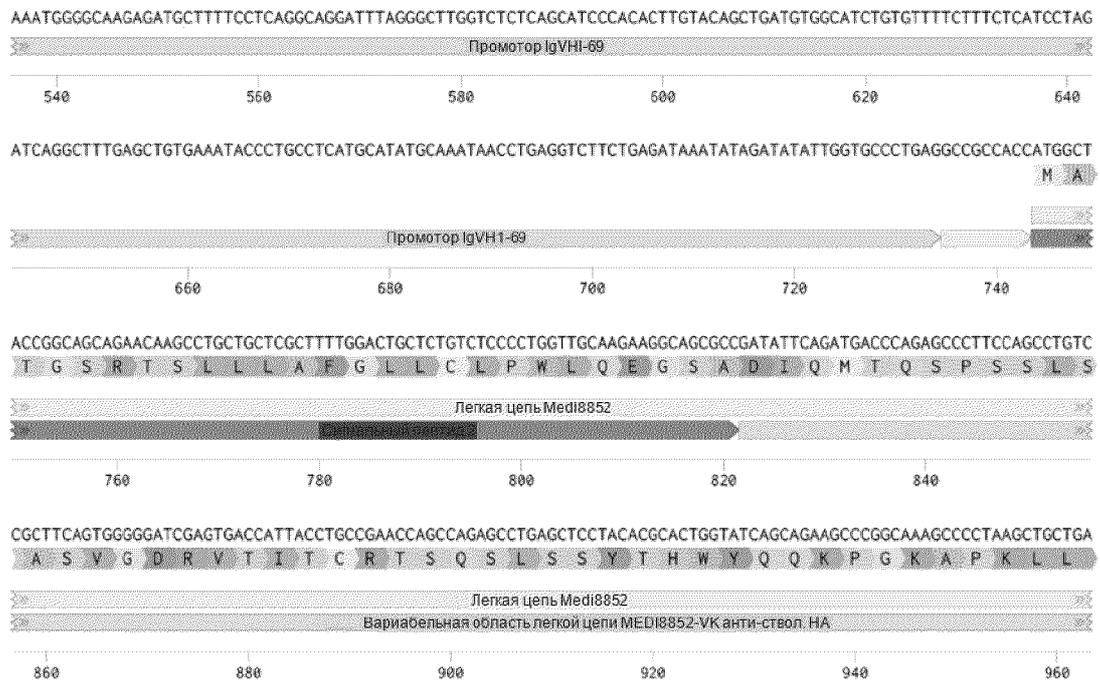
>Аминокислотная последовательность легкой цепи VRC01 без сигнального пептида в Hu-emAb-VRC01-AAV
EIVLTQSPGTLISLSPGETAIIISCRTSQYGSLAWYQQRPGQAPRLVIYSGSTRAAGIPDRFSGSRWGPDYNLTIISNLESGDFGVYYCQQ
YEFFGQGTKVQVDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLT
LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 287)

69/110

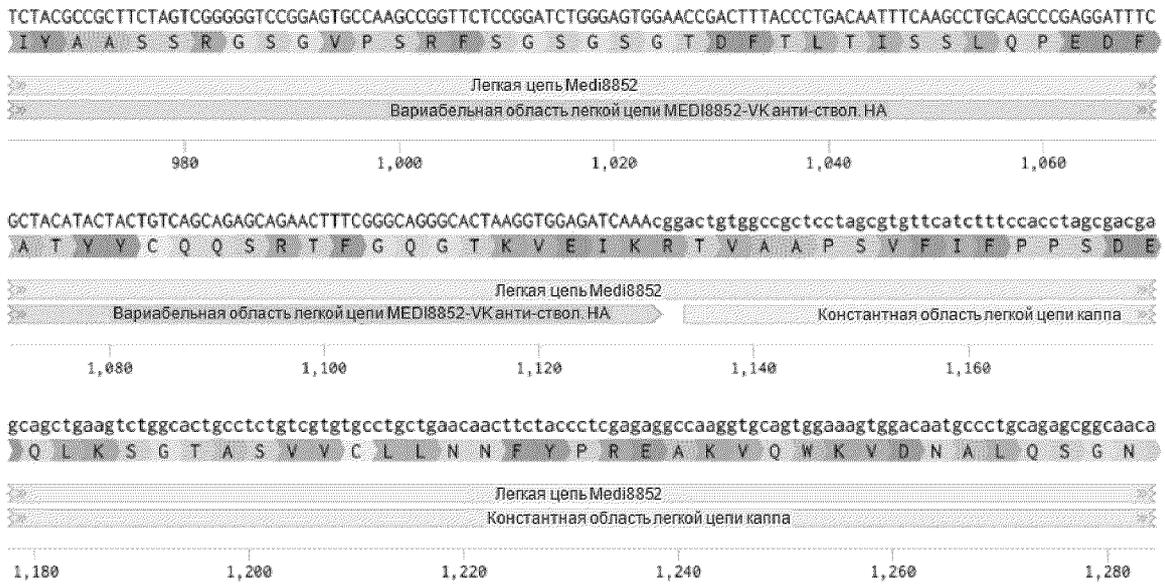
ФИГ. 25F
hu-emAb-Medi8852-AAV (2544 п.о.)



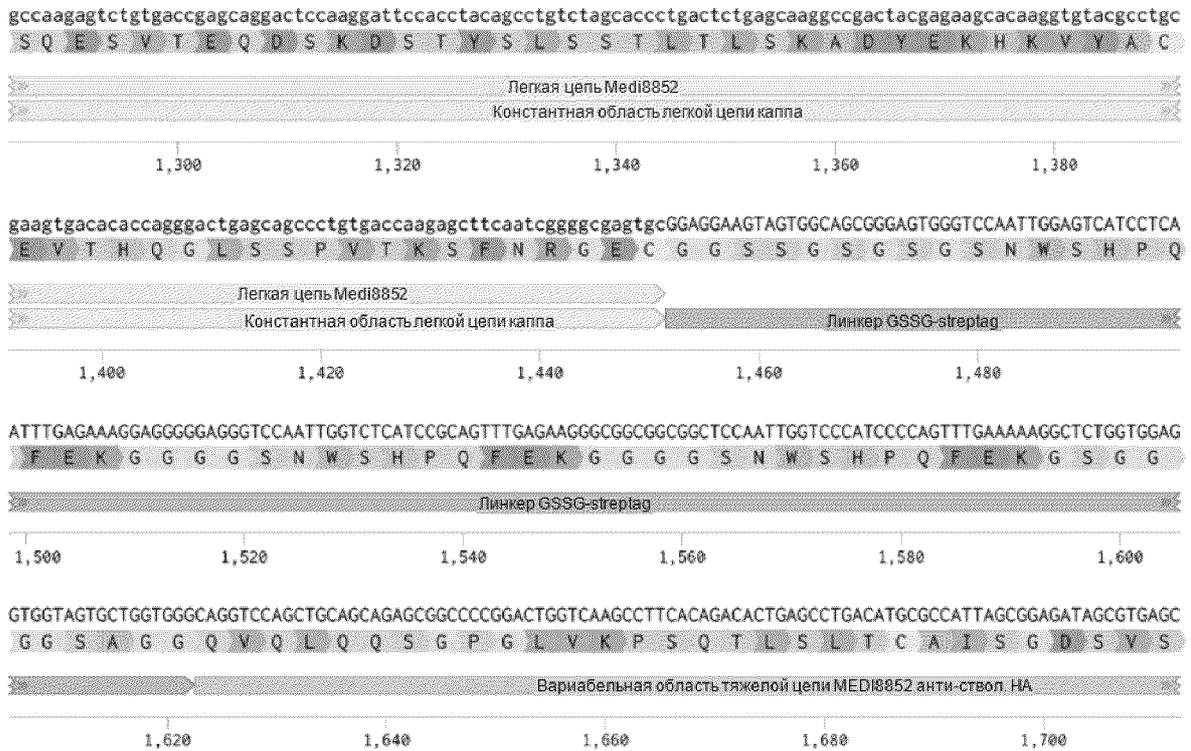
ФИГ. 25F (продолжение)



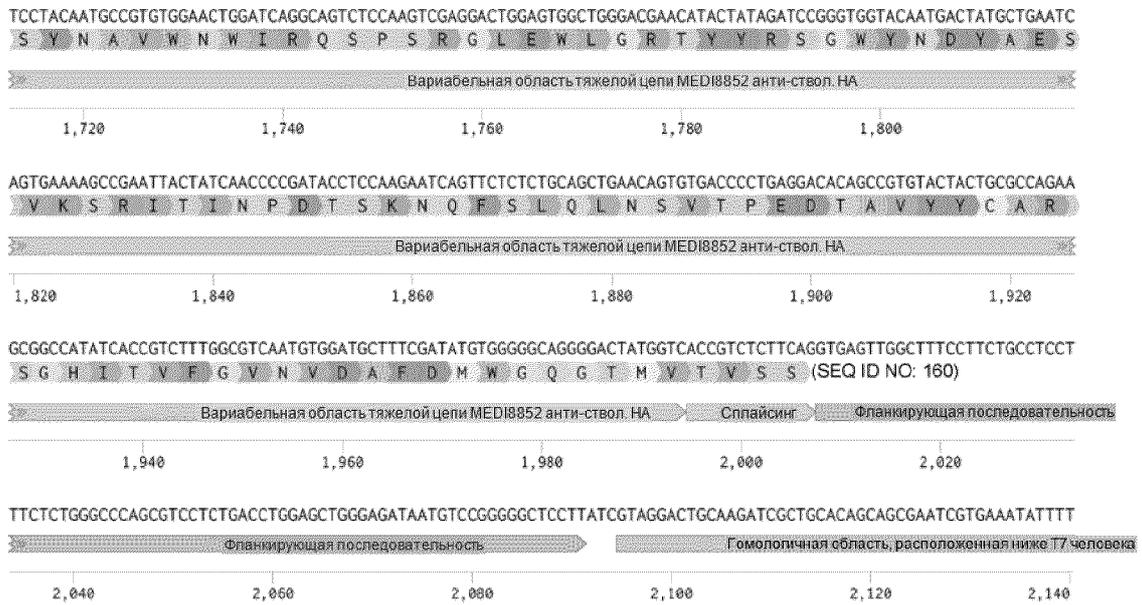
ФИГ. 25F (продолжение)



ФИГ. 25F (продолжение)

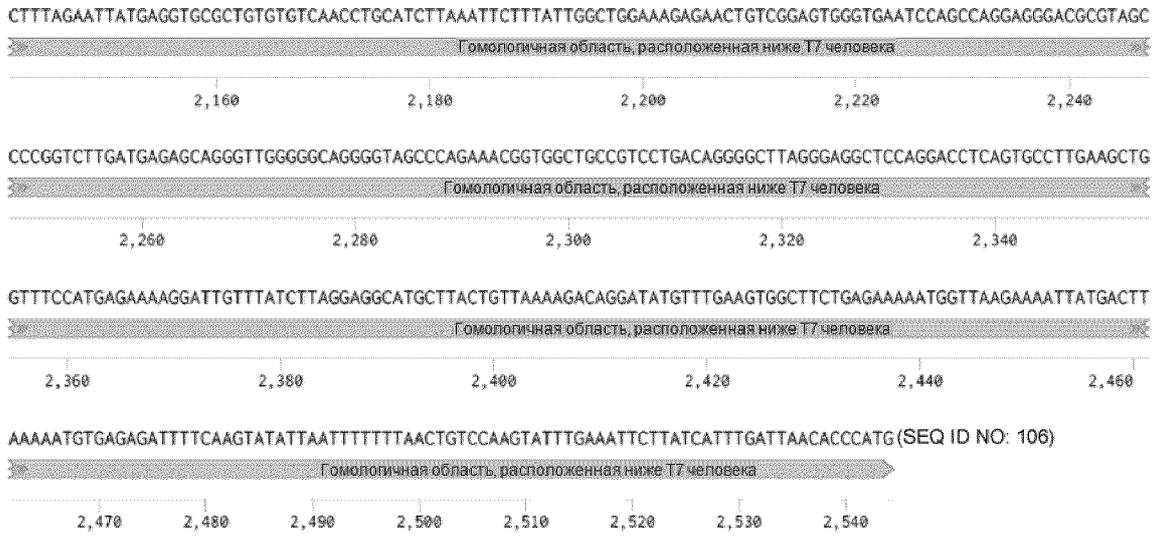


ФИГ. 25F (продолжение)



74/110

ФИГ. 25F (продолжение)



75/110

ФИГ. 25F (продолжение)

>Гомологичная область, расположенная выше Т7 человека в конструкциях настоящего изобретения

```
TGTGACGCCCCGAGACAGAAGGTCTCTGGGTGGCTGGGTTTTGTGGGGTGAGGATGGACATTCTGCCATTGTGATTACTACTA  
CTACTACTACATGGACGTCTGGGGCAAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGGTAAGAATGGCCACTTAGGGCCTTTGTTTT  
CTGCTACTGCCTGTGGGGTTTTCTGAGGGCATGTTCCGAGGGGACCTGGGCGGACTGGCCAGGAGGGGATGGGCACTGGGGT  
GCCTTGAGGATCTGGGAGCCTCTGTGGATTTCCGATGCCTTTGGAAAATGGGACTCAGGTTGGGTGCGTCTGATGGAGTAACT  
GAGCCTGGGGGCTTGGGGAGCCACATTTGGACGAGATGCCTGAACAAACCAGGGGTCTTAGTGATGGCTGACGAATGTGTCTC  
AGGAGCGGTGTCT (SEQ ID NO: 153)
```

>Промотор IgVH1-69 в hu-emAb-Medi8852-AAV представляет собой SEQ ID NO: 111

>Последовательность, кодирующая сигнальный пептид в hu-emAb-Medi8852-AAV представляет собой SEQ ID NO: 112

>Последовательность, кодирующая легкую цепь Medi8852 в hu-emAb-Medi8852-AAV

```
ATGGCTACCGGCAGCAGAAACAAGCCTGCTGCTCGCTTTTGGACTGCTCTGTCTCCCTGGTTGCAAGAAGGCAGCGCCGATATT  
CAGATGACCCAGAGCCCTCCAGCCTGTCCGCTTTCAGTGGGGGATCGAGTGACCAATTACCTGCCGAACCAGCCAGAGCCTGAG  
CTCCTACACGCACTGGTATCAGCAGAAAGCCCGGCAAAGCCCTAAGCTGCTGATCTACGCCGCTTCTAGTCGGGGTCCGGAG  
TGCCAAAGCCGGTTCTCCGGATCTGGGAGTGGAACCGACTTTACCCTGACAAATTTCAAGCCTGCAGCCCGAGGATTTGCTACAT  
ACTACTGTCAAGCAGAGCAGAACTTTCCGGCAGGGCACTAAGGTGGAGATCAAACGGACTGTGGCCGCTCCTAGCCTGTTTCATC  
TTCCACCTAGCCAGCAGCAGCTGAAGTCTGGCACTGCCTCTGTCTGTGCTGCTGAACAACCTTCTACCCCTCAGAGGCCAAG  
GTGCAGTGGAAAGTGGACAATGCCCTGCAGAGCCGCAACAGCCAAGAGTCTGTGACCGAGCAGGACTCCAAGGATCCACCTA  
CAGCCTGTCTAGCACCCCTGACTCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCCTGCGAAGTGACACACCAGGGAC  
TGAGCAGCCCTGTGACCAAGAGCTTCAATCGGGGCGAGTGC (SEQ ID NO: 154)
```

>Последовательность, кодирующая переменную область легкой цепи MEDI8852-VK анти-ствол. HA в hu-emAb-Medi8852-AAV

```
GATATTCAGATGACCCAGAGCCCTCCAGCCTGTCCGCTTTCAGTGGGGGATCGAGTGACCAATTACCTGCCGAACCAGCCAGAG  
CCTGAGCTCCTACACGCACTGGTATCAGCAGAAAGCCCGCAAAGCCCTAAGCTGCTGATCTAGCCCGCTTCTAGTCGGGGGT  
CCGGAGTGCCAAAGCCGGTTCTCCGGATCTGGGAGTGGAACCGACTTTACCCTGACAAATTTCAAGCCTGCAGCCCGAGGATTT  
GCTACATACTACTGTCAAGCAGAGCAGAACTTTCCGGCAGGGCACTAAGGTGGAGATCAAA (SEQ ID NO: 155)
```

>Последовательность, кодирующая константную область легкой цепи каппа в hu-emAb-Medi8852-AAV представляет собой SEQ ID NO: 115

>Последовательность, кодирующая линкер GSSG-streptag в hu-emAb-Medi8852-AAV представляет собой SEQ ID NO: 116

76/110

ФИГ. 25F (продолжение)

>Последовательность, кодирующая варибельной области тяжелой цепи анти-ствол. HA в hu-emAb-Medi8852-AAV
CAGGTCCAGCTGCAGCAGAGCGGCCCGGACTGGTCAAGCCTTCACAGACACTGAGCCTGACATGCGCCATTAGCGGAGATAG
CGTGAGCTCCTACAATGCCGTGTGGAAGTGGATCAGGCAGTCTCCAAGTCGAGGACTGGAGTGGCTGGGACGAACATACTATA
GATCCGGGTGGTACAATGACTATGCTGAATCAGTGAAAAGCCGAATTACTATCAACCCCGATACCTCCAAGAATCAGTTCTCTCT
GCAGCTGAACAGTGTGACCCCTGAGGACACAGCCGTGTACTACTGCCCCAGAAGCGGCCATATCACCGTCTTTGGCGTCAATG
TGGATGCTTTCGATATGTGGGGCAGGGGACTATGGTCACCGTCTCTTCA (SEQ ID NO: 156)

>Аминокислотная последовательность сигнального пептида в hu-emAb-Medi8852-

AAV представляет собой SEQ ID NO: 118

MATGSRTSLLLAFLGLLCLPWLQEGSADIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRTSQSLSSYTHWYQQKPGKAPKLLIYAASSRGSVPSRF
SGSGSGTDFTLTISSLPEDFATYYCQSRFTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL
QSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 157)

>Аминокислотная последовательность варибельной легкой цепи MEDI8852-VK анти-ствол. HA в hu-emAb-Medi8852-AAV
DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRTSQSLSSYTHWYQQKPGKAPKLLIYAASSRGSVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLPEDFATYYC
QSRFTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 158)

>Аминокислотная последовательность константной области легкой цепи каппа в hu-emAb-

Medi8852-AAV представляет собой SEQ ID NO: 121

>Аминокислотная последовательность линкера GSSG-streptag в hu-emAb-Medi8852-AAV

QVQLQQSGPGLVKPSQTLTLTCAISGDSVSSYNAVWNWIRQSPSRGLEWLGRTYYRSGWYNDYAESVKSRTINPDTSKNQFSLQLN
SVTPEDTAVYYCARGHITVFGVNVDAFDMWGQGTMTVSS (SEQ ID NO: 159)

>Граница сплайсинга с фланкирующей последовательностью в hu-emAb-Medi8852-AAV представляет собой SEQ ID NO: 151

>Гомологичная область, расположенная ниже T7 человека в hu-emAb-Medi8852-AAV представляет собой SEQ ID NO: 125

77/110

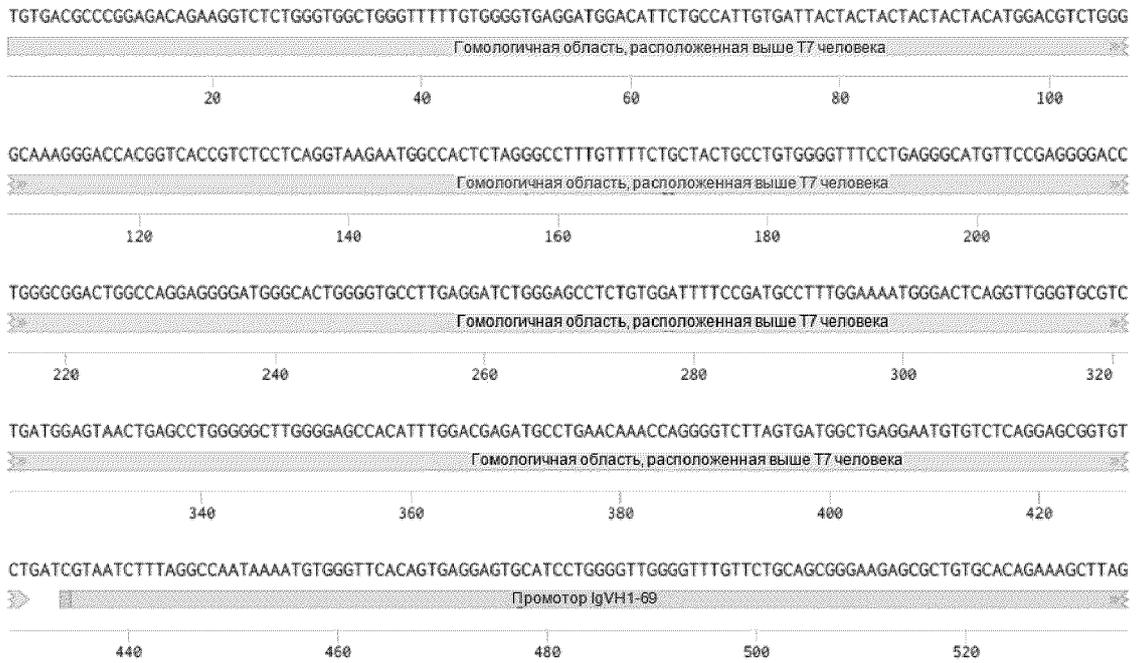
ФИГ. 25F (продолжение)

>Последовательность, кодирующая легкую цепь Medi8852 без сигнальной последовательности в hu-emAb-Medi8852-AAV
GATATTCAGATGACCCAGAGCCCTTCCAGCCTGTCCGCTTTCAGTGGGGGATCGAGTGACCATTACCTGCCGAACCAGCCAGAG
CCTGAGCTCCTACACGCACTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCAAAGCCCCTAAGCTGCTGATCTACGCCGCTTCTAGTCGGGGGT
CCGGAGTGCCAAAGCCGGTTCTCCGGATCTGGGAGTGGAACCGACTTTACCCCTGACAATTTCAAGCCTGCAGCCCGAGGATTC
GCTACATACTACTGTCAGCAGAGCAGAACTTTCGGGCAGGGCACTAAGGTGGAGATCAAACGGACTGTGGCCGCTCCTAGCGT
GTTTCATCTTCCACCTAGCGACGAGCAGCTGAAGTCTGGCACTGCCTCTGTCGTGTGCCTGCTGAACAACCTTCTACCCCTCGAGA
GGCCAAGGTGCAGTGGAAGTGGACAATGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAAGAGTCTGTGACCGAGCAGGACTCCAAGGAT
TCCACCTACAGCCTGTCTAGCACCTGACTCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGCGAAGTGACACA
CCAGGGACTGAGCAGCCCTGTGACCAAGAGCTTCAATCGGGGCGAGTGC (SEQ ID NO: 283)

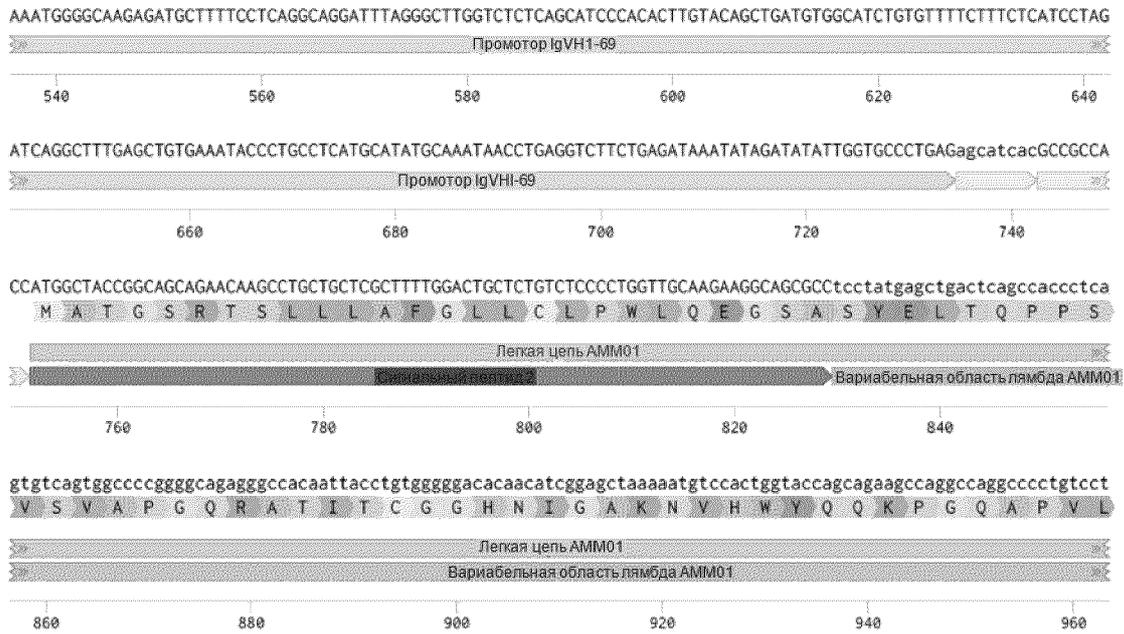
>Аминокислотная последовательность легкой цепи Medi8852 без сигнального пептида в hu-emAb-Medi8852-AAV
DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRYSQSLSSYTHWYQQKPKGKAPKLLIYAASSRSGVPSRFRSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYC
QQSRTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYLSSTLT
LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 288)

78/110

ФИГ. 25G
hu-emAb-AMM01-AAV (2555 п.о.)

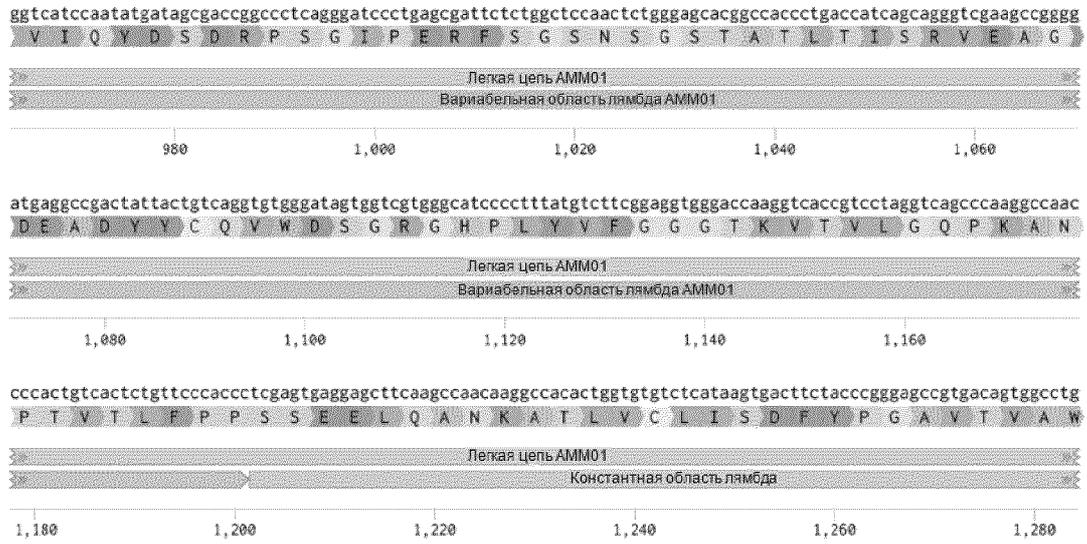


ФИГ. 25G (продолжение)

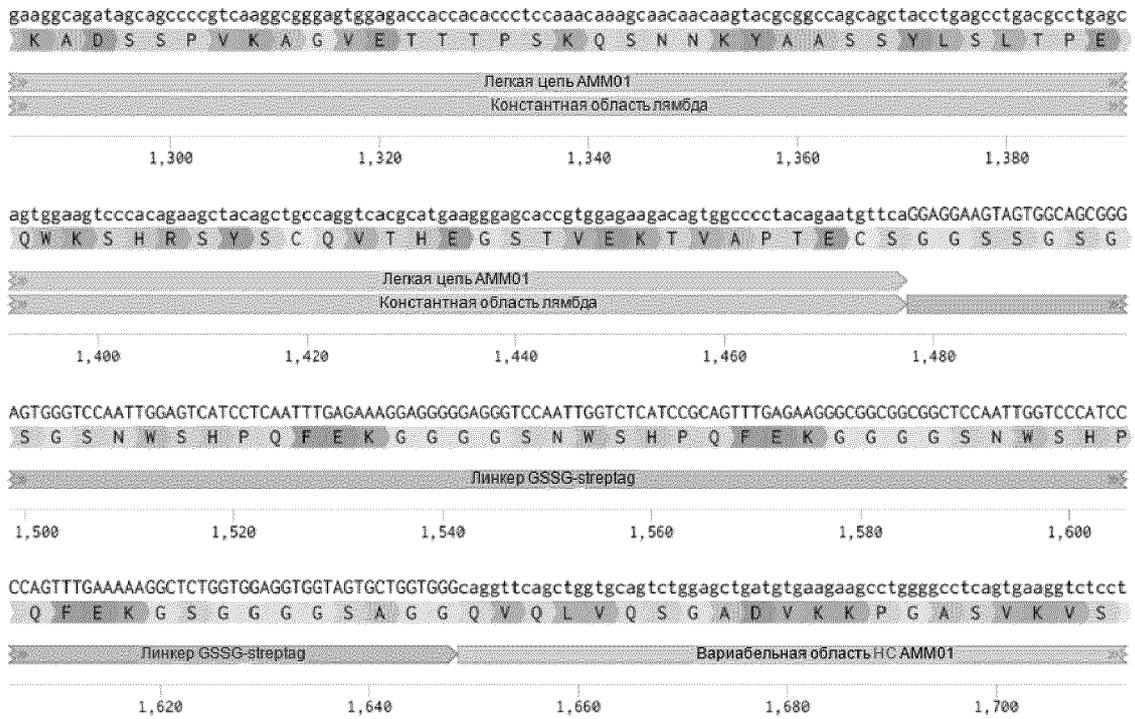


80/110

ФИГ. 25G (продолжение)

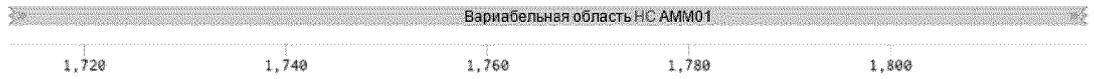


ФИГ. 25G (продолжение)

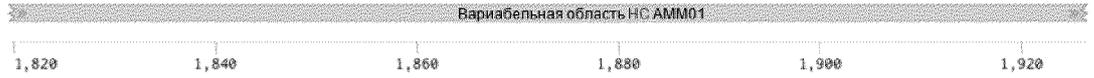


ФИГ. 25G (продолжение)

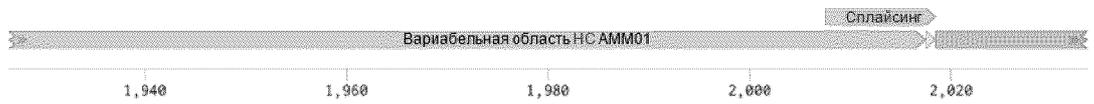
gcaaggcttctggttacacctttattcattttgggtatcagttgggtgctggcaggccccctggacaagggcttgagtggatgggatcgacactaataatgtaac
 CKASGYTFIHFGISWVRQAPGQGLEWMGWIDTNNGN



acaactatgcacagagtctccagggcagagtcacatgaccacagatacatccacgggcacagcctacatggagctgaggagcctctcgactgacgacagggcgt
 TNYAQLQGRVTMTTDTSTGTAYMELRSLSTD DTA V



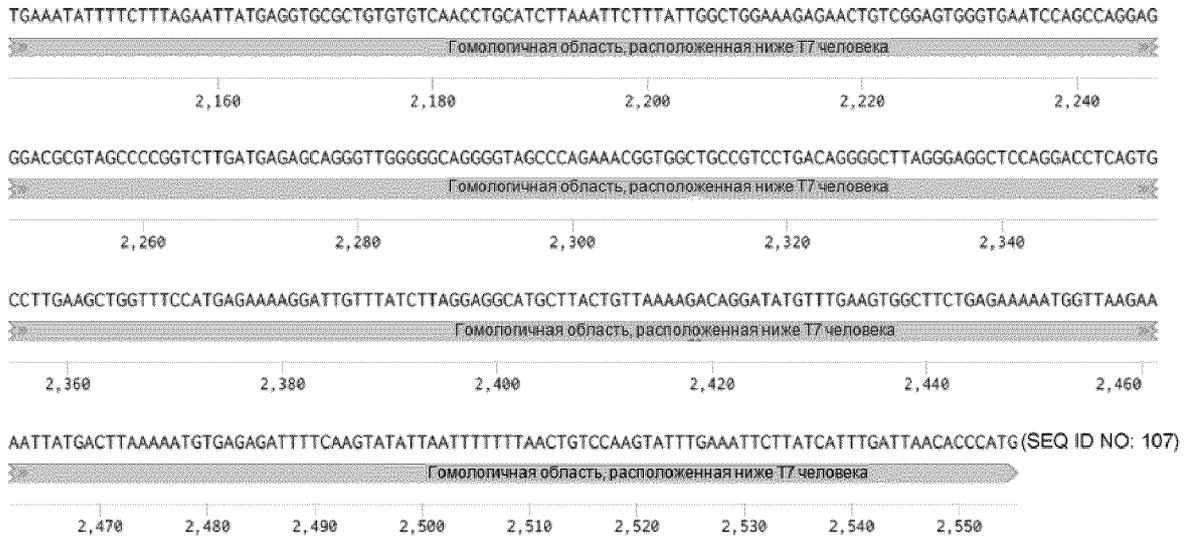
gtatttctgtgctgagctctggaatggggcatagaagtggcttccatttgactactggggccaggagctctgtgaccgtctccccGGTGAGTTGGCTTTCC
 YFCARALEMGRSGFPFDYWGQGVLVTVSP (SEQ ID NO: 169)



TTTCGCCTCCTTCTCTGGGCCAGCGTCTCTGACCTGGAGCTGGGAGATAATGTCCGGGGCTCCTTATCGTAGGACTGCAAGATCGCTGCACAGCAGCGAATCG



ФИГ. 25G (продолжение)



84/110

ФИГ. 25G (продолжение)

>Гомологичная область, расположенная выше Т7 человека в hu-emAb-AMM01-AAV

представляет собой SEQ ID NO: 153

>Промотор IgVH1-69 в hu-emAb-AMM01-AAV представляет собой SEQ ID NO: 111

>Последовательность, кодирующая сигнальный пептид в hu-emAb-AMM01-AAV представляет
ATGGCTACCGGCAGCAGAACAAGCCTGCTGCTCGCTTTTGGACTGCTCTGTCTCCCCTGGTTGCAAGAAGGCAGCGCCTCCTAT
GAGCTGACTCAGCCACCCTCAGTGTCAAGTGGCCCCGGGGCAGAGGGCCACAATTACCTGTGGGGGACACAACATCGGAGCTA
AAAAATGTCCACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGCCAGGCCCTGTCTGGTCAATCCAATATGATAGCGACCCGGCCCTCAGGGATC
CTGAGCGATTCTCTGGCTCCAACCTCTGGGAGCACGGCCACCCTGAACATCAGCAGGGTCGAAGCCGGGGATGAGGCCGACT
ATTACTGTCAGGTGTGGGATAGTGGTCGTGGGCATCCCCTTTATGTCTTCGGAGGTGGGACCAAGGTCACCGTCCTAGGTCAGC
CCAAGGCCAACCCCACTGTCACTCTGTTCCACCCCTCGAGTGAGGAGCTTCAAGCCAACAAGGCCACACTGGTGTGTCTATAA
GTGACTTCTACCCGGGAGCCGTGACAGTGGCCTGGAAGGCAGATAGCAGCCCCGTCAAGGCCGGGAGTGGAGACCACCCACCC
CTCCAAAACAAGCAACAACAAGTACGCGGCCAGCAGCTACCTGAGCCTGACGCCTGAGCAGTGGAAAGTCCCACAGAAGCTACA
GCTGCCAGGTCACGCATGAAGGGAGCACCGTGGAGAAGACAGTGGCCCCCTACAGAATGTTCA (SEQ ID NO: 161)

>Последовательность, кодирующая переменную область легкой цепи лямбда AMM01 в hu-emAb-AMM01-AAV

TCCTATGAGCTGACTCAGCCACCCTCAGTGTCAAGTGGCCCCGGGGCAGAGGGCCACAATTACCTGTGGGGGACACAACATCGG
AGCTAAAAATGTCCACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGCCAGGCCCTGTCTGGTCAATCCAATATGATAGCGACCCGGCCCTCAG
GGATCCCTGAGCGATTCTCTGGCTCCAACCTCTGGGAGCACGGCCACCCTGACCATCAGCAGGGTCGAAGCCGGGGATGAGGC
CGACTATTACTGTCAGGTGTGGGATAGTGGTCGTGGGCATCCCCTTTATGTCTTCGGAGGTGGGACCAAGGTCACCGTCCTAGG
TCAGCCCAAGGCCAACCCCACTGTCACTCTGTTCCACCC (SEQ ID NO: 162)

>Последовательность, кодирующая константную область легкой цепи лямбда в hu-emAb-AMM01-AAV

TCGAGTGAGGAGCTTCAAGCCAACAAGGCCACACTGGTGTGTCTATAAGTGACTTCTACCCGGGAGCCGTGACAGTGGCCTG
GAAGGCAGATAGCAGCCCCGTCAAGCCGGGAGTGGAGACCACACCCTCCAAACAAGCAACAACAAGTACGCGGCCAGC
AGCTACCTGAGCCTGACGCCTGAGCAGTGGAAAGTCCCACAGAAGTACAGCTGCCAGGTCACGCATGAAGGGAGCACCGTGG
AGAAGACAGTGGCCCCCTACAGAATGTTCA (SEQ ID NO: 163)

>Последовательность, кодирующая линкер GSSG-streptag в hu-emAb-AMM01-AAV представляет собой SEQ ID NO: 116

ФИГ. 25G (продолжение)

>Последовательность, кодирующая варибельную область тяжелой цепи AMM01 в hu-emAb-AMM01-AAV

CAGGTTCAAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGATGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGTTACAC
CTTTATTCATTTTGGTATCAGTTGGGTGCGGCAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATCGACACTAATAATGG
TAACACAAACTATGCACAGAGTCTCCAGGGCAGAGTCCACATGACCACAGATACATCCACGGGCACAGCCTACATGGAGCTGAG
GAGCCTCTCGACTGACGACACGGCCGTGATTTCTGTGCGCGAGCTCTGGAAATGGGGCATAGAAGTGGCTTCCCATTGACTA
CTGGGGCCAGGGAGTCTGGTCAACGCTCTCCCA (SEQ ID NO: 164)

>Аминокислотная последовательность сигнального пептида в hu-emAb-AMM01-AAV

представляет собой SEQ ID NO: 118

MATGSRTSLLLAFLGLLCLPWLQEGSASYELTQPPSVSVAPGQRATITCGGHNIGAKNVHWYQQKPGQAPVLIQYDSDRPSGIPERFS
GSNSGSTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSGRGHPLYVFGGKTVTLGQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTV
AWKADSSPVKAGVETTTSPKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSQRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS (SEQ ID NO: 165)

>Аминокислотная последовательность варибельной области легкой цепи AMM01 в hu-emAb-AMM01-AAV

SYELTQPPSVSVAPGQRATITCGGHNIGAKNVHWYQQKPGQAPVLIQYDSDRPSGIPERFSGNSGSTATLTISRVEAGDEADYYCQ
VWDSGRGHPLYVFGGKTVTLGQPKANPTVTLFPP (SEQ ID NO: 166)

>Аминокислотная последовательность константной области легкой цепи лямбда AMM01 в hu-emAb-AMM01-AAV

SSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTSPKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSQRSYSCQVTHEGSTVEKTV
APTECS (SEQ ID NO: 167)

>Аминокислотная последовательность линкера GSSG-streptag в hu-emAb-AMM01-AAV

представляет собой SEQ ID NO: 122

QVQLVQSGADVKKPGASVKVSKASGYTFIHFGISWVRQAPGQGLEWVMGMDTNGNTNYAQLQGRVTMTTDTSTGTAYMELRSL
STDDTAVYFCARALEMHRSGFFDYWGQGLVTVSP (SEQ ID NO: 168)

>Граница сплайсинга с фланкирующей последовательностью в hu-emAb-AMM01-AAV представляет собой SEQ ID NO: 151

>Гомологичная область, расположенная ниже T7 человека в hu-emAb-AMM01-AAV представляет собой SEQ ID NO: 125

ФИГ. 25G (продолжение)

>Последовательность, кодирующая легкую цепь АММ01 без сигнальной последовательности в hu-emAb-AMM01-AAV

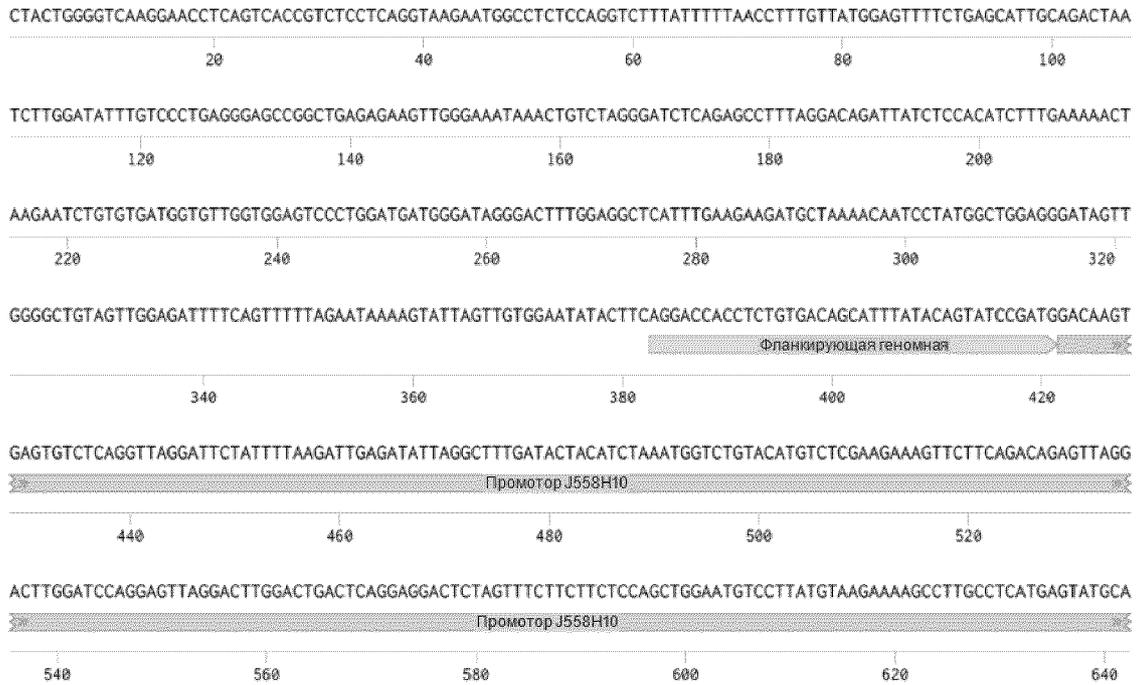
TCCTATGAGCTGACTCAGCCACCCCTCAGTGTCACTGGCCCCGGGGCAGAGGGCCACAATTACCTGTGGGGGACACAACATCGG
AGCTAAAATGTCCACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGCCAGGCCCTGTCTGGTCATCCAATATGATAGCGACCGGCCCTCAG
GGATCCCTGAGCGATTCTCTGGCTCCAACCTCTGGGAGCACGGCCACCCTGACCATCAGCAGGGTCGAAGCCGGGGATGAGGC
CGACTATTACTGTCAGGTGTGGGATAGTGGTCGTGGGCATCCCCTTTATGTCTTCGGAGGTGGGACCAAGGTCACCGTCCTAGG
TCAGCCCAAGGCCAACCCCACTGTCACTCTGTTCCACCCCTCGAGTGAGGAGCTTCAAGCCAACAAGGCCACACTGGTGTGTCT
CATAAGTGACTTCTACCCGGGAGCCGTGACAGTGGCCTGGAAGGCAGATAGCAGCCCCGTCAAGGCCGGGAGTGGAGACCACC
ACACCCCTCAAACAAGCAACAACAAGTACGCGGCCAGCAGTACCTGAGCCTGACGCCTGAGCAGTGAAGTCCACAGAAG
CTACAGCTGCCAGGTACGCATGAAGGGAGCACCGTGGAGAAGACAGTGGCCCCTACAGAATGTTCA (SEQ ID NO: 284)

>Аминокислотная последовательность легкой цепи АММ01 без сигнального пептида в hu-emAb-AMM01-AAV

SYELTQPPSVSVAPGQRATITCGHNIKAKNVHWYQQKPGQAPVLIQYDSDRPSGIPERFSGSNSGSTATLTISRVEAGDEADYYCQ
VWDSGRGHPLYVFGGGTKVTLVGLGQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTTPSKQSNK
YAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS (SEQ ID NO: 289)

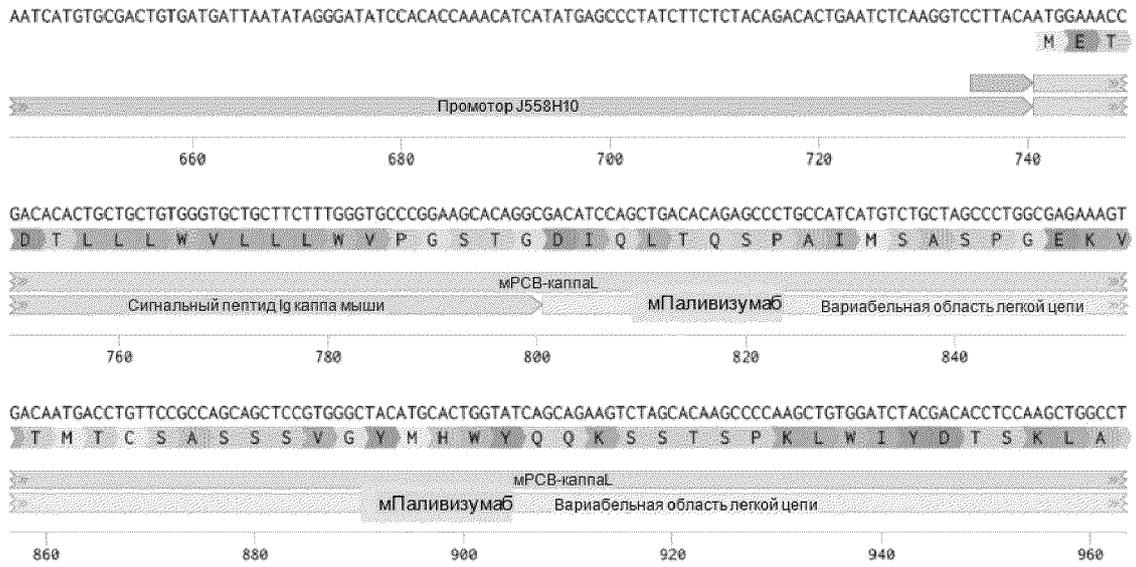
87/110

ФИГ. 25Н
Интегрирование сплайсинга мРНК Balb/C (2261 п.о.)



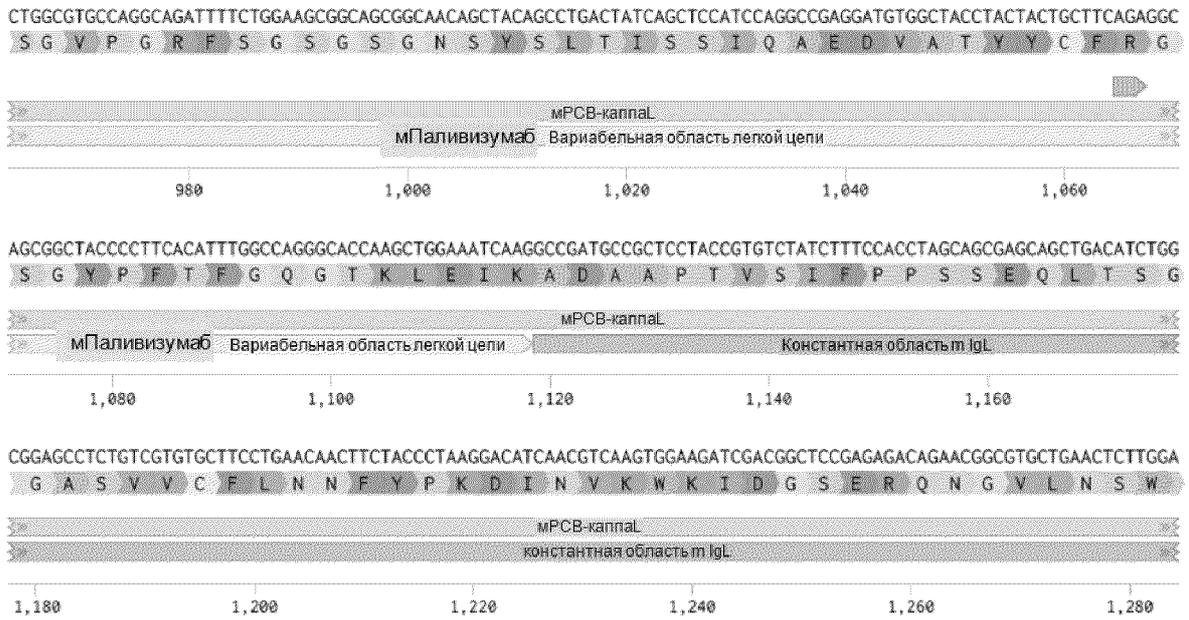
88/110

ФИГ. 25Н (продолжение)

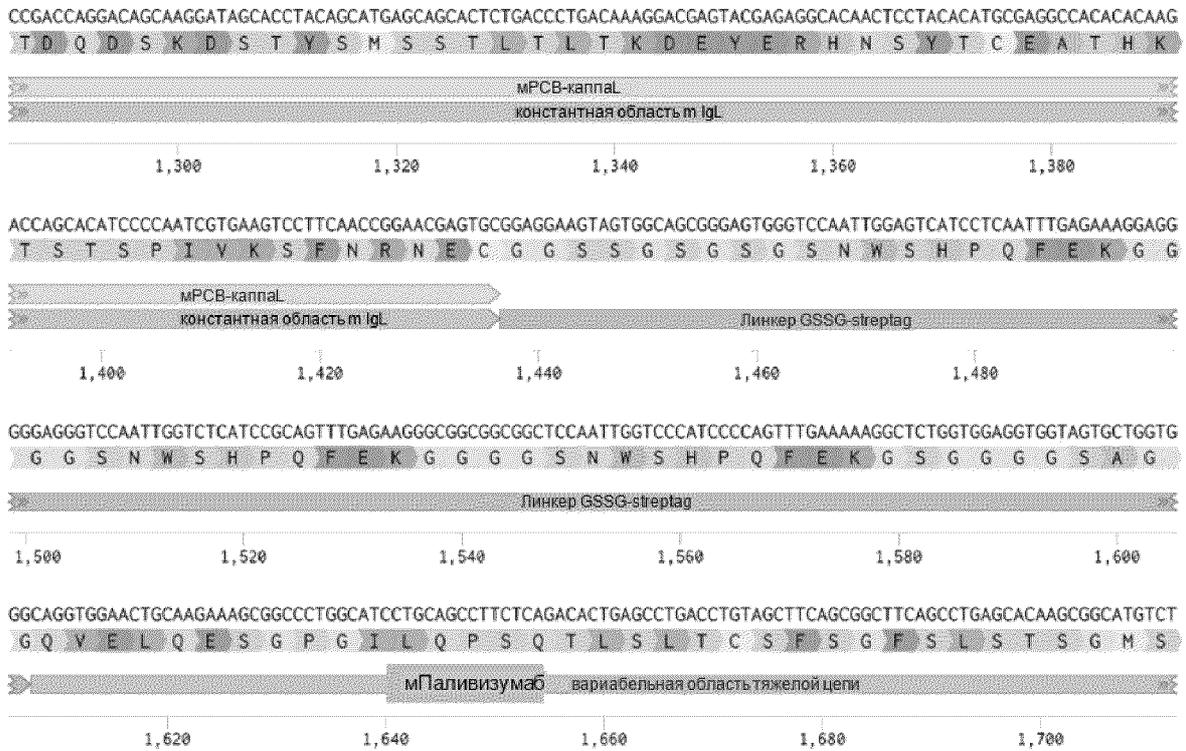


89/110

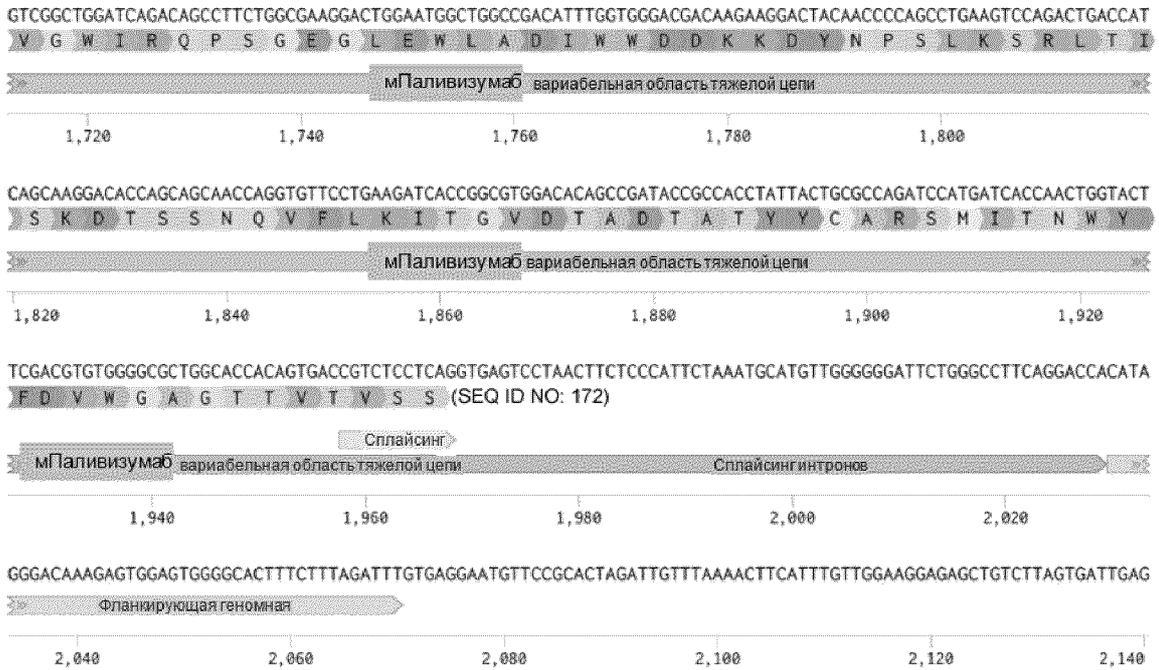
ФИГ. 25Н (продолжение)



ФИГ. 25Н (продолжение)



ФИГ. 25Н (продолжение)



92/110

ФИГ. 25Н (продолжение)

TCAAGGGAGAAAGGCATCTAGCCTCGGTCTCAAAGGGTAGTTGCTGTCTAGAGAGGTCTGGTGGAGCCTGCAAAAGTCCAGCTTCAAAGGAACACAGAAGTATGT

2,160 2,180 2,200 2,220 2,240

GTATGGAATATTAG (SEQ ID NO: 108)

2,250 2,260

ФИГ. 25Н (продолжение)

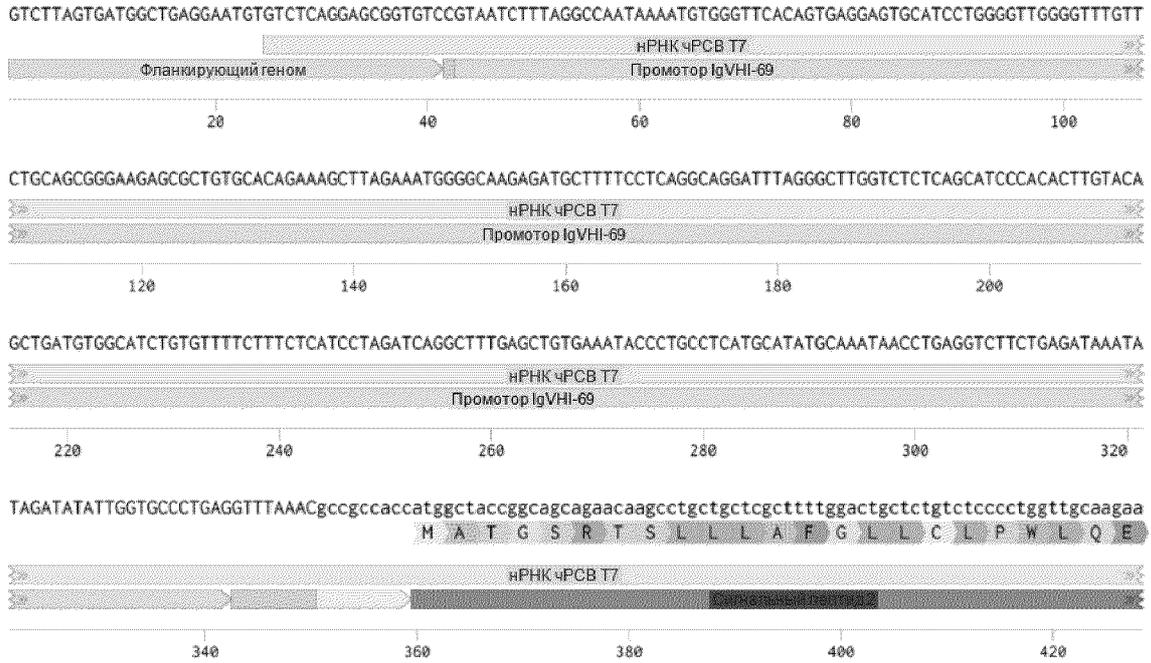
>Фланкирующая геномная ДНК, расположенная выше в интегрировании сплайсинга мРНК Balb/C
AGGACCACCTCTGTGACAGCATTTATACAGTATCCGATG (SEQ ID NO: 170)

- >Промотор J558H10 в интегрировании сплайсинга мРНК Balb/C в SEQ ID NO: 128
- >Последовательность, кодирующая сигнальный пептид в интегрировании сплайсинга мРНК Balb/C представляет собой SEQ ID NO: 129
- >Последовательность, кодирующая легкую цепь мПаливизумаба в интегрировании сплайсинга мРНК Balb/C представляет собой SEQ ID NO: 130
- >Последовательность, кодирующая варибельной области легкой цепи мПаливизумаба в интегрировании сплайсинга мРНК Balb/C представляет собой SEQ ID NO: 131
- >Последовательность, кодирующая константной области легкой цепи каппа мПаливизумаба в интегрировании сплайсинга мРНК Balb/C представляет собой SEQ ID NO: 132
- >Последовательность, кодирующая линкера GSSG-streptag в интегрировании сплайсинга мРНК Balb/C представляет собой SEQ ID NO: 116
- >Последовательность, кодирующая варибельную область тяжелой цепи мПаливизумаба в интегрировании сплайсинга мРНК Balb/C представляет собой SEQ ID NO: 133
- >Аминокислотная последовательность сигнального пептида в интегрировании сплайсинга мРНК Balb/C представляет собой SEQ ID NO: 134
- >Аминокислотная последовательность легкой цепи мПаливизумаба в интегрировании сплайсинга мРНК Balb/C представляет собой SEQ ID NO: 135
- >Аминокислотная последовательность варибельной области легкой цепи мПаливизумаба в интегрировании сплайсинга мРНК Balb/C представляет собой SEQ ID NO: 136
- >Аминокислотная последовательность константной области легкой цепи каппа мПаливизумаба в интегрировании сплайсинга мРНК Balb/C mRSV-сплайсинг интегрирование в SEQ ID NO: 137
- >Аминокислотная последовательность линкера GSSG-streptag в интегрировании сплайсинга мРНК Balb/C представляет собой SEQ ID NO: 122
- >Аминокислотная последовательность варибельной области тяжелой цепи мПаливизумаба в интегрировании сплайсинга мРНК Balb/C представляет собой SEQ ID NO: 138
- >Граница сплайсинга с фланкирующей последовательностью в интегрировании сплайсинга мРНК Balb/C представляет собой SEQ ID NO: 139
- >Фланкирующая геномная ДНК, расположенная ниже в интегрировании сплайсинга мРНК Balb/C

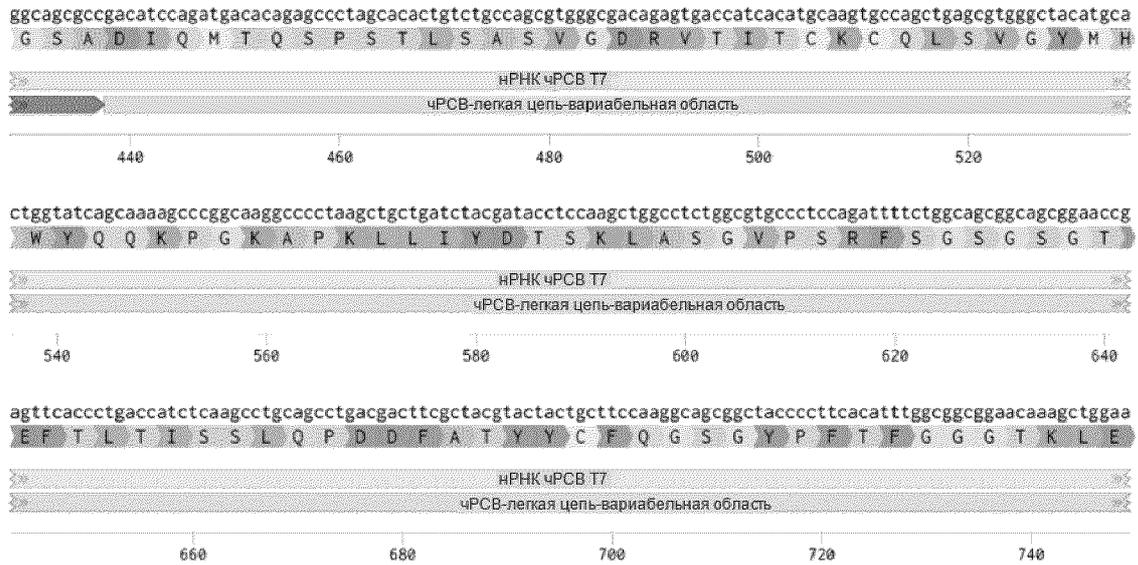
CATAGGGACAAAGAГTGGAGTGGGGCACTTTCTTTAGATTT (SEQ ID NO: 171)

- >Последовательность, кодирующая легкую цепь мПаливизумаба без сигнальной последовательности в интегрировании сплайсинга мРНК Balb/C представляет собой SEQ ID NO: 281
- >Аминокислотная последовательность, кодирующая легкую цепь мПаливизумаба без сигнального пептида в интегрировании сплайсинга мРНК Balb/C представляет собой SEQ ID NO: 286

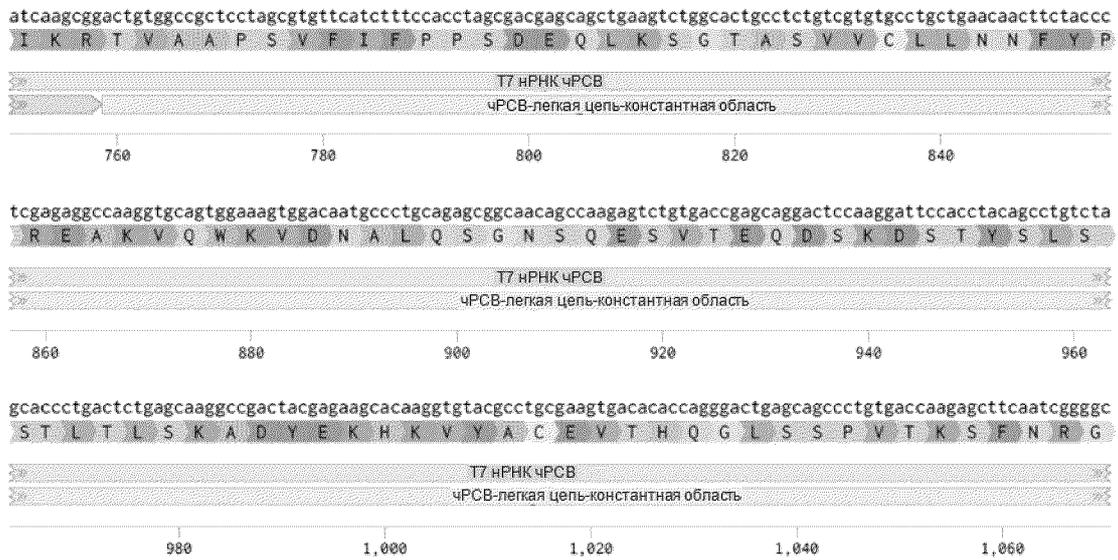
ФИГ. 25I
 ТТ-hRSV-T7-интегрированный (1707 п.о.)



ФИГ. 25I (продолжение)

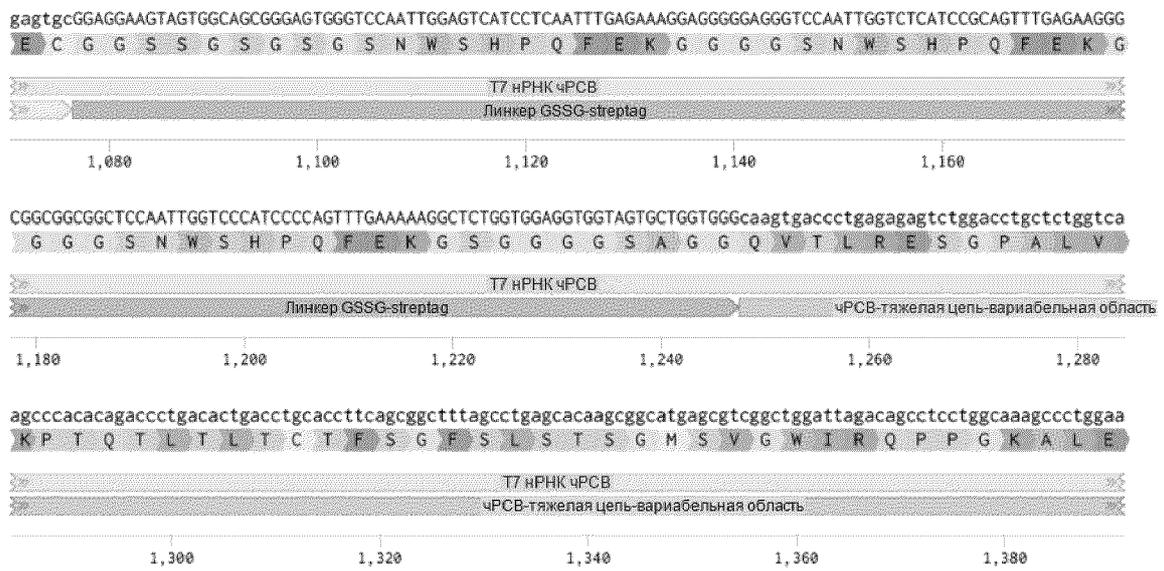


ФИГ. 25I (продолжение)

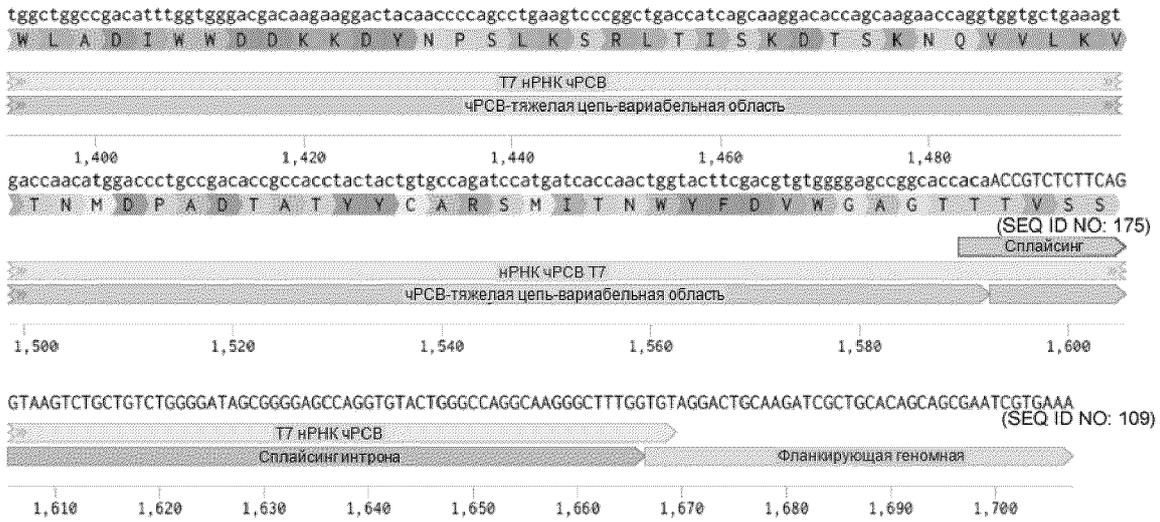


97/110

ФИГ. 25I (продолжение)



ФИГ. 25I (продолжение)



99/110

ФИГ. 25I (продолжение)

- >Фланкирующая геномная последовательность ДНК, расположенная выше в TT-hRSV-T7-
GTCTTAGTGATGGCTGAGGAATGTGTCTCAGGAGCGGTGTC (SEQ ID NO: 173)
- >Промотор IgVH1-69 в TT-hRSV-T7-интегрированном представляет собой SEQ ID NO: 111
- >Последовательность, кодирующая сигнальный пептид TT-hRSV-T7-интегрированный представляет собой SEQ ID NO: 112
- >Последовательность, кодирующая легкой цепи чPCB в TT-hRSV-T7-интегрированный представляет собой SEQ ID NO: 113
- >Последовательность, кодирующая переменной области легкой цепи чPCB в TT-hRSV-T7-интегрированный представляет собой SEQ ID NO: 114
- >Последовательность, кодирующая константной области легкой цепи каппа в TT-hRSV-T7-интегрированный представляет собой SEQ ID NO: 115
- >Последовательность, кодирующая линкер GSSG-streptag TT-hRSV-T7-интегрированный представляет собой SEQ ID NO: 116
- >Последовательность, кодирующая переменной области тяжелой цепи hRSV в TT-hRSV-T7-интегрированный представляет собой SEQ ID NO: 117
- >Аминокислотная последовательность сигнального пептида TT-hRSV-T7-интегрированный представляет собой SEQ ID NO: 118
- >Аминокислотная последовательность легкой цепи чPCB в TT-hRSV-T7-интегрированный представляет собой SEQ ID NO: 119
- >Аминокислотная последовательность переменной области легкой цепи чPCB в TT-hRSV-T7-интегрированный представляет собой SEQ ID NO: 120
- >Аминокислотная последовательность константной области легкой цепи каппа чPCB в TT-hRSV-T7-интегрированный представляет собой SEQ ID NO: 121
- >Аминокислотная последовательность линкера GSSG-streptag TT-hRSV-T7-интегрированный представляет собой SEQ ID NO: 122
- >Аминокислотная последовательность переменной области тяжелой цепи чPCB в TT-hRSV-T7-интегрированный представляет собой SEQ ID NO: 123
- >Граница сплайсинга с фланкирующей последовательностью TT-hRSV-T7-интегрированный представляет собой SEQ ID NO: 124
- >Фланкирующая геномная последовательность ДНК ниже в TT-hRSV-T7-интегрированный
TGTAGGACTGCAAGATCGCTGCACAGCAGCGAATCGTGAAA (SEQ ID NO: 174)

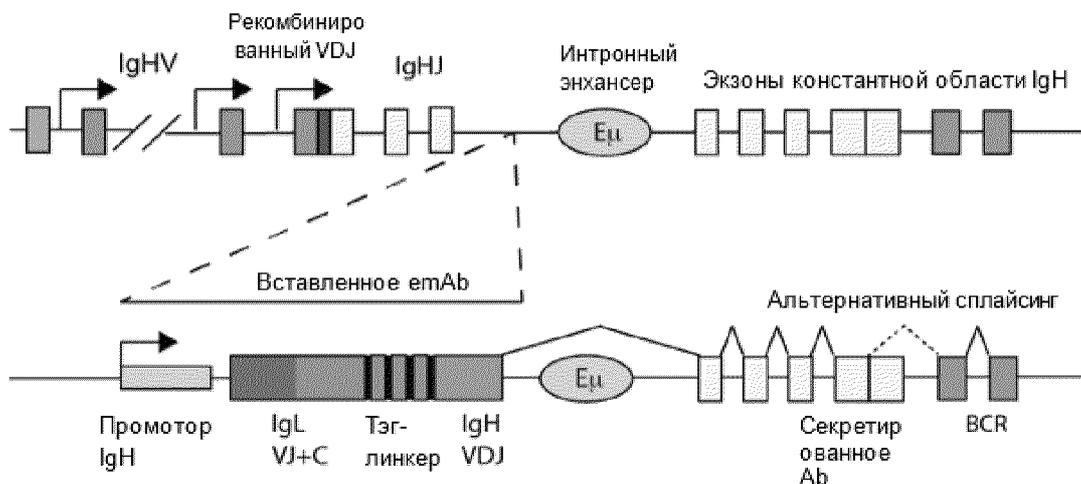
100/110

ФИГ. 25I (продолжение)

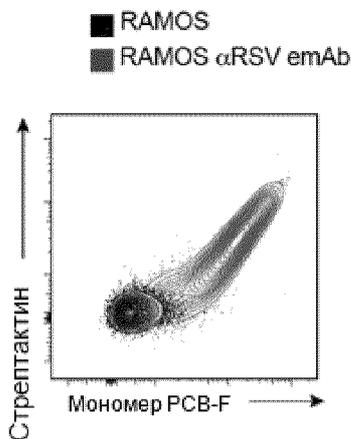
>Последовательность, кодирующая легкую цепь чРСВ без сигнальной последовательности в ТТ-hRSV-T7-интегрированный представляет собой SEQ ID NO: 280

>Аминокислотная последовательность легкой цепи чРСВ без сигнальной последовательности в ТТ-hRSV-T7-интегрированный представляет собой SEQ ID NO: 285

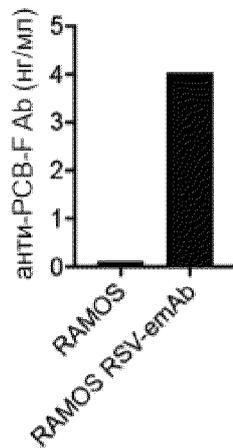
ФИГ. 26А



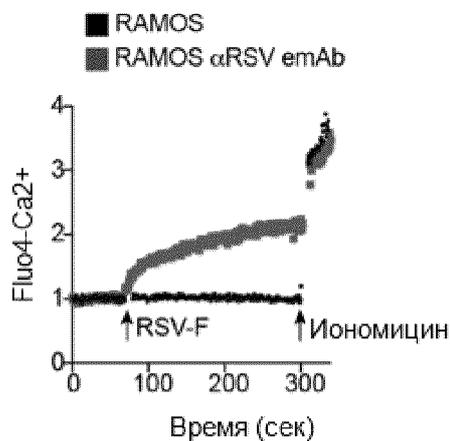
ФИГ. 26В



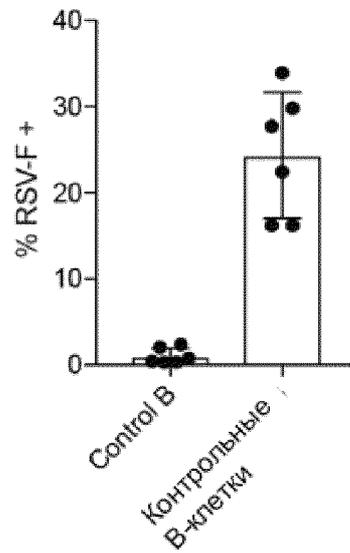
ФИГ. 26С



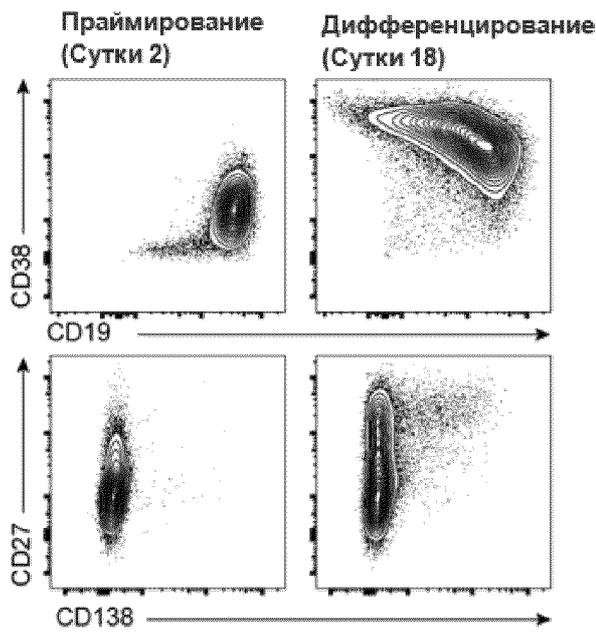
ФИГ. 26D



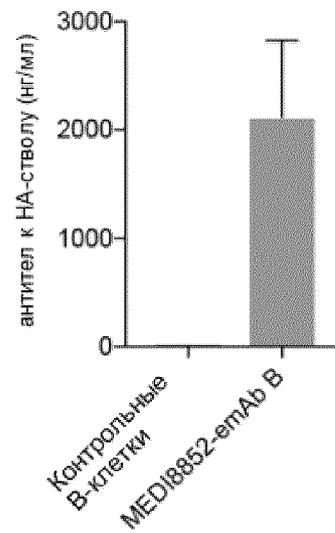
ФИГ. 27E



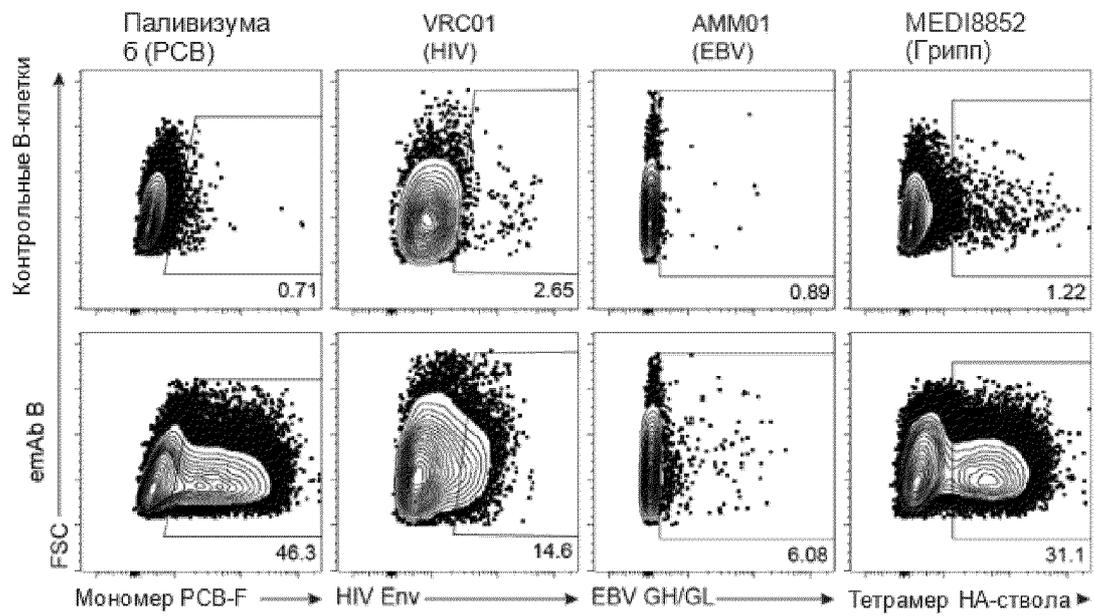
ФИГ. 27F



ФИГ. 27G

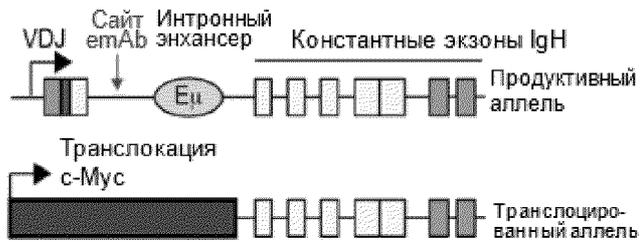


ФИГ. 28

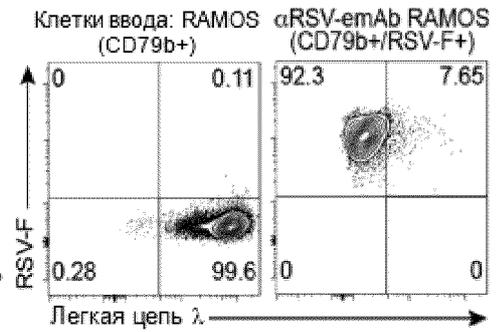


ФИГ. 29А

Аллели IgH RAMOS

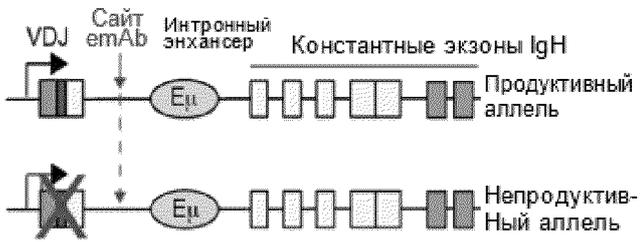


ФИГ. 29В

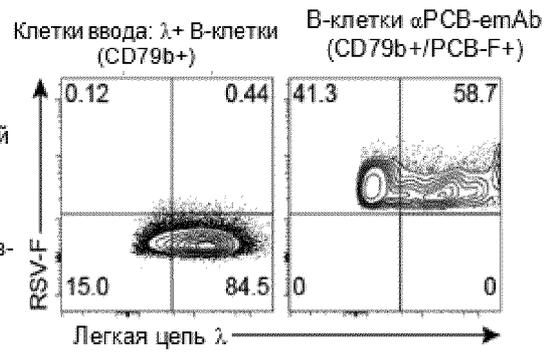


ФИГ. 29С

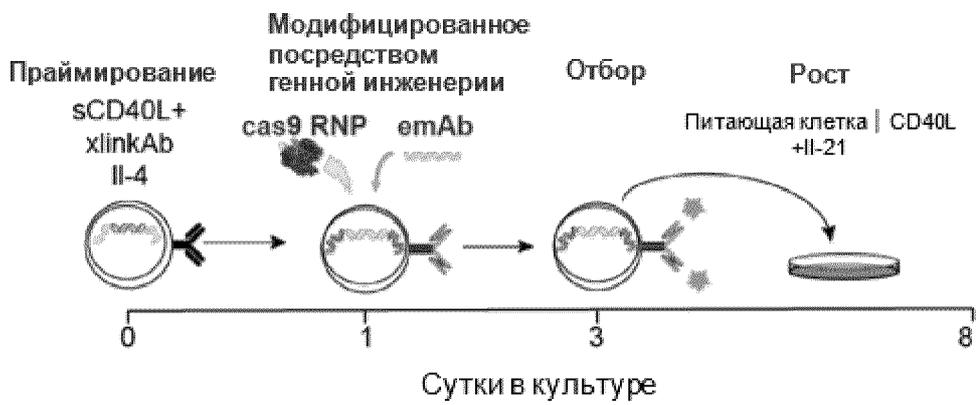
В-клеточные аллели IgH



ФИГ. 29D

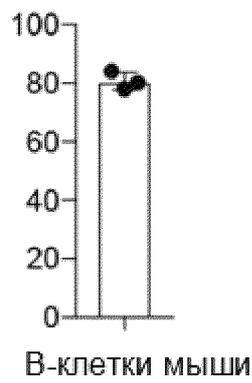


ФИГ. 30А

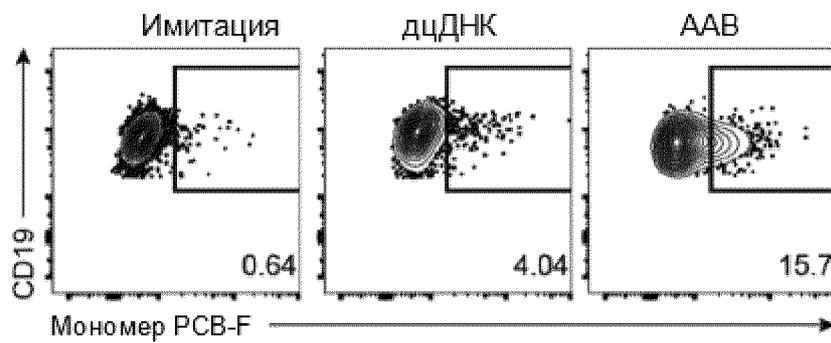


% вставок/делеций с помощью TIDE

ФИГ. 30В

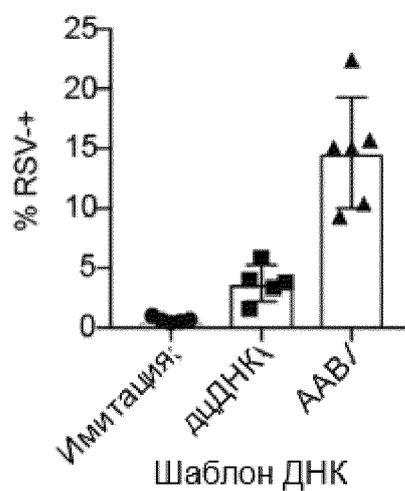


ФИГ. 30С

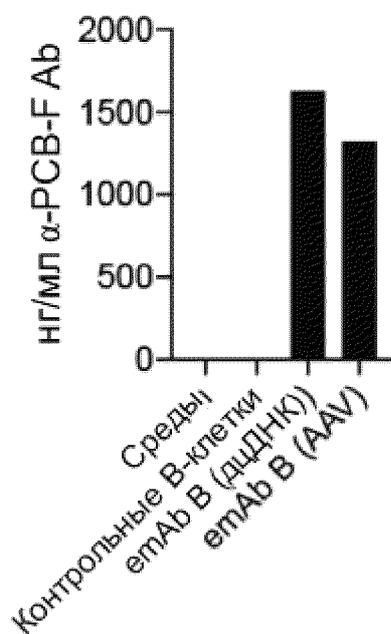


107/110

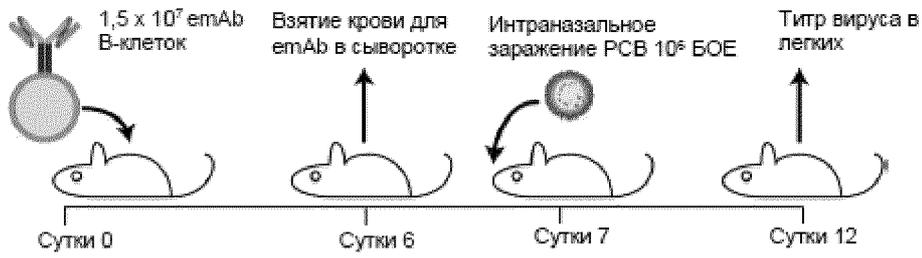
ФИГ. 30D



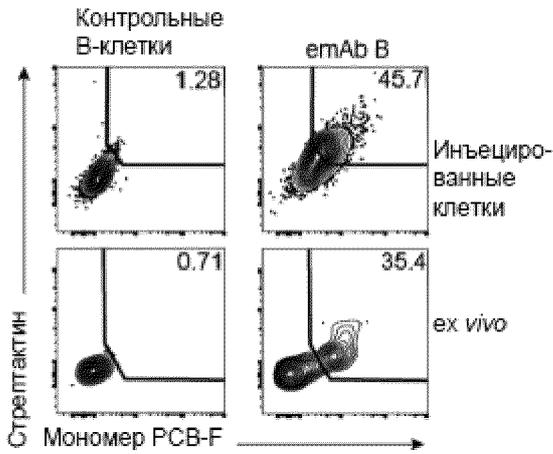
ФИГ. 30E



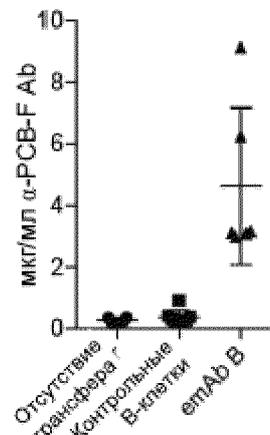
ФИГ. 31А



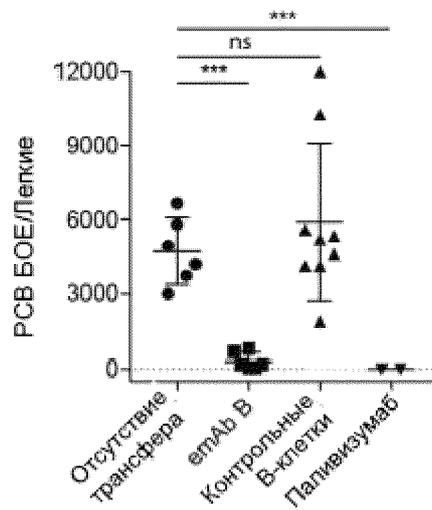
ФИГ. 31В



ФИГ. 31С

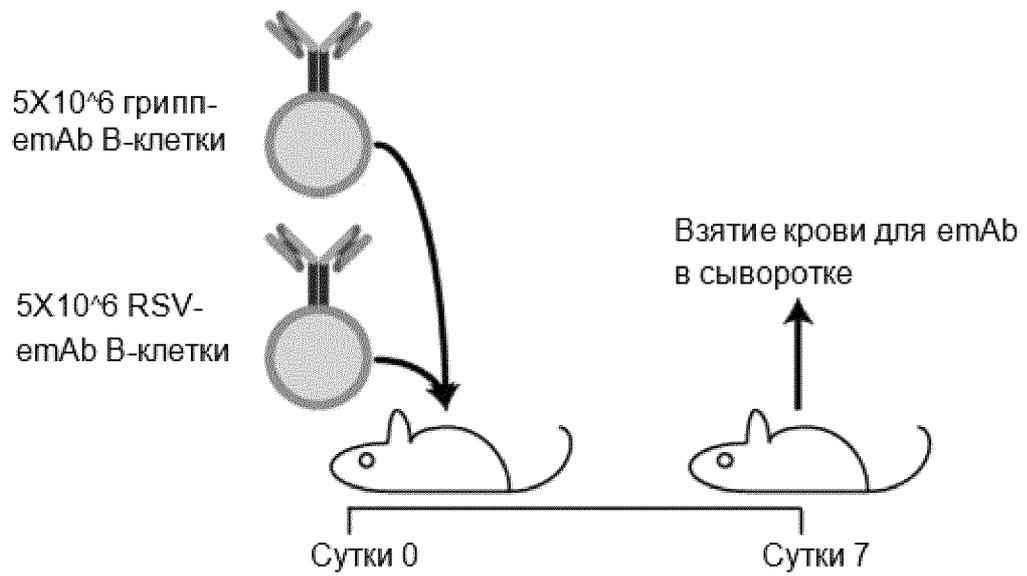


ФИГ. 31D

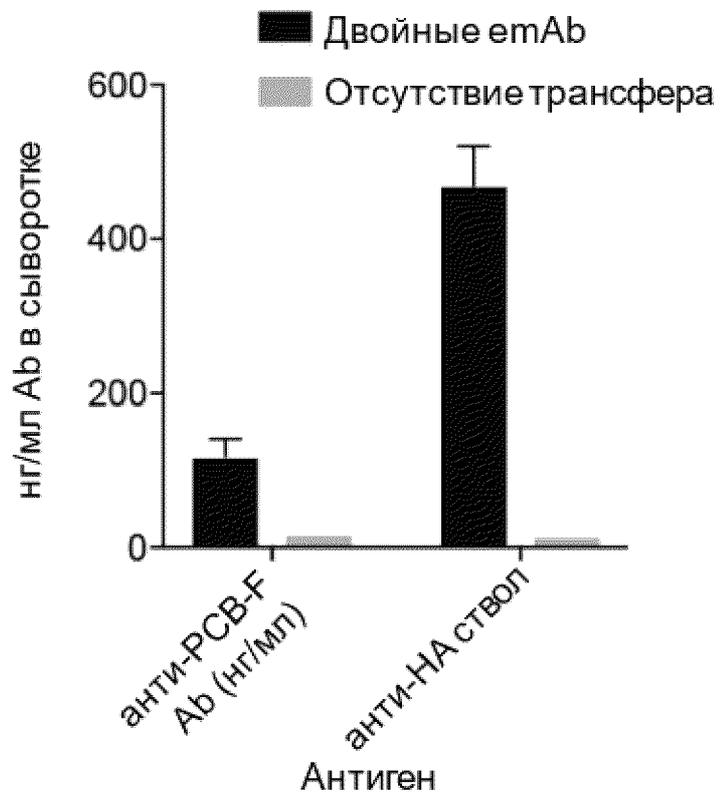


109/110

ФИГ. 32А

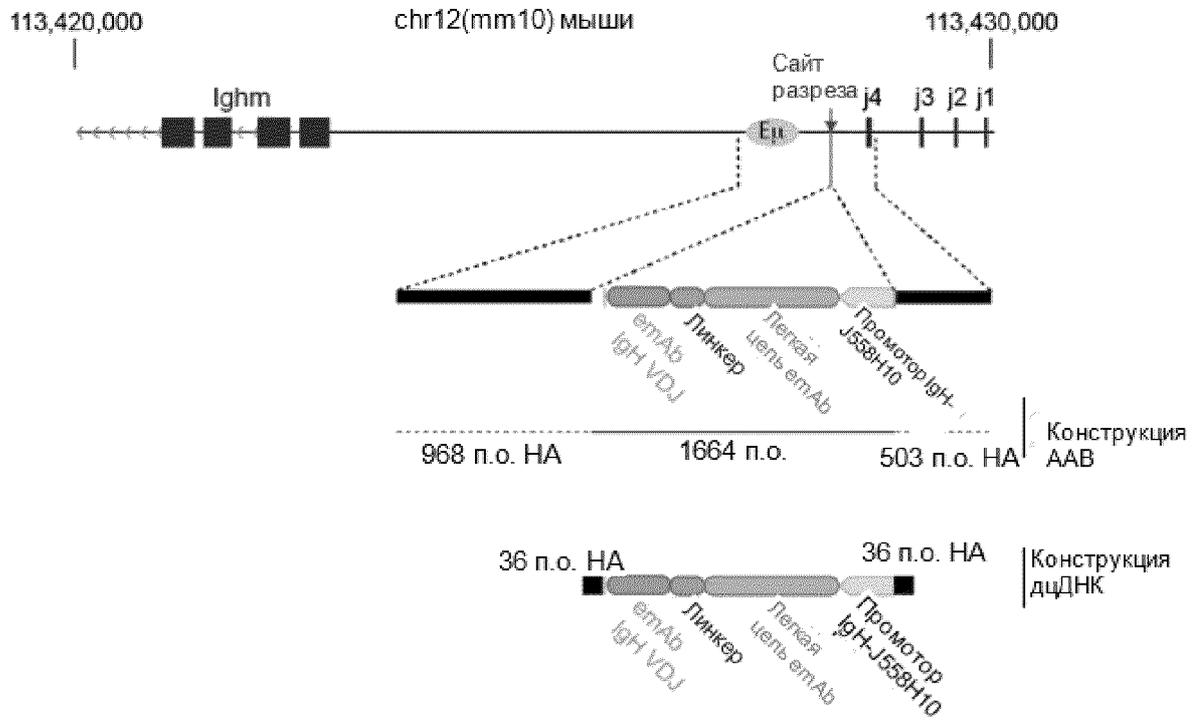


ФИГ. 32В

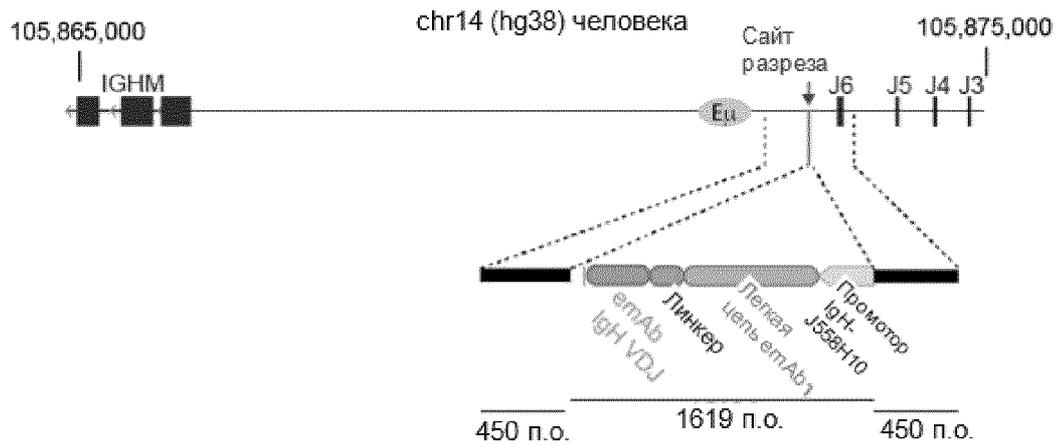


110/110

ФИГ. 33А



ФИГ. 33В



ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ

(статья 15(3) ЕАПК и правило 42 Патентной инструкции к ЕАПК)

Номер евразийской заявки:

202490247А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:
См. дополнительный лист

Б. ОБЛАСТЬ ПОИСКА:

C12N 15/63, C12N 15/79, C12N 15/09, C12N 15/13

Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если возможно, используемые поисковые термины)
EAPATIS, Espacenet, Patentscope, USPTO, PubMed, EMBL-EBI, Google

В. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ

Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
X	WO 2011085247 A4 (IMMUSOFT CORPORATION И ДР.) 2011-07-14 стр.16 абзац 4 - стр.17 абзац 1, стр.18, стр.20 абзац 2 и 3, стр.21 два последних абзаца - стр.22, стр.27 последний абзац, стр.28 абзац 1 и 2, стр.32 абзац 4, переход со стр.42 на стр.43, формула	1
Y		2-10
Y	FUBIN LI AND LAUREL A. ECKHARDT , A role for the IgHintronic enhancer E in enforcing allelic exclusion , J. EXP. MED.,2008 December 29, Vol.206, No.1, pp.153-167 doi: 10.1084/jem.20081202 весь документ	2-10
Y	US 8637024 B2 (THE ROCKEFELLER UNIVERSITY) 2014-01-28 пример 3, seq id no:22 и 24	9, 10

 последующие документы указаны в продолжении графы

* Особые категории ссылочных документов:

«А» - документ, определяющий общий уровень техники

«D» - документ, приведенный в евразийской заявке

«E» - более ранний документ, но опубликованный на дату подачи евразийской заявки или после нее

«O» - документ, относящийся к устному раскрытию, экспонированию и т.д.

"P" - документ, опубликованный до даты подачи евразийской заявки, но после даты испрашиваемого приоритета"

«Т» - более поздний документ, опубликованный после даты приоритета и приведенный для понимания изобретения

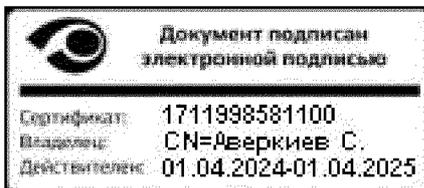
«X» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий новизну или изобретательский уровень, взятый в отдельности

«Y» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий изобретательский уровень в сочетании с другими документами той же категории

«&» - документ, являющийся патентом-аналогом

«L» - документ, приведенный в других целях

Дата проведения патентного поиска: 20 июня 2024 (20.06.2024)

Уполномоченное лицо:
Начальник Управления экспертизы

С.Е. Аверкиев

ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ
(дополнительный лист)

Номер евразийской заявки:

202490247

КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ (продолжение графы А)

МПК:

C12N 15/63 (2006.01)
C12N 15/79 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)

СПК:

C12N 15/79
C12N 15/09
C12N 15/1051
C07K 16/00
C12N 2015/8518