

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202193224** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2022.04.25

(22) Дата подачи заявки
2020.03.23

(51) Int. Cl. **C12N 15/86** (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)

(54) **ОТКРЫТИЕ ЛИГАНДА И ДОСТАВКА ГЕНА ПОСРЕДСТВОМ РЕТРОВИРУСНОГО
ПОВЕРХНОСТНОГО ДИСПЛЕЯ**

(31) **62/851,889**

(32) **2019.05.23**

(33) **US**

(86) **PCT/US2020/024175**

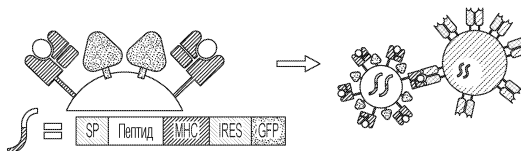
(87) **WO 2020/236263 2020.11.26**

(71) Заявитель:
**МАССАЧУСЕТС ИНСТИТУТ ОФ
ТЕКНОЛОДЖИ (US)**

(72) Изобретатель:
Бирнбаум Майкл, Добсон Коннор (US)

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

(57) В настоящем документе раскрыты композиции ретровирусов и способы их применения для доставки генов, где ретровирусы включают вирусный белок оболочки, включающий по меньшей мере одну мутацию, которая снижает его нативную функцию, невирусный мембраносвязанный белок, содержащий мембраносвязанный домен и внеклеточный целевой домен.



202193224

A1

A1

202193224

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-571819EA/55

ОТКРЫТИЕ ЛИГАНДА И ДОСТАВКА ГЕНА ПОСРЕДСТВОМ РЕТРОВИРУСНОГО ПОВЕРХНОСТНОГО ДИСПЛЕЯ

РОДСТВЕННАЯ ЗАЯВКА

Настоящая заявка испрашивает преимущества согласно Статье 35 §119(e) Кодекса США по дате подачи предварительной заявки на патент США 62/851,889 под заголовком "LIGAND DISCOVERY AND GENE DELIVERY VIA RETROVIRAL SURFACE DISPLAY", поданной 23 мая 2019 года, все содержание которой включено в настоящий документ посредством отсылки.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Хорошо известно, что естественный тропизм ретровирусов (например, лентивирусов) может быть перенаправлен в отношении представляющих интерес мишеней посредством псевдотипирования вируса для экспрессии белка оболочки другого вируса. Чаще всего это достигается с помощью псевдотипирования гликопротеином ВВС, который направленно взаимодействует с рецептором ЛПНП и, таким образом, обеспечивает проникновение вируса в широкий спектр клеток. Недавно рабочие группы показали, что если лентивирусы псевдотипированы белками оболочки парамиксовирусов, таких как вирус кори или вирус Нипах, и если созданы мутации, устраняющие природный тропизм, то тогда С-концевые слияния с этими вирусами обеспечивают рецепторно-опосредованное проникновение в выбранную клетку-мишень.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В настоящем документе авторы изобретения неожиданно продемонстрировали, что комбинация мутаций, устраняющих нативную функцию (например, тропизм) и сверхэкспрессию второго мембранного белка позволяет функционировать такому второму белку, обеспечивая базис для проникновения вируса. Эти открытия, как описано в настоящем документе, дают новые и инновационные методологии, например, для скрининга клеток, которые, как известно, сложно исследовать на предмет специфических антигенов и функцию (например, Т-клетки), и доставки нуклеиновых кислот в клетки-мишени мишень-специфическим образом.

В некоторых аспектах изобретения предложены композиции ретровируса (например, лентивируса), включающие: (i) нуклеиновую кислоту, включающую невирусный мембраносвязанный белок, включающий структуру: S-ETD-MBD-IRES-R, где S кодирует сигнальную последовательность, ETD кодирует внеклеточный направляющий домен; MBD кодирует мембраносвязанный домен, IRES кодирует участок внутренний посадки рибосомы, и R кодирует репортер; и (ii) мутантный белок оболочки вируса, включающий по меньшей мере одну мутацию, которая снижает его нативную функцию.

В некоторых аспектах изобретения предложены композиции ретровируса (например, лентивирус), включающие: (i) домен белка CD80; и (ii) мутантный вирусный белок оболочки, включающий по меньшей мере одну мутацию, которая снижает его

нативную функцию. Домен белка CD80 может быть внеклеточным доменом. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный домен CD80 связывается с рецептором на клетке-мишени.

В некоторых аспектах изобретения предложены способы скрининга популяции клеток, где способ включает: (i) получение ретровируса (например, лентивируса), включающего вирусный белок оболочки, включающий по меньшей мере одну мутацию, которая снижает его нативную функцию, невирусный мембраносвязанный белок, включающий мембраносвязанный домен и внеклеточный направляющий домен, и нуклеиновую кислоту, кодирующую репортер; (ii) объединение ретровируса с популяцией клеток; и (iii) сортировку популяции клеток на присутствие или отсутствие репортера. В некоторых вариантах осуществления ретровирус (например, лентивирус) включает нуклеиновую кислоту, включающую невирусный мембраносвязанный белок, включающий структуру: S-ETD-MBD-IRES-R, где S кодирует сигнальную последовательность, ETD кодирует внеклеточный направляющий домен; MBD кодирует мембраносвязанный домен, IRES кодирует участок внутренней посадки рибосомы, и R кодирует репортер.

В некоторых вариантах осуществления клетки являются соматическими клетками (например, антигенспецифическими клетками, например, Т-клетки или В-клетки). В некоторых вариантах осуществления клетки выделены у субъекта (например, субъекта-человека). В некоторых вариантах осуществления клетки выделены из крови или опухоли субъекта. В некоторых вариантах осуществления клетки поддерживают в жидкой культуре до объединения с ретровирусом.

В некоторых вариантах осуществления вирусный белок оболочки представляет собой G-белок оболочки BBC (VSV-G), белок оболочки вируса кори, белок оболочки вируса Нипах или G-белок вируса Кокал. G-белок оболочки BBC может содержать мутацию в одном или больше из H8, K47, Y209 и/или R354. Белок оболочки вируса кори может содержать мутацию в одном или больше из Y481, R533, S548 и/или F549. Белок оболочки вируса Нипах может содержать мутацию в одном или больше из E501, W504, Q530 и/или E533. G-белок вируса Кокал может содержать мутацию в K64 и/или R371.

В некоторых вариантах осуществления невирусный мембраносвязанный белок включает белок главного комплекса гистосовместимости (МНС). В некоторых вариантах осуществления внеклеточный направляющий домен представляет собой белок (например, интерлейкин-13), пептид или антитело (например, антитело против CD19, антитело против TCR или антитело против CD3). В некоторых вариантах осуществления репортер представляет собой флуоресцентный белок (например, зеленый флуоресцентный белок, желтый флуоресцентный белок, красный флуоресцентный белок) или маркер устойчивости к антибиотику. В некоторых вариантах осуществления линкер расположен между мембраносвязанным доменом и внеклеточным направляющим доменом. Линкер может быть жестким линкером (например, стеблем PDGFR или стеблем CD8 α), гибким линкером (например, включающим аминокислотную последовательность, включающую

GAPGAS (SEQ ID NO: 5) или GGGGS (SEQ ID NO: 7)), или олигомеризованным линкером (например, шарнирной областью IgG4 или аминокислотной последовательностью, которая может образовывать тетрамерную суперспираль).

В некоторых вариантах осуществления ретровирус объединяют с популяцией клеток в (ii) на время от одной минуты до семидесяти двух часов и при температуре в пределах от 4°C до 42°C. В некоторых вариантах осуществления ретровирус и популяцию клеток объединяют в (ii) в присутствии: (a) среды для культивирования клеток, необязательно среды для культивирования клеток RPMI или DMEM; (b) забуференного солевого раствора, необязательно фосфатно-солевого буферного раствора или забуференного HEPES солевого раствора; и/или (c) усилителя ретровирусной трансдукции, необязательно гепарина сульфата, полибрена, протамина сульфата и/или декстрана. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный направляющий домен способен связываться с когнатным белком (например, белковым рецептором), который присутствует на поверхности клеток в субпопуляции клеток. В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток промывают между (ii) и (iii) (например, с использованием фосфатно-солевого буферного раствора (PBS), например, для удаления ретровируса из популяции клеток). В некоторых вариантах осуществления сортировку популяции клеток проводят с помощью сортировки клеток с активированной флуоресценцией, секвенирования следующего поколения одиночных клеток или отбора с антибиотиком.

В некоторых вариантах осуществления способы дополнительно включают второй ретровирус, где второй ретровирус включает другой внеклеточный направляющий домен и/или другой репортер по сравнению с первым ретровирусом.

В других аспектах изобретения предложены способы доставки нуклеиновой кислоты (например, целевой ген, например, который кодирует белок) в клетку, где способ включает: (i) получение ретровируса, включающего нуклеиновую кислоту, вирусный белок оболочки, включающий по меньшей мере одну мутацию, которая снижает его нативную функцию, и невирусный мембраносвязанный белок, включающий внеклеточный направляющий домен, который способен к связыванию с когнатным лигандом клетки; и (ii) контакт ретровируса с клеткой, с доставкой нуклеиновой кислоты в клетку. В некоторых вариантах осуществления ретровирус проникает или инфицирует клетку во время (ii).

В некоторых аспектах изобретения предложены способы доставки нуклеиновой кислоты в клетку, где способ включает: (i) получение ретровируса, включающего нуклеиновую кислоту, вирусный белок оболочки, включающий по меньшей мере одну мутацию, которая снижает его нативную функцию, и домен белка CD80; и (ii) контакт ретровируса с клеткой, с доставкой нуклеиновой кислоты в клетку.

В других аспектах изобретения предложены способы обнаружения взаимодействия между ретровирусом и клеткой, где способ включает: (i) контакт образца, включающего ретровирус и клетку, с антителом, где ретровирус включает вирусный белок оболочки,

включающий по меньшей мере одну мутацию, которая снижает его нативную функцию, невирусный мембраносвязанный белок, включающий внеклеточный направляющий домен, и где антитело связывается с внеклеточным направляющим доменом ретровируса; (ii) необязательно, удаление несвязавшегося антитела из образца; и (iii) визуализацию образца для обнаружения, связался ли комплекс антитела-ретровируса с клеткой.

В некоторых вариантах осуществления антитело дополнительно включает флуоресцентную метку, необязательно, где антитело ковалентно связано с флуоресцентной меткой. В некоторых вариантах осуществления образец визуализируют в (iii) с помощью конфокальной или флуоресцентной микроскопии.

В некоторых аспектах изобретения предложены библиотеки ретровирусов, включающие множество уникальных ретровирусов, где каждый уникальный ретровирус включает вирусный белок оболочки, включающий по меньшей мере одну мутацию, которая уменьшает ее нативную функцию, невирусный мембраносвязанный белок, включающий мембраносвязанный домен и внеклеточный направляющий домен (например, включающий по меньшей мере 5, по меньшей мере 10, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20 или по меньшей мере 50 аминокислот), и нуклеиновую кислоту, кодирующую репортер, и где каждый уникальный ретровирус включает другой и уникальный внеклеточный направляющий домен.

В некоторых вариантах осуществления библиотека может быть подвергнута скринингу против популяции антигенспецифических клеток, необязательно, где антигенспецифические клетки представляют собой В-клетки или Т-клетки. Библиотека может включать по меньшей мере 10^2 , по меньшей мере 10^3 , по меньшей мере 10^4 , по меньшей мере 10^5 , по меньшей мере 10^6 , по меньшей мере 10^7 , по меньшей мере 10^8 , по меньшей мере 10^9 или по меньшей мере 10^{10} уникальных ретровирусов. В некоторых вариантах осуществления каждый другой и уникальный внеклеточный направляющий домен создан с помощью сайт-направленного мутагенеза.

В некоторых аспектах изобретения предложены популяции клеток, где субпопуляция клеток содержит ретровирус, включающий: вирусный белок оболочки, включающий по меньшей мере одну мутацию, которая снижает его нативную функцию, невирусный мембраносвязанный белок, включающий мембраносвязанный домен и внеклеточный направляющий домен, и нуклеиновую кислоту, кодирующую репортер. В некоторых вариантах осуществления субпопуляция клеток (например, антигенспецифических клеток, например, В-клеток или Т-клеток) содержит ретровирус, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления субпопуляция клеток содержит ретровирус внутри каждой клетки субпопуляции. Субпопуляция, которая содержит ретровирус, может быть выделена и/или отсортирована от клеток популяции, которые не содержат ретровирус.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

На **ФИГ. 1** представлена иллюстративная схема взаимодействия ретровируса согласно настоящему изобретению с когнатым лигандом клетки-мишени.

На **ФИГ. 2** представлена иллюстративная схема белка, включающего сигнальную последовательность (SP), внеклеточный направляющий домен (пептид), мембраносвязанный домен (МНС), участок внутренней посадки рибосомы (IRES) и репортер (GFP); и способность ретровируса, включающего указанный белок, взаимодействовать с клеткой-мишенью.

На **ФИГ. 3А-3В** представлены графики, на которых показано проникновение ретровируса в клетку-мишень. На **ФИГ. 3А** продемонстрировано, что связывающее взаимодействие внеклеточного направляющего домена, присутствующего в ретровирусе, с когнатным лигандом клетки-мишени приводит к проникновению ретровируса и последующей экспрессии репортера (GFP). На **ФИГ. 3В** продемонстрировано, что контакт ретровируса с нецелевой клеткой не приводит к проникновению ретровируса.

На **ФИГ. 4** представлены графики, на которых показана способность ретровируса проникать в клетки-мишени при различной аффинности между внеклеточным направляющим доменом и его когнатным лигандом.

На **ФИГ. 5А-5В** представлены графики, на которых показано, что Т-клеточная сигнализация активна во время ретровирусного проникновения или инфекции. На **ФИГ. 5А** продемонстрировано, что связывающее взаимодействие внеклеточного направляющего домена, присутствующего в ретровирусе, с когнатным лигандом клетки-мишени приводит к проникновению ретровируса и активации Т-клеточной сигнализации. На **ФИГ. 5В** продемонстрировано, что контакт ретровируса с нецелевой клеткой не приводит к проникновению ретровируса или активации Т-клеточной сигнализации.

На **ФИГ. 6** представлена иллюстративная схема методики скрининга ретровирусной библиотеки рМНС.

На **ФИГ. 7А-7В** представлены графики, на которых показано проникновение ретровируса в клетку-мишень. На **ФИГ. 7А** продемонстрировано, что связывающее взаимодействие домена белка интерлейкина-13 (IL-13), присутствующего в ретровирусе, с рецептором белка IL-13 клетки-мишени приводит к проникновению ретровируса и последующей экспрессии репортера (GFP). **ФИГ. 7В** демонстрирует, что контакт ретровируса, включающего домен белка IL-13, с нецелевой клеткой, которая не экспрессирует рецептор белка IL-13, не приводит к проникновению ретровируса.

На **ФИГ. 8** представлены три примерных ретровируса, каждый из которых включает разные вирусные белки оболочки.

На **ФИГ. 9** показана способность ретровируса, включающего белок оболочки вируса Нипах и scFv-антитело против CD19, инфицировать и проникать в CD19⁺ клетки Raji.

На **ФИГ. 10** показана способность ретровируса, включающего мутантный G-белок оболочки вируса ВВС и scFv-антитело против CD19, инфицировать и проникать в CD19⁺ клетки Raji, не инфицируя CD19⁻ клетки Jurkat. Ретровирус, включающий G-белок оболочки вируса ВВС дикого типа и scFv-антитело против CD19, инфицирует и CD19⁺ клетки Raji, и CD19⁻ клетки Jurkat.

На **ФИГ. 11** показаны иллюстративные линкеры для применения в нуклеиновых кислотах и белках, включающих мембраносвязанные и внеклеточные направляющие домены.

На **ФИГ. 12** представлены графики, на которых показано влияние коротких белковых линкеров (PDGFR; GAPGAS (SEQ ID NO: 5); CAR ECD; наверху, слева направо) и длинных белковых линкеров (CD8 α ; шарнирный домен; тетрамерная суперспираль; внизу, слева направо) на проникновение ретровируса.

На **ФИГ. 13** представлены графики, на которых показано, что ретровирусы, включающие мутантные G-белки оболочки вируса ВВС активируют Т-клеточную сигнализацию (правая панель), и что ретровирусы, включающие G-белки оболочки вируса ВВС дикого типа, не активируют Т-клеточную сигнализацию (левая панель), как определено по экспрессии CD69.

На **ФИГ. 14** представлены графики, на которых показано, что ретровирусы, имеющие разную аффинность между своими внеклеточными направляющими доменами и Т-клеточным когнатным лигандом, способны активировать Т-клеточную сигнализацию.

На **ФИГ. 15** представлены графики, на которых показана способность ретровируса проникать в клетки-мишени при разной аффинности, от пикомолярной до микромолярной аффинности связывания, между внеклеточным направляющим доменом и его когнатным лигандом.

На **ФИГ. 16А-16В** представлены графики, демонстрирующие способность ретровируса проникать в клетки-мишени при разных концентрациях вируса. На **ФИГ. 16А** показана способность NYESO-1-экспонирующих лентивирусов трансдуцировать IG4-экспрессирующие Т-клетки. SL-1-экспонирующие лентивирусы не трансдуцируют IG4-экспрессирующие Т-клетки. На **ФИГ. 16В** показана средняя флуоресценция, вызванная взаимодействием между NYESO-1-экспонирующими лентивирусами и IG4-экспрессирующими Т-клетками.

На **ФИГ. 17** представлен график, демонстрирующий влияние олигомеризации белкового линкера на ретровирусную трансдукцию.

На **ФИГ. 18А-18В** показана способность обнаруживать связывающее взаимодействие между ретровирусом, включающим scFv-антитело против CD19, и клеткой-мишенью, включающей CD19, с помощью флуоресцентно-меченного антитела, которое связывается с ретровирусом. На **ФИГ. 18А** показана иллюстративная схема связывания. На **ФИГ. 18В** представлены графики, на которых показана способность ретровирусных конструкций взаимодействовать с клеткой-мишенью.

На **ФИГ. 19** показана способность лентивирусов, экспонирующих пептид SL9, трансдуцировать 868 TCR-экспрессирующие Т-клетки ('868') и способность лентивирусов, экспонирующих пептид NLV ЦМВ, трансдуцировать С7 TCR-экспрессирующие Т-клетки ('ЦМВ С7').

На **ФИГ. 20** показана способность NYESO-1-экспонирующих лентивирусов селективно трансдуцировать Т-клетки (клетки-мишени), экспрессирующие вариант IG4 Т-

клеточного рецептора (TCR) (аффинности связывания ~26 пМ или ~32 мкМ с NYESO-1), по сравнению клетками, не экспрессирующими IG4 TCR (нецелевыми) при соотношениях нецелевых клеток к клеткам-мишеням до 100000:1.

На **ФИГ. 21** показана способность лентивирусов, экспонирующих различные направляющих пептидов (NLV ЦМВ; ВЭБ; SL9; GL9; NYESO-1), селективно трансдуцировать Т-клетки, которые экспрессируют специфические к направляющему пептиду TCR-рецепторы (целевые), по сравнению с Т-клетками, которые не экспрессируют специфические к направляющему пептиду TCR-рецепторы (нецелевые).

На **ФИГ. 22А-22В** показана способность различных лентивирусов (направляющих пептид GL9; направляющих пептид NYESO-1; BBC дикого типа) трансдуцировать первичные Т-клетки, которые экспрессируют GL9-специфические TCR-рецепторы, и Т-клетки, которые экспрессируют вариант TCR IG4. На **ФИГ. 22А** показан уровень трансдукции для каждого лентивируса. На **ФИГ. 22В** представлены графики, на которых показаны данные FACS для вируса GL9 и вируса NYESO-1.

На **ФИГ. 23** представлены графики, на которых показано, что первичные NYESO-1-реактивные клетки специфично инфицированы.

На **ФИГ. 24** представлены графики, на которых показано, что NYESO-1-направленный вирус специфично инфицирует размноженные первичные клетки.

На **ФИГ. 25** представлены графики, на которых показана способность ретровируса, включающего мутантный G-белок оболочки вируса BBC и домен CD80, специфично инфицировать Т-клетки Jurkat по сравнению с линией В-клеток.

На **ФИГ. 26** показана способность ретровирусов, включающих мутантный G-белок оболочки вируса BBC и/или антитело против TCR-альфа бета (H57) или антитело против CD3 (C11), инфицировать TCR-трансдуцированные линии мышиных клеток 58/-.

На **ФИГ. 27** показана способность ретровируса, включающего либо мутантный G-белок оболочки вируса BBC, либо мутантный белок оболочки вируса Кокал; и scFv-антитело против CD19, инфицировать и проникать в CD19⁺ клетки Raji, не инфицируя клетки CD19⁻ Jurkat. Ретровирус, включающий G-белок оболочки вируса BBC дикого типа и scFv-антитело против CD19, инфицирует и CD19⁺ клетки Raji, и CD19⁻ клетки Jurkat.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В настоящем документе представлены новые и инновационные способы, например, скрининга клеток, которые, как известно, сложно отбирать по специфическим антигенам и функциям (например, Т-клетки), и доставки нуклеиновых кислот в клетки-мишени мишень-специфическим образом. В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе описаны системы, которые позволяют, например, проводить анализ специфичности пептида Т-клеточного рецептора (TCR)-Главного комплекса гистосовместимости (рМНС) в масштабе репертуара, ранее труднопреодолимого ограничивающего условия, поскольку описанные ранее способы требовали значительных усилий для определения, что может распознавать один Т-клеточный клон (например, как при типичном иммунном ответе). В некоторых вариантах осуществления в настоящем

документе описаны системы на основе ретровирусов, в которых вирусный тропизм перенаправляют в качестве способа отбора молекулярных взаимодействий и замены связывающих функций поверхностных белков вируса дикого типа связывающими функциями представляющих интерес вариантов белков, например, при кодировании этих вариантов белков на соответствующей трансферной плазмиде, используемой для создания вируса, гарантируя, таким образом, что полученный вирус будет экспонировать вариант белка на своей поверхности, и обеспечивая упаковку соответствующей генетической последовательности. Таким образом, когда вирус проникает в клетку-мишень (например, несущую рецептор, который связывает экспонируемый внеклеточный направляющий домен варианта белка), проникновение в клетку приводит к интеграции генетической последовательности экспонируемого белка в геном клетки-мишени.

Предыдущие подходы к исследованию специфичности Т-клеток требовали комбинации созданных линий Т-клеток, рекомбинантной экспрессии рецепторов Т-клеток и/или индивидуальной проверки связывания или активности Т-клеток с помощью подхода на основе кандидатных антигенов. Каждый из этих элементов накладывал неотъемлемое ограничение на производительность скрининга Т-клеток или антигенов. Например, основанные на дрожжевом дисплее методы деорфанизации Т-клеточных рецепторов облегчали ограничения по количеству исследуемых антигенов (с возможностью скрининга $>10^8$ лигандов), но все еще были сильно ограничены необходимостью рекомбинантно экспрессировать TCR-рецепторы. Текущие стратегии настоящего изобретения, описанные в настоящем документе, представляют колоссальные успехи в изучении специфичности Т-клеток и скрининге Т-клеток, позволяя проводить скрининг $>10^8$ лигандов без необходимости в экспрессии рекомбинантных TCR.

Ретровирусы

В настоящем документе описаны ретровирусы, включающие вирусный белок оболочки, включающий по меньшей мере одну мутацию, которая снижает его нативную функцию, невирусный мембраносвязанный белок, включающий мембраносвязанный домен и внеклеточный направляющий домен, и нуклеиновую кислоту, кодирующую репортер. В некоторых вариантах осуществления ретровирус включает вирусный белок оболочки, включающий по меньшей мере одну мутацию, которая снижает его нативную функцию, и невирусный мембраносвязанный белок, включающий мембраносвязанный домен и внеклеточный направляющий домен.

Ретровирус, раскрытый в настоящий документ, включает один или больше элементов, происходящих из ретровирусного генома (природного или модифицированного) подходящего вида. Ретровирусы включают 7 семейств: альфаретровирус (вирус лейкоза птиц), бетаретровирус (вирус опухоли молочной железы мышей), гаммаретровирус (вирус лейкоза мышей), дельтаретровирус (вирус лейкоза коров), эпсилонретровирус (вирус дермальной саркомы судака), лентивирус (вирус иммунодефицита человека 1) и спумавирус (спумавирус человека). Шесть дополнительных примеров ретровирусов представлены в патенте США 7,901,671.

В некоторых вариантах осуществления ретровирус является лентивирусом. Лентивирус - род ретровирусов, который обычно вызывает медленно развивающиеся заболевания из-за их способности встраиваться в геном хозяина. Модифицированные лентивирусные геномы можно использовать в качестве вирусных векторов для доставки нуклеиновых кислот в клетку-хозяина. Клетки-хозяева можно трансфицировать лентивирусными векторами и, необязательно, дополнительными векторами для экспрессии лентивирусных упаковывающих белков (например, VSV-G, Rev и Gag/Pol) с получением лентивирусных частиц в культуральной среде.

Ретровирусные и лентивирусные конструкции известны в уровне техники, и любой подходящий ретровирус может использоваться для конструирования ретровируса (или множества или библиотеки ретровирусов), как описано в настоящем документе. Неограничивающие примеры ретровирусных конструкций включают лентивирусные векторы, вектор на основе вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), вектор на основе вируса лейкоза птиц (ALV), вектор на основе вируса лейкоза мышей (MLV), вектор на основе вируса опухоли молочной железы мышей (MMTV), вектор на основе вируса стволовых клеток мышей и вируса Т-клеточного лейкоза человека (HTLV). Эти ретровирусные конструкции содержат провирусные последовательности соответствующего ретровируса.

Ретровирус, описанный в настоящем документе, может содержать вирусные элементы, такие как описанные в настоящем документе, из одного или больше подходящих ретровирусов, которые представляют собой РНК-вирусы с одноцепочечной положительно-смысловой молекулой РНК. Ретровирусы включают фермент обратную транскриптазу и фермент интегразу. При попадании в клетку-мишень ретровирусы используют свою обратную транскриптазу для транскрипции своей молекулы РНК в молекулу ДНК. Впоследствии фермент интегразы используется для интеграции молекулы ДНК в геном клетки-хозяина. После интеграции в геном клетки-хозяина последовательность ретровируса называется провирусом (например, провирусной последовательностью или последовательностью провируса). Описанные в настоящем документе ретровирусные векторы могут также содержать дополнительные функциональные элементы, известные в данной области, для решения проблем безопасности и/или для улучшения функций вектора, таких как эффективность упаковки и/или титр вируса. Дополнительную информацию можно найти в заявках US 20150316511 и WO2015/117027, соответствующие описания каждой из которых включены в настоящий документ посредством отсылки в отношении цели и объекта, указанных в настоящем документе. Дополнительную информацию о лентивирусах можно найти, например, в WO2019/056015, соответствующее описание которой включено в настоящий документ посредством отсылки для этой конкретной цели.

В некоторых вариантах осуществления лентивирусы могут быть направлены на мишеньспецифические клетки посредством взаимодействия pMHC-TCR или любого другого белок-белкового межклеточного взаимодействия. В некоторых вариантах

осуществления Т-клетки с известной и релевантной специфичностью могут быть улучшены (в случае рака или инфекции) или элиминированы (в случае аутоиммунитета) без воздействия на другие Т-клетки, что резко ограничивает риск нецелевых эффектов. В некоторых вариантах осуществления лентивирусы могут кодировать внеклеточный домен для направленного взаимодействия с любой другой молекулой, экспрессируемой на поверхности клетки-мишени.

Вирусный белок оболочки

Ретровирусы, описанные в настоящем документе, включают вирусный белок оболочки, включающий по меньшей мере одну мутацию, которая снижает его нативную функцию (например, функцию дикого типа немутантного вирусного белка оболочки). В некоторых вариантах осуществления вирусный белок оболочки является любым вирусным белком оболочки любого ретровируса (например, лентивируса). Вирусный белок оболочки может быть белком оболочки VSV-G, белком оболочки вируса кори, белком оболочки вируса Нипах или G-белком вируса Кокал. В некоторых вариантах осуществления нативная функция, снижаемая в результате мутации вирусного белка оболочки, является вирусным тропизмом (например, способность инфицировать клетки, связываться с клетками и т.д.)

В некоторых вариантах осуществления вирусный белок оболочки, включающий по меньшей мере одну мутацию, которая снижает его нативную функцию, является мутантным белком оболочки VSV-G. В некоторых вариантах осуществления вирусный белок оболочки, включающий по меньшей мере одну мутацию, которая снижает его нативную функцию, является мутантным белком оболочки вируса кори. В некоторых вариантах осуществления вирусный белок оболочки, включающий по меньшей мере одну мутацию, которая снижает его нативную функцию, является мутантным белком оболочки вируса Нипах. В некоторых вариантах осуществления вирусный белок оболочки, включающий по меньшей мере одну мутацию, которая снижает его нативную функцию, является мутантным G-белком вируса Кокал.

В некоторых вариантах осуществления мутантный белок оболочки VSV-G включает мутацию в H8, K47, Y209 и/или R354. В некоторых вариантах осуществления мутантный белок оболочки VSV-G включает H8A, K47A, K47Q, Y209A, R354A и/или мутацию R354Q. В некоторых вариантах осуществления мутантный белок оболочки VSV-G является таким, как описано в публикации Nikolic et al., "Structural basis for the recognition of LDL-receptor family members by VSV glycoprotein", Nature Comm., 2018, 9:1029, соответствующее содержание которой включено посредством отсылки в настоящий документ для этой конкретной цели.

В некоторых вариантах осуществления мутантный вирусный белок оболочки кори включает мутацию в положениях Y481, R533, S548 и/или F549. В некоторых вариантах осуществления мутантный вирусный белок оболочки кори включает мутацию Y481A, R533A, S548L и/или F549S.

В некоторых вариантах осуществления мутантный вирусный белок оболочки

Нипах включает мутацию в положениях E501, W504, Q530 и/или E533. В некоторых вариантах осуществления мутантный вирусный белок оболочки кори включает мутацию E501A, W504A, Q530A и/или E533A.

В некоторых вариантах осуществления мутантный G-белок вируса Кокал включает мутацию в положениях K64 и/или R371. В некоторых вариантах осуществления мутантный G-белок вируса Кокал включает мутацию K64Q и/или R371A.

В некоторых вариантах осуществления мутантный белок оболочки происходит из любого другого оболочечного вируса, в том числе, без ограничения перечисленными, бакуловируса, вируса простого герпеса (ВПГ), цитомегаловируса (ЦМВ), вируса лимфоцитарного хориоменингита (ВЛХМ), вируса Эпштейна-Барр (ВЭБ), вируса осповакцины, вируса гепатита А, В или С, вируса осповакцины, альфавируса, вируса денге, вируса желтой лихорадки, вируса Зика, вируса гриппа, хантавируса, вируса Эбола, вируса бешенства, вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), коронавируса и других рабдовирусов.

В некоторых вариантах осуществления вирусный белок оболочки, включающий по меньшей мере одну мутацию, включает 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или больше мутаций. В некоторых вариантах осуществления вирусный белок оболочки, включающий по меньшей мере одну мутацию, включает нуклеотидную последовательность и/или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или 97% идентична вирусному белку оболочки дикого типа. В некоторых вариантах осуществления вирусный белок оболочки, включающий по меньшей мере одну мутацию, которая снижает его нативную функцию, сохраняет меньше чем 95%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20% или 10% функции вирусному белку оболочки дикого типа. В некоторых вариантах осуществления вирусный белок оболочки, включающий по меньшей мере одну мутацию, полностью лишен всей своей нативной функции. В некоторых вариантах осуществления ретровирус, включающий вирусный белок оболочки, включающий по меньшей мере одну мутацию, которая снижает его нативную функцию, включает меньше чем 95%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20% или 10% клеточной инфекционности ретровируса, включающего вирусный белок оболочки дикого типа.

Невирусный мембраносвязанный белок

Ретровирусы, описанные в настоящем документе, включают невирусный мембраносвязанный белок. Невирусный мембраносвязанный белок может включать мембраносвязанный домен и внеклеточный направляющий домен. В некоторых вариантах осуществления невирусный мембраносвязанный белок является химерным белком, включающим последовательности по меньшей мере из двух разных белков. В некоторых вариантах осуществления невирусный мембраносвязанный белок является полноразмерным или усеченным белком, включающим последовательность из одного белка.

Мембраносвязанный домен является белком или пептидом, который имеет аминокислотную последовательность, которая позволяет белку или пептиду быть

полностью или частично заключенным или ассоциированным с мембраной (например, оболочкой) ретровируса. В некоторых вариантах осуществления мембраносвязанный домен обеспечивает презентирование и доставку внеклеточного направляющего домена во внеклеточную среду. В некоторых вариантах осуществления мембраносвязанный домен включает внутриклеточный домен, трансмембранный домен и/или внеклеточный домен. В некоторых вариантах осуществления мембраносвязанный домен включает внутриклеточный домен и трансмембранный домен. В некоторых вариантах осуществления мембраносвязанный домен включает белок главного комплекса гистосовместимости (МНС) или его фрагмент. Белок МНС может быть белком МНС Класса I или Класса II.

В некоторых вариантах осуществления мембраносвязанный домен включает 10-50, 10-100, 25-100, 50-200, 50-150, 100-500, 100-250, 250-500 или любое соответствующее количество всех аминокислот.

В некоторых вариантах осуществления ретровирус, присутствующий в библиотеке ретровирусов, включает такой же мембраносвязанный домен, как некоторые или все остальные ретровирусы в библиотеке. В некоторых вариантах осуществления каждый ретровирус, присутствующий в библиотеке ретровирусов, включает другой мембраносвязанный домен по сравнению с некоторыми или всеми остальными ретровирусами в библиотеке.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный направляющий домен является любым белком или пептидом, который имеет аминокислотную последовательность и является партнером по связыванию для молекулы-мишени или лиганда (например, когнатного белка) на клеточной поверхности. В случае присутствия во внеклеточной среде за пределами внутреннего пространства ретровируса, внеклеточный направляющий домен способен связываться с клеткой-мишенью. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный направляющий домен связывается или взаимодействует с когнатным белком или лигандом (например, белковым рецептором, присутствующим на клетке-мишени), который присутствует на клеточной поверхности клетки или субпопуляции клеток. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный направляющий домен связывается с когнатным белком или лигандом, который присутствует на клеточной поверхности одной Т-клетки или субпопуляции Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления связывающее взаимодействие между внеклеточным направляющим доменом ретровируса и когнатным белком или лигандом клетки позволяет ретровирусу проникать в клетку (например, в антигенспецифическую клетку, например, Т-клетку).

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный направляющий домен включает 10-50, 10-100, 25-100, 50-200, 50-150, 100-500, 100-250, 250-500 или любое соответствующее количество всех аминокислот. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный направляющий домен включает по меньшей мере 5, по меньшей мере 10, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20 или по меньшей мере 50 аминокислот.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный направляющий домен является белком, антителом или пептидом. В некоторых вариантах осуществления антитело является полноразмерным антителом, фрагментом антитела, нанотелом или одноцепочечным антителом (scFv). В некоторых вариантах осуществления внеклеточный направляющий домен является антителом, которое связывается с когнатным белком клетки-мишени. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный направляющий домен является антителом, которое связывается с антигеном В-клетки или Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный направляющий домен является антителом против CD19 (например, антителом, которое связывается с CD19). В некоторых вариантах осуществления внеклеточный направляющий домен является антителом, которое связывается с любой молекулой клеточной поверхности. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный направляющий домен является антителом, которое связывается с линией специфического маркера (например, CD3, CD20, интегринами или другими рецепторами), фенотипическими маркерами (PD-1, CD25, CD45 или другими). В некоторых вариантах осуществления внеклеточный направляющий домен является белком или пептидом, который связывается с рецептором (например, рецептором, присутствующим на поверхности клетки-мишени). В некоторых вариантах осуществления внеклеточный направляющий домен является белком или пептидом, который связывается с цитокиновым рецептором (например, рецептором интерлейкина-13 (IL-13)). В некоторых вариантах осуществления внеклеточный направляющий домен является цитокином (например, IL-2, IL-6, IL-12, IL-13). В некоторых вариантах осуществления внеклеточный направляющий домен является хемокиновым лигандом (например, CXCL9, CXCL10, CXCL11 и т.д.). В некоторых вариантах осуществления внеклеточный направляющий домен является клеточным рецептором, включающим цитокиновые рецепторы (например, IL-13R α 1, IL-13R α 2, рецепторы IL-2, общую гамма-цепь), GPCR-рецепторы (включая хемокиновые рецепторы, такие как CCR3, CXCR4 и т.д.) и интегрины. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный направляющий домен является пептидом, экспонируемым белком МНС. В некоторых вариантах осуществления невирусный мембраносвязанный белок включает мембраносвязанный домен, включающий белок МНС или фрагмент, и внеклеточный направляющий домен, включающий пептид, экспонируемый белком МНС. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный домен связывается с Т-клеточным рецептором и/или В-клеточным рецептором. Т-клеточные рецепторы обычно экспрессируются в природе на поверхности Т-клеток как альфа/бета и гамма/дельта гетеродимерные интегральные мембранные белки, причем каждая субъединица включает короткий внутриклеточный сегмент, одну трансмембранную альфа-спираль и два глобулярных внеклеточных домена Ig-суперсемейства. В-клеточные рецепторы представляют собой трансмембранные рецепторные белки, расположенные на наружной поверхности В-клеток.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный направляющий домен связывается с клеткой-мишенью или молекулой клеточной поверхности с аффинностью

связывания от 10^{-9} до 10^{-8} М, от 10^{-8} до 10^{-7} М, от 10^{-7} до 10^{-6} М, от 10^{-6} до 10^{-5} М, от 10^{-5} до 10^{-4} М, от 10^{-4} до 10^{-3} М или от 10^{-3} до 10^{-2} М. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный направляющий домен связывается с когнатным белком или лигандом клетки-мишени с аффинностью связывания от 10^{-9} до 10^{-8} М, от 10^{-8} до 10^{-7} М, от 10^{-7} до 10^{-6} М, от 10^{-6} до 10^{-5} М, от 10^{-5} до 10^{-4} М, от 10^{-4} до 10^{-3} М или от 10^{-3} до 10^{-2} М. В некоторых вариантах осуществления аффинность связывания между внеклеточным направляющим доменом и когнатным белком или лигандом находится в диапазоне от пикомолярного до наномолярного (например, от приблизительно 10^{-12} до приблизительно 10^{-9} М). В некоторых вариантах осуществления, аффинность связывания между внеклеточным направляющим доменом и когнатным белком или лигандом находится в диапазоне от наномолярного до микромолярного (например, от приблизительно 10^{-9} до приблизительно 10^{-6} М). В некоторых вариантах осуществления, аффинность связывания между внеклеточным направляющим доменом и когнатным белком или лигандом находится в диапазоне от микромолярного до миллимолярного (например, от приблизительно 10^{-6} до приблизительно 10^{-3} М). В некоторых вариантах осуществления, аффинность связывания между внеклеточным направляющим доменом и когнатным белком или лигандом находится в диапазоне от пикомолярного до микромолярного (например, от приблизительно 10^{-12} и приблизительно 10^{-6} М). В некоторых вариантах осуществления аффинность связывания между внеклеточным направляющим доменом и когнатным белком или лигандом находится в диапазоне от наномолярного до миллимолярного (например, от приблизительно 10^{-9} до приблизительно 10^{-3} М).

При использовании в настоящем документе термин антитело обычно относится к белку, включающему по меньшей мере один переменный домен иммуноглобулина или последовательность переменного домена иммуноглобулина. Например, антитело может включать переменную область тяжелой (H) цепи (сокращенно обозначенную в настоящем документе как V_H), и/или переменную область легкой (L) цепи (сокращенно обозначенную в настоящем документе как V_L). В другом примере антитело включает две переменных области тяжелой (H) цепи и/или две переменных области легкой (L) цепи. Антитело может иметь структурные признаки IgA, IgG, IgE, IgD, IgM (а также их субтипов). Области V_H и V_L могут дополнительно подразделяться на области гипервариабельности, называемые "областями, определяющими комплементарность" ("CDR"), которые чередуются с областями, которые являются более консервативными, называемыми "каркасными областями" ("FR"). Каждая V_H и/или V_L , как правило, состоит из трех CDR-областей и четырех FR-областей, располагающихся от N-конца к C-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. V_H или V_L цепь антитела может дополнительно включать константную область тяжелой или легкой цепи, формируя, таким образом, тяжелую или легкую цепь иммуноглобулина, соответственно. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой тетрамер из двух тяжелых цепей иммуноглобулина и двух легких цепей иммуноглобулина, где тяжелые и легкие цепи иммуноглобулина соединены, например, дисульфидными связями. В

иммуноглобулинах IgG константная область тяжелой цепи включает три иммуноглобулиновых домена, CH1, CH2 и CH3.

В некоторых вариантах осуществления ретровирус, присутствующий в библиотеке ретровирусов, включает такой же внеклеточный направляющий домен, как и некоторые или все остальные ретровирусы в библиотеке. В некоторых вариантах осуществления каждый ретровирус, присутствующий в библиотеке ретровирусов, включает другой внеклеточный направляющий домен по сравнению с некоторыми или всеми остальными ретровирусами в библиотеке.

В некоторых вариантах осуществления невирусный мембраносвязанный белок дополнительно включает сигнальную последовательность (также называемую сигнальным пептидом последовательности локализации). В некоторых вариантах осуществления сигнальная последовательность расположена на N- или C-концах невирусного мембраносвязанного белка. Сигнальная последовательность выполняет функцию транслокации невирусного мембраносвязанного белка в мембрану (или оболочку) ретровируса. В некоторых вариантах осуществления сигнальная последовательность содержит 5-10, 5-15, 10-20, 15-20, 15-30, 20-30 или 25-30 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления сигнальная последовательность представляет собой лидерную последовательность Ig Каппа (например, мышиную лидерную последовательность Ig Каппа, включающую: METDTLLLVVLLLVPGSTG (SEQ ID NO: 1)) или последовательность сигнального пептида B2M (например, последовательность сигнального пептида B2M, включающую: MSRSVALAVLALLSLSGLEA (SEQ ID NO: 2)). В некоторых вариантах осуществления ретровирус, присутствующий в библиотеке ретровирусов, включает такую же сигнальную последовательность, как и некоторые или все остальные ретровирусы в библиотеке. В некоторых вариантах осуществления каждый ретровирус, присутствующий в библиотеке ретровирусов, включает другую сигнальную последовательность по сравнению с некоторыми или всеми остальными ретровирусами в библиотеке.

В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая невирусный мембраносвязанный белок, дополнительно включает участок внутренней посадки рибосомы (IRES). IRES представляет собой последовательность РНК, которая вызывает инициацию трансляции во время синтеза белка. В некоторых вариантах осуществления IRES расположены на C-конце или вблизи от него. В некоторых вариантах осуществления IRES расположен C-терминально относительно мембраносвязанного домена и внеклеточного направляющего домена. В некоторых вариантах осуществления IRES представляет собой вирусный IRES. В некоторых вариантах осуществления IRES представляет собой IRES, который является нативным для ретровируса. В некоторых вариантах осуществления IRES является последовательностью, происходящей из вируса энцефаломиокардита (ВЭМК). В некоторых вариантах осуществления ретровирус, присутствующий в библиотеке ретровирусов, включает такой же IRES, как и некоторые или все остальные ретровирусы в библиотеке. В некоторых вариантах осуществления

каждый ретровирус, присутствующий в библиотеке ретровирусов, включает другой IRES по сравнению с некоторыми или всеми остальными ретровирусами в библиотеке.

В некоторых вариантах осуществления невирусный мембраносвязанный белок дополнительно включает линкер, расположенный между мембраносвязанным доменом и внеклеточным направляющим доменом. Линкер представляет собой аминокислотный линкер и может быть жестким линкером, гибким линкером или олигомеризованным линкером. Жесткий линкер представляет собой аминокислотную последовательность, обладающую недостаточной гибкостью (например, может включать по меньшей мере один пролин). В некоторых вариантах осуществления жесткий линкер включает стебель рецептора фактора роста тромбоцитов (PDGFR) или стебель CD8 α . В некоторых вариантах осуществления стебель PDGFR включает аминокислотную последовательность, включающую AVGQDTQEVIVVPHSLPFK (SEQ ID NO: 3). В некоторых вариантах осуществления стебель PDGFR включает аминокислотную последовательность, включающую ASAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEAARPAAGGAVHTRGLDFAK (SEQ ID NO: 4) гибкий линкер представляет собой аминокислотную последовательность, которая имеет множество степеней свободы (например, может включать множество аминокислот с малыми боковыми цепями, например, глицин или аланин). В некоторых вариантах осуществления гибкий линкер включает аминокислотную последовательность, включающую GAPGAS (SEQ ID NO: 5). В некоторых вариантах осуществления гибкий линкер включает аминокислотную последовательность, состоящую из GAPGSGGGSGGGGSAS (SEQ ID NO: 6). В некоторых вариантах осуществления гибкий линкер включает аминокислотную последовательность, включающую GGGGS (SEQ ID NO: 7). В некоторых вариантах осуществления гибкий линкер включает аминокислотную последовательность, включающую (GAPGAS)_N (SEQ ID NO: 29) или (G₄S)_N (SEQ ID NO: 30), где N равно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или больше. Олигомеризованный линкер представляет собой аминокислоту, которая может олигомеризоваться с другим близким аминокислотом. В некоторых вариантах осуществления олигомеризованный линкер представляет собой аминокислотную последовательность, которая может образовывать димер, тример или тетрамер. В некоторых вариантах осуществления олигомеризованный линкер включает шарнирный домен IgG4 (например, ASESKYGPPCPPCPAVGQDTQEVIVVPHSLPFK (SEQ ID NO: 8)). В некоторых вариантах осуществления олигомеризованный линкер включает аминокислотную последовательность, которая может образовывать тетрамерную суперспираль (например, ASGGGGSGELAAIKQELAAIKKELAAIKWELAAIKQGAG (SEQ ID NO: 9)). В некоторых вариантах осуществления олигомеризованный линкер включает аминокислотную последовательность, которая может образовывать димерную суперспираль (например, ASESKYGPPCPPCP (SEQ ID NO: 10)).

Репортер

В некоторых вариантах осуществления ретровирусы, описанные в настоящем документе, могут включать репортер (например, репортерный белок). В некоторых

вариантах осуществления ретровирусы, описанные в настоящем документе, включают нуклеиновую кислоту, кодирующую репортер (например, репортерный белок). При использовании в настоящем документе репортер обычно представляет собой белок или ген, который может быть обнаружен при экспрессии в ретровирусе и/или клетке-мишени. В некоторых вариантах осуществления присутствие или отсутствие репортера в клетке-мишени или субпопуляции клеток-мишеней в популяции клеток обеспечивает возможность сортировки клеток (например, с помощью проточной цитометрии и/или сортировки клеток с активированной флуоресценцией).

В некоторых вариантах осуществления репортер представляет собой флуоресцентный белок. Флуоресцентный белок может быть зеленым флуоресцентным белком (GFP), желтым флуоресцентным белком (YFP), красным флуоресцентным белком (RFP). Флуоресцентный белок может быть таким, как описано в патенте США 7,060,869 под заголовком "Fluorescent protein sensors for detection of analytes".

В некоторых вариантах осуществления репортер является маркером устойчивости к антибиотикам. В некоторых вариантах осуществления маркер устойчивости к антибиотикам является белком или геном, придающим конкурентное преимущество клетке-мишени, содержащей такой маркер. В некоторых вариантах осуществления маркер устойчивости к антибиотикам включает белок или ген устойчивости к гигромицину, белок или ген устойчивости к канамицину, белок или ген устойчивости к ампициллину, белок или ген устойчивости к стрептомицину или белок или ген устойчивости к неомицину.

Клетки

Клетка, как описано в настоящем документе, может быть любой бактериальной клеткой, клеткой млекопитающего или дрожжевой клеткой. В некоторых вариантах осуществления клетка является клеткой человека, мыши, крысы или примата, не относящегося к человеку. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой соматическую клетку или половую клетку. В некоторых вариантах осуществления клетка является эпителиальной клеткой, нервной клеткой, гормон-секретирующей клеткой, иммунной клеткой, секреторной клеткой, клеткой крови, интерстициальной клеткой или зародышевой клеткой. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой антигенспецифическую клетку (например, клетку, которая связывается со специфическим антигеном). В некоторых вариантах осуществления антигенспецифическая клетка является иммунной клеткой. В некоторых вариантах осуществления антигенспецифическая клетка является В-клеткой или Т-клеткой. В некоторых вариантах осуществления клетка является клеткой-мишенью (например, которая включает когнатный белок или лиганд, который может служить в качестве мишени для ретровируса, описанного в настоящем документе).

Популяция клеток, как описано в настоящем документе, может быть любой популяцией бактериальных клеток, клеток млекопитающих или дрожжевых клеток. В некоторых вариантах осуществления популяция клеток является популяцией клеток человека, мыши, крысы или примата, не относящегося к человеку. В некоторых вариантах

осуществления популяция клеток является популяцией соматических клеток или популяцией половых клеток. В некоторых вариантах осуществления популяция клеток включает эпителиальные клетки, нервные клетки, гормон-секретирующие клетки, иммунные клетки, секреторные клетки, клетки крови, интерстициальные клетки и/или зародышевые клетки. В некоторых вариантах осуществления популяция клеток включает антигенспецифические клетки (например, клетки, которые связываются со специфическим антигеном). В некоторых вариантах осуществления популяция антигенспецифических клеток включает иммунные клетки. В некоторых вариантах осуществления популяция антигенспецифических клеток включает В-клетки и/или Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления популяция клеток включает гомогенную популяцию клеток. В некоторых вариантах осуществления популяция клеток включает гетерогенную популяцию клеток.

В некоторых вариантах осуществления популяция клеток представляет собой популяцию клеток, выделенных у субъекта. Субъектом может быть субъект-человек (например, субъект-человек, страдающий заболеванием), субъект-мышь, субъект-крыса или субъект-примат, не относящийся к человеку. В некоторых вариантах осуществления популяция клеток выделена из крови или опухоли субъекта.

В некоторых вариантах осуществления популяция клеток была ранее заморожена и разморожена (например, 1, 2, 3, 4, 5 или более циклов замораживания/размораживания). В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток поддерживают в жидких культуральных средах. В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток пассировали 1, 2, 3, 4, 5 или более раз с использованием любого известного метода. В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток поддерживают в жидких культуральных средах до объединения с ретровирусом или множеством ретровирусов. В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток поддерживают в жидких культуральных средах после объединения с ретровирусом или множеством ретровирусов. В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток поддерживают в жидких культуральных средах до момента объединения с ретровирусом или множеством ретровирусов.

В некоторых вариантах осуществления популяция клеток включает любой из ретровирусов, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления субпопуляция клеток содержит любой из ретровирусов, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления субпопуляция клеток содержит ретровирус в каждой клетке субпопуляции (например, в ядре каждой клетки субпопуляции). В некоторых вариантах осуществления, популяция или субпопуляция клеток экспрессирует репортер (например, флуоресцентный белок или маркер устойчивости к антибиотикам). В некоторых вариантах осуществления популяцию или субпопуляцию клеток (например, содержащую ретровирус) выделяют и/или сортируют на основе присутствия или отсутствия репортера. В некоторых вариантах осуществления субпопуляцию клеток, которые содержат ретровирус, описанный в настоящем документе,

выделяют и/или сортируют на основе присутствия или отсутствия репортера с отделением от клеток популяции, которые не содержат ретровирус. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 95% популяции клеток до сортировки клеток содержат ретровирус. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 70%, 80%, 90%, 95% или 100% популяции клеток содержат ретровирус после выделения и/или сортировки на основе присутствия или отсутствия репортера.

Способы скрининга

В настоящем документе описаны способы скрининга популяции клеток, включающие: (i) получение ретровируса, включающего вирусный белок оболочки, включающий по меньшей мере одну мутацию, которая снижает его нативную функцию, невирусный мембраносвязанный белок, включающий мембраносвязанный домен и внеклеточный направляющий домен, и нуклеиновую кислоту, кодирующую репортер; (ii) объединение ретровируса с популяцией клеток; и (iii) сортировку популяции клеток на основе присутствия или отсутствия репортера. В некоторых вариантах осуществления ретровирус: (i) включает нуклеиновую кислоту, включающую структуру: S-ETD-MBD-IRES-R, где S кодирует сигнальную последовательность, ETD кодирует внеклеточный направляющий домен; MBD кодирует мембраносвязанный домен, IRES кодирует участок внутренней посадки рибосомы, и R кодирует репортер; и мутантный вирусный белок оболочки, включающий по меньшей мере одну мутацию, которая снижает его нативную функцию.

При использовании в настоящем документе термин "объединение" (который, в некоторых вариантах осуществления, является синонимом терминов "получение" и "контакт") обычно относится к действию по приведению ретровируса в непосредственный физический контакт с популяцией клеток, в результате чего внеклеточный направляющий домен ретровируса способен связываться с когнатным лигандом, присутствующим на субпопуляции клеток в популяции. В некоторых вариантах осуществления объединение ретровируса и популяции клеток происходит при смешивании раствора, включающего ретровирус, и раствора, включающего популяцию клеток. В некоторых вариантах осуществления объединение ретровируса и популяции клеток происходит при смешивании лиофилизированного ретровируса и раствора, включающего популяцию клеток. В некоторых вариантах осуществления объединение ретровируса и популяции клеток происходит при смешивании лиофилизированного ретровируса и лиофилизированной популяции клеток и восстановления раствором. В некоторых вариантах осуществления клетки популяции поддерживают в среде для культивирования клеток, в монослое клеток и/или прикрепляют к планшету для культур тканей или чашке Петри.

Как правило, ретровирус и популяцию клеток объединяют (например, физически объединяют или приводят в контакт) в течение определенного периода времени. В некоторых вариантах осуществления период времени измеряется в секундах, минутах, часах или днях. В некоторых вариантах осуществления период времени составляет 0-30

секунд, 15-45 секунд, 30-60 секунд, 45-90 секунд, 60-90 секунд или 60-120 секунд. В некоторых вариантах осуществления ретровирус и популяцию клеток объединяют и приводят в контакт на 0-30 секунд, 15-45 секунд, 30-60 секунд, 45-90 секунд, 60-90 секунд или 60-120 секунд. В некоторых вариантах осуществления период времени составляет 1-2 минуты, 1-5 минут, 1-10 минут, 2-10 минут, 5-10 минут, 5-20 минут, 10-20 минут, 25-30 минут, 25-60 минут, 30-45 минут, 30-40 минут, 40-60 минут, 50-70 минут или 60-120 минут. В некоторых вариантах осуществления ретровирус и популяцию клеток объединяют и приводят в контакт на 1-2 минуты, 1-5 минут, 1-10 минут, 2-10 минут, 5-10 минут, 5-20 минут, 10-20 минут, 25-30 минут, 25-60 минут, 30-45 минут, 30-40 минут, 40-60 минут, 50-70 минут или 60-120 минут. В некоторых вариантах осуществления период времени составляет 1-2 часа, 1-5 часов, 1-3 часа, 2-5 часов, 3-6 часов, 3-12 часов, 6-12 часов, 12-18 часов, 12-24 часа, 15-30 часов, 18-24 часа, 24-48 часов, 24-36 часов или 36-50 часов. В некоторых вариантах осуществления ретровирус и популяцию клеток объединяют и приводят в контакт на 1-2 часа, 1-5 часов, 1-3 часов, 2-5 часов, 3-6 часов, 3-12 часов, 6-12 часов, 12-18 часов, 12-24 часов, 15-30 часов, 18-24 часов, 24-48 часов, 24-36 часов или 36-50 часов. В некоторых вариантах осуществления период времени составляет 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или 5-15 дней. В некоторых вариантах осуществления ретровирус и популяцию клеток объединяют и приводят в контакт на 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или 5-15 дней.

В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток сортируют на основе присутствия или отсутствия репортера. В некоторых вариантах осуществления субпопуляцию клеток популяции, содержащих репортер (например, экспрессирующих репортер) сортируют с отделением от остальной субпопуляции клеток популяции, не содержащих репортер. В некоторых вариантах осуществления сортировку популяции клеток производят с помощью проточной цитометрии (например, сортировки клеток с активированной флуоресценцией), секвенирования генома следующего поколения (например, секвенирования следующего поколения одиночных клеток) или отбора с антибиотиком.

В некоторых вариантах осуществления условия этапа (ii), который позволяет, чтобы ретровирус имел межклеточные взаимодействия с субпопуляцией клеток популяции, включают объединение ретровируса и популяции клеток в присутствии определенных растворов, композиций и при определенных температурах. В некоторых вариантах осуществления ретровирус и популяцию клеток объединяют в присутствии среды для культивирования клеток (например, Среды для культивирования клеток RPMI или DMEM). В некоторых вариантах осуществления ретровирус и популяцию клеток объединяют в присутствии забуференного солевого раствора. В некоторых вариантах осуществления забуференный раствор хлорида натрия представляет собой фосфатно-солевой буферный раствор или забуференный HEPES солевой раствор. В некоторых вариантах осуществления забуференный раствор хлорида натрия включает бычий сывороточный альбумин и/или ЭДТА. В некоторых вариантах осуществления ретровирус

и популяцию клеток объединяют в присутствии усилителя ретровирусной трансдукции (например, гепарина сульфата, полибрена, протамина сульфата или декстрана). В некоторых вариантах осуществления ретровирус и популяцию клеток объединяют в (ii) при температуре в пределах от 4°C до 42°C, от 4°C до 8°C, от 4°C до 10°C, от 8°C до 15°C, от 10°C до 20°C, от 18°C до 23°C, от 20°C до 30°C, от 25°C до 35°C, от 30°C до 40°C или от 37°C до 42°C.

В некоторых вариантах осуществления способы скрининга, описанные в настоящем документе, дополнительно включают промывку популяции клеток между этапами (ii) и (iii) промывочным раствором. В некоторых вариантах осуществления промывочный раствор представляет собой любой жидкий раствор, который позволяет поддерживать здоровые клетки (например, раствор, включающий нейтральный pH, уровни ионной силы от низких до умеренных). В некоторых вариантах осуществления промывка популяции клеток позволяет удалять избыточный и/или остаточный ретровирус из популяции клеток. В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток промывают с использованием среды для культивирования клеток (например, среды для культивирования клеток RPMI или DMEM). В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток промывают с использованием забуференного солевого раствора. В некоторых вариантах осуществления забуференный раствор хлорида натрия является фосфатно-солевым буферным раствором или забуференным HEPES солевым раствором. В некоторых вариантах осуществления забуференный раствор хлорида натрия включает бычий сывороточный альбумин и/или ЭДТА. В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток промывают при температуре в пределах от 4°C до 42°C, от 4°C до 8°C, от 4°C до 10°C, от 8°C до 15°C, от 10°C до 20°C, от 18°C до 23°C, от 20°C до 30°C, от 25°C до 35°C, от 30°C до 40°C или от 37°C до 42°C.

В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток поддерживают в жидкой культуре до объединения с ретровирусом. В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток поддерживают в жидкой культуре после объединения с ретровирусом. В некоторых вариантах осуществления популяция клеток поддерживают в жидкой культуре во время этапа объединения с ретровирусом. В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток прикрепляют к планшету для культуры клеток или чашке Петри. В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток поддерживают в монослое, эмбриоидном теле или любом агрегате клеток.

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

В некоторых вариантах осуществления способы скрининга включают скрининг популяции клеток по меньшей мере с использованием двух отличающихся, уникальных

ретровирусов. В некоторых вариантах осуществления отличающийся, уникальный ретровирус включает отличающийся внеклеточный направляющий домен и/или отличающийся репортер. В некоторых вариантах осуществления способы скрининга включают первый ретровирус и второй ретровирус, где первый и второй ретровирус включает отличающийся внеклеточный направляющий домен и/или отличающийся репортер. В некоторых вариантах осуществления способы скрининга включают скрининг популяции клеток с использованием 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 50, 100 или больше разных ретровирусов. В некоторых вариантах осуществления способы скрининга включают скрининг популяции клеток с использованием библиотеки ретровирусов. В некоторых вариантах осуществления библиотека ретровирусов включает по меньшей мере 10^2 , по меньшей мере 10^3 , по меньшей мере 10^4 , по меньшей мере 10^5 , по меньшей мере 10^6 , по меньшей мере 10^7 , по меньшей мере 10^8 , по меньшей мере 10^9 или по меньшей мере 10^{10} уникальных ретровирусов.

Библиотека ретровирусов

В настоящем документе описаны библиотеки ретровирусов, где библиотека включает множество уникальных ретровирусов, где каждый уникальный ретровирус включает вирусный белок оболочки, включающий по меньшей мере одну мутацию, которая снижает его нативную функцию, невирусный мембраносвязанный белок, включающий мембраносвязанный домен и внеклеточный направляющий домен, и нуклеиновую кислоту, кодирующую репортер, и где каждый уникальный ретровирус включает отличающийся и уникальный внеклеточный направляющий домен. Также в настоящем документе описаны библиотеки клеток, включающих ретровирусы, где библиотека включает множество уникальных клеток, где каждая уникальная клетка включает уникальный ретровирус.

В некоторых вариантах осуществления библиотеки включают рМНС-кодируемые (пептид/МНС-кодируемые) ретровирусные (например, лентивирусные) библиотеки для применения в скрининге популяций Т-клеток. В таких библиотеках, рМНС, экспонируемые на поверхности вируса, будут обеспечивать инфицирование Т-клетки ТСР-специфическим образом. Инфицированные Т-клетки можно собрать и секвенировать, обеспечивая идентификацию рМНС лигандов, которые могут инфицировать субпопуляцию Т-клеточной популяции, представляющей интерес, и возможность одновременно отслеживать последовательности ТСР и реактивные рМНС лиганды. В некоторых вариантах осуществления, рМНС ретровирусные библиотеки минимально включают рандомизированные трансферные векторы, содержащие рандомизированные рМНС-направляющие элементы. В некоторых вариантах осуществления рандомизированно полученные библиотеки создают при использовании вырожденных олигонуклеотидных праймеров. В некоторых вариантах осуществления создают направленные библиотеки, которые являются специфичными к уникальному набору антигенов (например, всем возможным вирусным или бактериальным антигенам для конкретной мишени, представляющей интерес - вирус иммунодефицита человека,

туберкулеза ТВ и т.д.; или все возможные неоантигены для конкретного субъекта).

В некоторых вариантах осуществления библиотека может быть подвергнута скринингу против популяции антигенспецифических клеток (например, В-клеток или Т-клеток). В некоторых вариантах осуществления библиотека включает по меньшей мере 10^2 , по меньшей мере 10^3 , по меньшей мере 10^4 , по меньшей мере 10^5 , по меньшей мере 10^6 , по меньшей мере 10^7 , по меньшей мере 10^8 , по меньшей мере 10^9 или по меньшей мере 10^{10} уникальных ретровирусов. В некоторых вариантах осуществления библиотека, включающая уникальные ретровирусы, включает внеклеточные направляющие домены, которые имеют длину по меньшей мере 5, по меньшей мере 10, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20 или по меньшей мере 50 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления каждый отдельный и уникальный внеклеточный направляющий домен создан с помощью сайт-направленного мутагенеза.

Ретровирусные или клеточные библиотеки могут иметь различный размер, от сотен до сотен тысяч, миллионов или больше уникальных ретровирусов или уникальных клеток. В некоторых вариантах осуществления библиотеки согласно изобретению включают по меньшей мере 500000 уникальных ретровирусов или уникальных клеток. Библиотеки согласно изобретению включают ретровирусные библиотеки и клеточные библиотеки. Библиотека представляет собой синтетическую (то есть выделенную, полученную синтетически, не содержащую компонентов, которые в естественных условиях содержатся вместе в клетке, очищенную перед помещением в библиотеку) коллекцию членов, имеющих общий элемент и по меньшей мере один отличный элемент. Библиотека состоит из тысячи или больше (например, по меньшей мере 1000; 2000; 3000; 4000; 5000; 10000; 50000; 100000; 500 000; 600000; 700000; 800 000; 900000; 1000000; 2000000; 3000000; 4000000 и больше) членов. Верхняя граница размера библиотеки определяется комбинаторикой доменов или модулей, обеспечивающих отличимость или разнообразие членов. Например, верхняя граница может составлять 4000000 членов. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления библиотека очень разнообразна и включает по меньшей мере 500000 разных членов. Очень разнообразная библиотека может иметь разнообразие 10^6 и больше. В некоторых вариантах осуществления библиотеку ретровирусов создают с использованием сайт-направленного мутагенеза нуклеиновой кислоты, описанной в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления сайт-направленный мутагенез включает использование праймеров и РНК-полимеразы пониженной точности для проведения рандомизированного мутагенеза обычной нуклеиновой кислоты, как описано в настоящем документе.

Способы доставки нуклеиновой кислоты в клетку

В настоящем документе описаны способы доставки нуклеиновой кислоты в клетку, включающие: (i) получение ретровируса, как описано в настоящем документе, включающего нуклеиновую кислоту, вирусный белок оболочки, включающий по меньшей мере одну мутацию, которая снижает его нативную функцию, и невирусный мембраносвязанный белок, включающий внеклеточный направляющий домен, который

способен к связыванию с когнатным лигандом клетки; и (ii) контакт ретровируса с клеткой, в результате чего ретровирус проникает в клетку или инфицирует ее. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота кодирует молекулу мРНК, необязательно, где мРНК является представляющим интерес геном. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота кодирует двухцепочечную РНК, антисмысловую РНК, микроРНК или любую другую молекулу РНК. В некоторых вариантах осуществления представляющий интерес ген кодирует белок. В некоторых вариантах осуществления представляющий интерес ген кодирует терапевтический белок (например, белок для компенсации патологического состояния у субъекта).

В некоторых вариантах осуществления нуклеиновую кислоту доставляется в клетку, когда ретровирус проникает в клетку или инфицирует клетку в этапе (ii). В некоторых вариантах осуществления способы доставки нуклеиновой кислоты, описанной в настоящем документе, не требуют реагента для трансфекции (например, липофильного реагента для трансфекции, такого как Липофектин).

Способы обнаружения

В настоящем документе описаны способы обнаружения взаимодействия между ретровирусом и клеткой, включающие: (i) контакт образца, включающего ретровирус и клетку, с антителом, где ретровирус включает вирусный белок оболочки, включающий по меньшей мере одну мутацию, которая снижает его нативную функцию, невирусный мембраносвязанный белок, включающий внеклеточный направляющий домен, и где антитело связывается с внеклеточным направляющим доменом ретровируса; (ii) необязательно, удаление несвязавшегося антитела из образца; и (iii) визуализацию образца с целью обнаружения, связался ли комплекс антитела-ретровируса с клеткой.

В некоторых вариантах осуществления антитело дополнительно включает по меньшей мере одну флуоресцентную метку. В некоторых вариантах осуществления флуоресцентная метка представляет собой производное ксантена (например, флуоресцеин, родамин, Oregon Green, эозин и Texas Red), производное цианина (например, цианин, индокарбоцианин, оксакарбоцианин, тиакарбоцианин и мероцианин), производное нафталина (например, производные дансила и продана), производное кумарина, производное оксадиазола (например, пиридилоксазол, нитробензоксадиазол и бензоксадиазол), производное пирена (например, Cascade blue), производное оксазина (например, нильский красный, нильский синий, крезиловый фиолетовый и оксазин 170), производное акридина (например, профлавин, акридиновый оранжевый и акридиновый желтый), производное арилметина (например, аурамин, кристаллический фиолетовый и малахитовый зеленый) или производное тетрапиррола (например, порфин, фталоцианин и билирубин). Флуоресцентная метка может быть нековалентно связана с антителом или ковалентно связана с антителом.

В некоторых вариантах осуществления образец визуализируют в этапе (iii) при использовании конфокальной или флуоресцентной микроскопии. В некоторых вариантах осуществления методы обнаружения могут быть выполнены с помощью стандартного

оборудования для микроскопии (например, конфокальных или флуоресцентных микроскопов). В некоторых вариантах осуществления образец обнаруживают в ультрамультиплексном формате с визуализацией с помощью стандартного конфокального или эпифлуоресцентного микроскопа.

Нуклеиновые кислоты

При использовании в настоящем документе термин "нуклеиновые кислоты" в общем смысле относится к множеству соединенных нуклеотидов (т.е. молекул, включающих сахар (например, рибозу или дезоксирибозу), соединенный с переменным органическим основанием, которым является пиримидин (например, цитозин (C), тимидин (T) или урацил (U)) или пурин (например, аденин (A) или гуанин (G)). Нуклеиновые кислоты включают ДНК, такую как ДНК D-формы и ДНК L-формы, и РНК, а также их различные модификации. Модификации включают модификации основания, модификации сахара и модификации скелета.

Следует понимать, что нуклеиновые кислоты, используемые в ретровирусах и способах согласно изобретению, могут быть гомогенными или гетерогенными по природе. Например, они могут представлять собой полностью ДНК по своей природе или они могут состоять из мономеров или последовательностей ДНК и не ДНК (например, ЛНК). Таким образом, может использоваться любая комбинация элементов нуклеиновых кислот. Модификация может сделать нуклеиновую кислоту более стабильной и/или менее чувствительной к деградации при определенных условиях. Например, в некоторых случаях нуклеиновые кислоты устойчивы к воздействию нуклеаз. Способы синтеза нуклеиновых кислот, включая автоматизированный синтез нуклеиновых кислот, также известны в уровне техники.

Нуклеиновые кислоты могут включать модификации в своих основаниях. Модифицированные основания включают модифицированные цитозины (такие как 5-замещенные цитозины (например, 5-метилцитозин, 5-фторцитозин, 5-хлорцитозин, 5-бромцитозин, 5-иодцитозин, 5-гидроксицитозин, 5-гидроксиметилцитозин, 5-диформетилцитозин и незамещенный или замещенный 5-алкинилцитозин), 6-замещенные цитозины, N4-замещенные цитозины (например, N4-этилцитозин), 5-азацитозин, 2-меркапто-цитозин, изоцитозин, псевдоизоцитозин, аналоги цитозина с конденсированными кольцевыми системами (например, N, N'-пропиленцитозин или феноксазин), а также урацил и его производные (например, 5-фторурацил, 5-бромуррацил, 5-бромвинилурацил, 4-тиоурацил, 5-гидроксиурацил, 5-пропинилурацил), модифицированные гуанины, такие как 7-деазагуанин, 7-деаза-7-замещенный гуанин (например, 7-деаза-7-(C2-C6)алкинилгуанин), 7-деаза-8-замещенный гуанин, гипоксантин, N2-замещенные гуанины (например, N2-метилгуанин), 5-амино-3-метил-3Н,6Н-тиазоло[4,5-d]пиримидин-2,7-дион, 2,6-диаминопурин, 2-аминопурин, пурин, индол, аденин, замещенные аденины (например, N6-метиладенин, 8-оксоаденин) 8-замещенный гуанин (например, 8-гидроксигуанин и 8-бромгуанин) и 6-тиогуанин. Нуклеиновые кислоты могут включать универсальные основания (например, 3-нитропиррол, Р-

основание, 4-метилиндол, 5-нитроиндол и К-основание) и/или ароматические кольцевые системы (например, фторбензол, дифторбензол, бензимидазол или дихлорбензимидазол, амид 1-метил-1H-[1,2,4]триазол-3-карбоновой кислоты). Конкретная пара оснований, которая может быть включена в олигонуклеотиды согласно изобретению, является парой нестандартных азотистых оснований dZ и dP, описанная в Yang et al. NAR, 2006, 34(21):6095-6101. dZ, аналог пиримидина, представляет собой 6-амино-5-нитро-3-(1'-β-D-2'-дезоксирiboфуранозил)-2(1H)-пиридон, и его комплемент согласно правилу Уотсона-Крика, dP, аналог пурина, представляет собой 2-амино-8-(1'-β-D-1'-дезоксирiboфуранозил)имидазо[1,2-a]-1,3,5-триазин-4(8H)-он.

Аминокислотные замены

В некоторых вариантах осуществления вариации аминокислотных остатков представляют собой консервативные замены аминокислотных остатков. При использовании в настоящем документе "консервативная аминокислотная замена" относится к аминокислотной замене, которая не приводит к изменению характеристик относительного заряда или размера белка, в котором сделана такая аминокислотная замена. Варианты могут быть получены в соответствии с методами изменения полипептидной последовательности, известными среднему специалисту в данной области, которые можно найти в источниках, в которых собраны такие методы, например, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, J. Sambrook, et al., eds., Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989, или Current Protocols in Molecular Biology, F.M. Ausubel, et al., eds., John Wiley & Sons, Inc., New York. Консервативные замены аминокислот включают замены, сделанные в следующих группах аминокислот: (a) M, I, L, V; (b) F, Y, W; (c) K, R, H; (d) A, G; (e) S, T; (f) Q, N; и (g) E, D.

"Процент идентичности" двух аминокислотных последовательностей определяют при использовании алгоритма Карлина и Альтшула (Karlin and Altschul Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-68, 1990), в модификации, как описано в Karlin and Altschul Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-77, 1993. Такой алгоритм входит в программы NBLAST и XBLAST (версии 2.0), Altschul, et al. J. Mol. Biol. 215:403-10, 1990. Поиск белков в BLAST может быть выполнен с помощью программы XBLAST, балл =50, длина слова =3 с получением аминокислотных последовательностей, гомологичных интересующим белковым молекулам. Если при сравнении двух последовательностей присутствуют пропуски, можно использовать Gapped BLAST, как описано в публикации Altschul et al., Nucleic Acids Res. 25(17):3389-3402, 1997. При использовании программ BLAST и Gapped BLAST могут использоваться параметры по умолчанию в соответствующих программах (например, XBLAST и NBLAST).

ПРИМЕРЫ

Пример 1. Создание ретровируса, который направленно взаимодействует с антигенспецифическими Т-клетками

Направленные лентивирусы создавали путем трансфекции клеток HEK293T с полиэтиленимином (ПЭИ) при использовании следующих плазмид: оболочечная

плазмида, кодирующая мутантный белок оболочки VSV-G, содержащий мутации K47Q и R354A, по меньшей мере одна вспомогательная плазмида (pRRE, pRev или psPAX2.1) и трансферная плазмида (ФИГ. 1). Используемые трансферные плазмиды кодируют нуклеиновую кислоту, включающую структуру: S-ETD-MBD-IRES-R, где S кодировал сигнальную последовательность B2M (представленную в SEQ ID NO: 2), ETD кодировал переменный внеклеточный целевой домен (например, раково-тестикулярный антиген NYESO-1); MBD кодировал мембраносвязанный домен (например, домен HLA-A2 MHC), IRES кодировал участок внутренней посадки рибосомы из вируса энцефаломиокардита (ВЭМК), и R кодировал репортерный зеленый флуоресцентный белок GFP (ФИГ. 2).

Полученные вирусы собирали и очищали с помощью стандартных методов центрифугирования перед смешиванием (при использовании смешивания пипеткой) с линиями Т-клеток (например, Т-клеток Jurkat), экспрессирующих Т-клеточные рецепторы (TCR), специфичные к известным рМНС, в присутствии гексадиметринбромида.

При смешивании HLA-A2-NYESO-1 рМНС-экспонирующих вирусов с Т-клетками Jurkat, экспрессирующими вариант Т-клеточного рецептора (TCR) IG4 (SEQ ID NO: 27), который распознает экспонированный NYESO-1 с аффинностью связывания ~26 пМ, наблюдали эффективную инфекцию, причем 41,9% Т-клеток экспрессировали репортер GFP после смешивания (ФИГ. 3А). Этот результат показал, что 41,9% Т-клеток в этой клеточной популяции были инфицированы вирусом. Напротив, при смешивании HLA-A2-NYESO-1 рМНС-экспонирующих вирусов с клетками, которые не экспрессировали TCR IG4, наблюдали минимальную инфекцию, причем только 1,1% Т-клеток экспрессировали GFP репортер после смешивания (ФИГ. 3В).

Смешивание HLA-A2-NYESO-1 рМНС-экспонирующих вирусов с Т-клетками, экспрессирующими разные версии TCR IG4 (где разные версии TCR IG4 демонстрируют сниженное связывание с антигеном NYESO-1 по сравнению с вариантом TCR IG4, включающим SEQ ID NO: 27), продемонстрировало, что вирусы были способны инфицировать Т-клетки, даже при снижении аффинности связывания между антигеном NYESO-1 и TCR IG4 до 32 мкМ (ФИГ. 4). Аффинность связывания 32 мкМ между антигеном NYESO-1 и вариантом TCR IG4 (SEQ ID NO: 24) обеспечивала 3,6% трансдукцию; аффинность связывания 84 нМ между антигеном NYESO-1 и вариантом TCR IG4 (SEQ ID NO: 25) обеспечивала 17,6% трансдукцию; и аффинность связывания 5 нМ между антигеном NYESO-1 и вариантом TCR IG4 (SEQ ID NO: 26) обеспечивала 18,1% трансдукцию; при измерении по экспрессии GFP.

IG4-экспрессирующие Т-клетки демонстрировали Т-клеточную активацию при трансдукции/инфицировании HLA-A2-NYESO-1-экспонирующими вирусами, что подтверждалось апрегуляцией CD69 (ФИГ. 5А). С другой стороны, HLA-A2-SL9-экспонирующие вирусы не трансдуцировали/инфицировали и не активировали IG4-выражение Т-клеток (ФИГ. 5В).

Пример 2. Создание ретровирусов, которые направленно взаимодействуют с рецептором IL-13

Лентивирус, включающий внеклеточный направляющий домен интерлейкина-13 (IL-13), был создан, как описано в Примере 1. Внеклеточный направляющий домен IL-13 состоял из полноразмерного белка IL-13, связанного с белковым линкером на основе шарнирной области IgG4, и трансмембранного домена PDGFR, включающего усеченный цитоплазматический хвост (трансмембранный домен PDGFR: VVVISAILALVVLTHSLILIMLWQKKPR (SEQ ID NO: 28)). При смешивании полученных вирусов с клетками Jurkat, экспрессирующими рецептор IL-13R α 1, наблюдали эффективную трансдукцию, причем 85,2% клеток экспрессировали GFP репортер после смешивания (ФИГ. 7A). При смешивании те же вирусы с клетками, не экспрессирующими какие-либо рецепторы IL-13, наблюдали минимальную инфекцию (ФИГ. 7B).

Дополнительные лентивирусы, экспрессирующие IL-13, были созданы с альтернативными белковыми линкерами для соединения внеклеточного направляющего домена IL-13 с трансмембранным доменом PDGFR. Эквивалентные объемы всех протестированных лентивирусов смешивали с клетками Jurkat, несущими рецептор IL13R α 1, и оценивали уровни трансдукции при использовании GFP репортера (ФИГ. 12).

Короткие и длинные белковые линкеры тестировали на их способность обеспечивать межклеточные взаимодействия между внеклеточным направляющим доменом (IL-13) и когнатным лигандом (рецептором IL13R α 1). Лентивирусы, включающие короткие линкеры, почти не были способны инфицировать клетки Jurkat, при этом линкер PDGFR (AVGQDTQEVIVPHSLPFFK (SEQ ID NO: 3)) обеспечивал инфицирование 6,1% клеток; линкер GAPGAS (GAPGAS (SEQ ID NO: 5)) обеспечивал инфицирование 1,0% клеток; и линкер CAR ECD (ASESKYGPPCPPCP (SEQ ID NO: 10)) обеспечивал инфицирование 1,6% клеток. Лентивирусы, включающие длинные линкеры, оказались крайне эффективными при инфицировании клеток Jurkat, причем линкер на основе стебля CD8a (ASAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEAARPAAGGAVHTRGLDFAK (SEQ ID NO: 4)) обеспечивал инфицирование 88,5% клеток; линкер на основе шарнирной области IgG4 (ASESKYGPPCPPCPAVGQDTQEVIVPHSLPFFK (SEQ ID NO: 8)) обеспечивал инфицирование 85,2% клеток; и олигомеризованный линкер, включающий аминокислотную последовательность, которая может формировать тетрамерную суперспираль (например, ASGGGSGELAAIKQELAAIKKELAAIKWELAA GAG (SEQ ID NO: 9)), обеспечивал инфицирование 38,5% клеток.

Пример 3. Создание ретровирусов, которые направленно взаимодействуют с CD19

Лентивирус, псевдотипированный F-белком вируса Нипах и G-белком вируса Нипах, слитым с scFv против CD19, был способен трансдуцировать CD19⁺ В-клетки Raji (клетки, экспрессирующие CD19), причем 14,5% клеток экспрессировали GFP репортер после смешивания (ФИГ. 9).

Лентивирус, псевдотипированный VSV-mut (мутантным VSV-G) и scFv против CD19, слитым с шарнирным доменом IgG, усеченным стеблем PDGFR и

трансмембранным доменом PDGFR, был способен трансдуцировать CD19⁺ В-клетки Raji. Нанесение 1 мкл лентивируса VSV-mut (200× сконцентрированного) на CD19⁺ В-клетки Raji давало 10,0% инфицированных клеток (на основе экспрессии GFP репортера); 10 мкл VSV-mut давало на 10,7% инфицированных клеток (ФИГ. 10). Та же VSV-mut лентивирусная конструкция не трансдуцировала/инфицировала клетки CD19⁻ Jurkat (клетки, не экспрессирующие CD19), демонстрируя, что лентивирус специфичен к клеткам, экспрессирующим когнатный лиганд его внеклеточного направляющего домена (scFv против CD19).

Лентивирус, псевдотипированный VSV-wt (VSV-G дикого типа) и scFv против CD19, слитым с шарнирным доменом IgG, усеченным стеблем PDGFR и трансмембранным доменом PDGFR, был способен трансдуцировать CD19⁺ В-клетки Raji и CD19⁻ клетки Jurkat. Этот сравнительный результат демонстрирует, что лентивирус, включающий мутантный VSV-G (где мутации снижают нативную функцию белка VSV-G), обладает селективностью при трансдукции/инфицировании клеток, экспрессирующих когнатный лиганд, с которым направленно взаимодействует внеклеточный направляющий домен лентивируса.

Пример 4. Способность направленных лентивирусов индуцировать Т-клеточную сигнализацию

Вирусы оценивали с целью определить, приводило ли заражение посредством TCR-таргетинга к подтверждению сигнализации TCR. Хотя ненаправленные вирусы VSV-wt эффективно инфицировали Т-клетки, они не активировали Т-клетки, как оценивали по уровням экспрессии CD69, в сравнении с контролями (ФИГ. 13, левая панель). Однако когда HLA-A2-NYESO-1-экспонирующие вирусы использовались для направленного взаимодействия с Т-клетками Jurkat, экспрессирующими высокоаффинный TCR 1G4 дикого типа, в трансдуцированных клетках наблюдали апрегуляцию CD69, что указывает на сигнализацию TCR во время инфицирования (ФИГ. 13, правая панель). Эти результаты воспроизводили при смешивании HLA-A2-NYESO-1-экспонирующих вирусов с Т-клетками, экспрессирующими низкоаффинные мутантные конструкции TCR 1G4, описанные в Примере 1 (ФИГ. 14).

Пример 5. Лентивирусная трансдукция через TCR при физиологических аффинностях

Популяцию Т-клеток Jurkat очищали по экспрессии TCR 1G4, после чего подвергали контакту с HLA-A2-NYESO-1-экспонирующими вирусами. Вирусы эффективно трансдуцировали очищенную популяцию Т-клеток Jurkat, экспрессирующих каждый из вариантов аффинности TCR1G4, на основе экспрессии GFP репортера (ФИГ. 15). Аффинность связывания 32 мкМ между антигеном NYESO-1 и вариантом TCR 1G4 обеспечивала 51,3% трансдукцию; аффинность связывания 84 нМ между антигеном NYESO-1 и вариантом TCR 1G4 обеспечивала 84,8% трансдукцию; аффинность связывания 5 нМ между антигеном NYESO-1 и вариантом TCR 1G4 обеспечивала 82,3% трансдукцию; и аффинность связывания 26 нМ между антигеном NYESO-1 и вариантом

TCR IG4 обеспечивала 73,2% трансдукцию.

Различия среди различных вариантов аффинности TCR IG4 также исследовали путем определения дозозависимого действия при инкубировании переменных количеств (0,5-10 мкл вируса) HLA-A2-NYESO-1-экспонирующих вирусов с клетками. NYESO-1-экспонирующие лентивирусы трансдуцировали IG4-экспрессирующие Т-клетки даже при высокой вирусной нагрузке (ФИГ. 16А). С другой стороны, SL-1-экспонирующие лентивирусы (отрицательные контроли) не трансдуцировали IG4-экспрессирующие Т-клетки (SL-1 и TCR IG4 не являются когнатными партнерами по связыванию).

Белковую архитектуру мембраносвязанного NYESO-1 направляющего белка изменяли для проверки способности олигомеризованных NYESO-1-экспонирующих конструкций трансдуцировать Т-клетки. NYESO-1-экспонирующие экспрессирующие лентивирусы были созданы при использовании альтернативных белковых линкеров для соединения внеклеточного направляющего домена NYESO-1 с трансмембранным доменом (белковый линкер, включающий шарнирную область IgG4 (димер); и олигомеризованный линкер, включающий аминокислотную последовательность, которая может формировать тетрамерную суперспираль (тетрамер)). Как показано на ФИГ. 17, лентивирусы, экспрессирующие такие альтернативные архитектуры, были способны трансдуцировать Т-клетки, экспрессирующие 26 мкМ и 32 мкМ вариантов TCR IG4.

Пример 6. Анализ связывания вируса

Вирусы псевдотипировали: (1) либо VSV-G дикого типа (VSV-G); (2) либо F-белком вируса кори и рецептор-ослепленным H-белком, слитым с scFv против CD19 и FLAG-меткой (MV- α CD19); (3) либо F-белком вируса Нипах и рецептор-ослепленным G-белком, слитым с scFv против CD19 и FLAG-меткой (NiV- α CD19); или (4) вирусом Нипах F и рецептор-ослепленным G-белком с FLAG-меткой, но без scFv (NiV-dead). Каждый из этих вирусов смешивали с CD19⁺ В-клетками Raji, а затем подвергали воздействию флуоресцентно-меченного антитела против FLAG-метки. Как показано на ФИГ. 18А-18В, вирусы, экспрессирующие scFv против CD19 (MV- α CD19 и NiV- α CD19), связывались с В-клетками Raji. Вирусы, которые не экспрессировали scFv против CD19 (VSV-G и NiV-dead), не связывались с В-клетками Raji.

Пример 7. Скрининг библиотеки ретровирусов против популяции Т-клеток

Библиотека ретровирусов (107-1010 уникальных ретровирусов) включала мутантный белок оболочки VSV-G, невирусный мембраносвязанный белок, включающий мембраносвязанный домен МНС, варибельный внеклеточный направляющий домен IL-13 и GFP репортер.

Сначала библиотеку нуклеиновых кислот, кодирующих уникальные невирусные мембраносвязанные белки, включающие мембраносвязанный домен МНС и варибельный внеклеточный направляющий домен IL-13, получали при использовании ПЦР-праймеров, которые включали вырожденные кодоны в положениях, которые, как известно, взаимодействуют с рецепторами IL-13, и индуцировали случайный мутагенез во внеклеточном целевом домене IL-13. Полученные конструкции нуклеиновых кислот

собирали в вирусные трансферные плазмиды с флуоресцентными репортерами при использовании стандартных методов молекулярного клонирования. Эти плазмиды ("трансферные плазмиды") вместе с вспомогательными плазмидами и оболочечной плазмидой, кодирующей мутантный белок оболочки VSV-G (или эквивалентный псевдотип), трансфицировали в ретровирусы с получением библиотеки ретровирусов. Вирусы очищали и смешивали с популяциями клеток (например, линиями Т-клеток, линиями клеток НЕК293), которые экспрессировали представляющий интерес рецептор IL-13. Вирусы инкубировали с популяциями клеток при соответствующей температуре (например, 37°C) в течение подходящего времени (например, 1-48 часов). Смешивание проводили в стандартных средах для культивирования клеток с гексадиметринбромидом. Через 24-48 часов клетки сортировали по экспрессии GFP репортера. Клетки с высокой экспрессией оставляли и повторяли процесс сортировки при необходимости. После этих циклов отбора путем сортировки оставшиеся клетки лизировали и выделяли клеточную РНК и ДНК для анализа с использованием методов секвенирования следующего поколения, чтобы определить, какие варианты IL-13 были способны опосредовать проникновение вируса.

Пример 8. Создание дополнительных ретровирусов, которые направленно взаимодействуют с антигенспецифическими Т-клетками

Дополнительные направленные лентивирусы создавали с помощью протоколов, описанных в Примере 1.

Как показано на ФИГ. 19, смешивание (i) лентивируса, включающего мутантный белок оболочки VSV-G и рМНС, экспонирующий пептид SL9, и (ii) 868 TCR-экспрессирующих Т-клеток продемонстрировало, что вирусы могли трансдуцировать и инфицировать Т-клетки даже при низких количествах добавляемого вируса (трансдукция ~70% при 1 мкл вируса). С другой стороны смешивание этих вирусов с нецелевыми клетками Jurkat приводило к низким уровням трансдукции (меньше 5% до 10 мкл добавляемого вируса). Аналогичный эксперимент

Как также показано на ФИГ. 19, смешивание (i) лентивируса, включающего мутантный белок оболочки VSV-G и рМНС, экспонирующий NLV пептид цитомегаловируса (ЦМВ) и (ii) С7 TCR-экспрессирующих Т-клеток продемонстрировало, что вирусы могли трансдуцировать и инфицировать Т-клетки (трансдукция ~25% при 10 мкл вируса). С другой стороны смешивание этих вирусов с нецелевыми клетками Jurkat приводило к низким уровням трансдукции (меньше 5% до 10 мкл добавляемого вируса).

Пример 9. Создание ретровирусов, включающих направленные пептиды рМНС, стабилизированные дисульфидами

Дополнительные направленные лентивирусы создавали при использовании протоколов, описанных в Примере 1. Эти дополнительные лентивирусы дополнительно включали дисульфид, расположенный в рМНС, для стабилизации структуры рМНС.

Как показано на ФИГ. 21, смешивание (i) лентивируса, включающего мутантный белок оболочки VSV-G и стабилизированный дисульфидом рМНС, экспонирующий

направляющий пептид, и (ii) клеток-мишеней, экспрессирующих когнатный рецептор, продемонстрировало, что направленные вирусы могли трансдуцировать и инфицировать клетки-мишени. С другой стороны смешивание этих направленных вирусов с нецелевыми клетками не вызвало или вызвало очень ограниченную (0,1%) трансдукцию.

В частности, лентивирус, включающий стабилизированный дисульфидом NLV ЦМВ рМНС, трансдуцировал целевые С7 ТCR-экспрессирующие Т-клетки на уровне трансдукции 21,8%; лентивирус, включающий стабилизированный дисульфидом ВЭБ рМНС, трансдуцировал целевые клетки AS01 на уровне трансдукции 4,8%; лентивирус, включающий стабилизированный дисульфидом SL9 рМНС, трансдуцировал целевые 868 ТCR-экспрессирующие Т-клетки на уровне трансдукции 22,1%; и лентивирус, включающий стабилизированный дисульфидом NYESO-1 рМНС, трансдуцировал целевые IG4 ТCR-экспрессирующие Т-клетки на уровне трансдукции 19,0%.

Пример 10. Направленные вирусы трансдуцируют первичные клетки

Линию первичных Т-клеток, специфичных к GL9 (презентированному HLA-A2), специфично и эффективно трансдуцировали вирусами, имеющими мутантный белок оболочки VSV-G и экспонирующими GL9 (фиг. 22A-22B). Примерно 50% первичных Т-клеток были трансдуцированы такими GL9-направляющими вирусами. С другой стороны, эти GL9-направляющие вирусы трансдуцировали только 0,3% Т-клеток, экспрессирующих ТCR IG4. Т-клетки, экспрессирующие ТCR IG4, специфично и эффективно трансдуцировались вирусами, имеющими мутантный белок оболочки VSV-G и экспонирующими NYESO-1 (55,9% трансдукция). Кроме того, направленный вирус инфицировал первичные клетки более эффективно, чем вирус VSV-G дикого типа. Эти результаты указывают, что направленные вирусы могут инфицировать даже нестимулированные первичные клетки.

Аналогичным образом, линия первичных Т-клеток, специфичных к NYESO (презентированному HLA-A2), была специфически и эффективно трансдуцирована вирусами, имеющими мутантный белок оболочки VSV-G и экспонирующими NYESO-1 (ФИГ. 23-24). С другой стороны, GL9-направляющие вирусы были неспособны эффективно трансдуцировать первичную линию Т-клеток, специфичную к NYESO. В совокупности эти данные демонстрируют, что первичные NYESO-1-реактивные клетки, включая размноженные первичные клетки, могут быть специфично инфицированы NYESO-направленными вирусами.

Пример 11. Создание ретровирусов, включающих домен CD80

Вирус, псевдотипированный мутантным белком оболочки VSV-G и включающий внеклеточный домен CD80, создавали с использованием протокола, описанного в Примере 1. Этот вирус мог специфично и эффективно инфицировать Т-клетки Jurkat (трансдукция 25,5%) в отличие от В-клеток (трансдукция 0,0%) (ФИГ. 25).

Аналогичным образом, вирус, псевдотипированный мутантным белком оболочки VSV-G и включающий NYESO-1 рМНС и внеклеточный домен CD80, создавали с использованием протокола, описанного в Примере 1. Этот вирус мог специфично и

эффективно инфицировать Т-клетки Jurkat (трандукция 13,5%) в отличие от В-клеток (трандукция 0,2%) (ФИГ. 25). Присутствие домена CD80 обеспечивало трандукцию этого вируса в Т-клетки Jurkat, что было продемонстрировано неспособностью вируса, псевдотипированного мутантным белком оболочки VSV-G и включающим только NYESO-1 рМНС, инфицировать эти Т-клетки Jurkat (трандукция 0,9%).

В совокупности эти данные показывают, что присутствие CD80 на поверхности вируса опосредует специфичное инфицирование Т-клеток и демонстрирует, что CD80 мог использоваться в целом для направления вирусов на Т-клетки.

Пример 12. Мышиное антитело против CD3 опосредует инфицирование TCR-трансдуцированных 58/- клеток

Экспонирование антител, которые являются специфичными к константной области мышиного TCR (антитело H57) или мышиному CD3 (антитело 2C11) на поверхности вируса, позволит вирусам инфицировать линии мышиных Т-клеток. Вирус, включающий мутантный G-белок оболочки вируса BBC и антитело против TCR, обеспечивал трандукцию 11,0% $58\alpha^{-}\beta^{-}$ мышиных Т гибридных клеток; и вирус, включающий мутантный G-белок оболочки вируса BBC и антитело против CD3, обеспечивал трандукцию 12,8% $58\alpha^{-}\beta^{-}$ мышиных Т гибридных клеток.

Пример 13. Создание вирусов, включающих инактивированный G-белок вируса Кокал

Лентивирус псевдотипировали G-белком вируса Кокал (Cocal-dead; аминокислотная последовательность, включающая SEQ ID NO: 53), включающим мутации для уменьшения его инфекционности. Эти мутации, K64Q и R371A, в G-белке вируса Кокал, были аналогичны мутациям, используемым в инактивированном варианте BBC, описанном в Примере 1. Инактивированный вирус Кокал дополнительно включал экспонированное scFv антитело против CD19.

Этот инактивированный вирус Кокал был способен трансдуцировать CD19⁺ В-клетки Raji (трандукция 8,6%), как показано на ФИГ. 27, аналогично лентивирусу, содержащему инактивированный белок BBC и экспонирующему scFv антитело против CD19.

Эти данные демонстрируют, что стратегия вирусного таргетинга очень надежна, и что любой вирусный белок оболочки (например, мутантный VSV-G, мутантный белок оболочки Нипах, мутантный белок оболочки кори, мутантный белок оболочки вируса Кокал), который может быть мутирован с целью уменьшения его инфекционности, может эффективно использоваться.

ДРУГИЕ ВАРИАНТЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

Все признаки, раскрытые в настоящем описании, можно объединять в любой комбинации. Каждый признак, раскрытый в настоящем описании, может быть заменен альтернативным признаком, служащим той же, эквивалентной или аналогичной цели. Таким образом, если в явной форме не указано иное, каждый раскрытый признак является лишь примером общей серии эквивалентных или аналогичных признаков.

Из приведенного выше описания специалист в данной области сумеет легко установить существенные характеристики настоящего изобретения и, не отступая от его сущности и объема, сумеет внести различные изменения и модификации изобретения, чтобы адаптировать его к различным применениям и условиям. Таким образом, другие варианты осуществления также находятся в рамках формулы изобретения.

ЭКВИВАЛЕНТЫ

Хотя в настоящем документе были описаны и проиллюстрированы несколько вариантов осуществления изобретения, специалисты в данной области техники смогут легко представить себе множество других средств и/или структур для выполнения функции и/или получения результатов, и/или одного или больше преимуществ, описанных в настоящем документе, при этом каждый из таких вариантов и/или модификаций считается входящим в объем вариантов осуществления изобретения, описанных в настоящем документе. В более общем смысле специалисты в данной области техники легко сумеют оценить, что все параметры, размеры, материалы и конфигурации, описанные в настоящем документе, предназначены в качестве примера, и что фактические параметры, размеры, материалы и/или конфигурации будут зависеть от конкретного применения или применений, для которых используются принципы изобретения. Специалисты в данной области поймут или сумеют установить при использовании не более чем рутинных экспериментов многие эквиваленты конкретных вариантов осуществления изобретения, описанных в настоящем документе. Таким образом, следует понимать, что описанные выше варианты осуществления представлены исключительно в качестве примера, и что в рамках объема прилагаемой формулы изобретения и ее эквивалентов варианты осуществления изобретения могут быть реализованы иначе, нежели конкретно описано и заявлено. Варианты осуществления настоящего изобретения направлены на каждый отдельный признак, систему, изделие, материал, набор и/или способ, описанные в настоящем документе. Кроме того, любая комбинация двух или более таких признаков, систем, изделий, материалов, наборов и/или способов включена в объеме настоящего изобретения, если такие признаки, системы, изделия, материалы, наборы и/или способы не являются взаимно противоречащими.

Следует понимать, что все определения, при их определении и использовании в настоящем документе, имеют преимущество перед определениями в словарях, определениями в документах, включенных посредством отсылки, и/или обычными значениями определенных терминов.

Все ссылки, патенты и заявки на патент, раскрытые в настоящем документе, включены посредством отсылки в отношении того объекта, для которого каждый из них цитируется, что в некоторых случаях может охватывать всю полноту документа.

Следует понимать, что неопределенные артикли "a" и "an" при использовании в настоящем документе в описании и в формуле изобретения, если явно не указано обратное, означают "по меньшей мере один".

Следует понимать, что фраза "и/или" при использовании в настоящем документе в

описании и в формуле изобретения означает "один или оба из" элементов, соединенных такой фразой, т.е. элементов, которые в одних случаях присутствуют совместно, а в других случаях - раздельно. Множество элементов, перечисленных с использованием "и/или", следует рассматривать аналогичным образом, то есть как "один или больше" элементов, соединенных таким образом. Необязательно могут присутствовать другие элементы, отличные от элементов, конкретно обозначенных фразой "и/или", независимо от того, связаны они или не связаны с этими конкретно указанными элементами. Таким образом, в качестве неограничивающего примера ссылка на "А и/или В" при использовании в сочетании с открытым термином, таким как "включающий", может относиться, в одном варианте осуществления, только к А (необязательно включая элементы, отличные от В); в другом варианте осуществления только к В (необязательно включая элементы, отличные от А); в еще одном варианте осуществления и к А, и к В (необязательно включая другие элементы); и т.п.

При использовании в настоящем документе в описании и формуле изобретения, "или" следует понимать как имеющее то же значение, что и "и/или", как определено выше. Например, при разделении элементов в перечне, "или" или "и/или" следует интерпретировать как включительные, то есть включающие по меньшей мере одно, но также включающие больше одного из числа или перечня элементов, и, необязательно, дополнительные элементы, не перечисленные в перечне. Только термины, которые явно указывают на обратное, такие как "только один из" или "ровно один из" или, при использовании в формуле изобретения, "состоящий из", будут относиться к включению ровно одного элемента из числа или перечня элементов. Как правило, термин "или" при использовании в настоящем документе следует интерпретировать только как указывающий на исключающие альтернативы (то есть "один или другой, но не оба"), когда ему предшествуют термины исключительности, такие как "любой из", "один из", "только один из" или "ровно один из". "Состоящий по существу из" при использовании в формуле изобретения имеет свое обычное значение, используемое в области патентного права.

При использовании в настоящем документе в описании и формуле изобретения фраза "по меньшей мере один" в отношении перечня из одного или более элементов следует понимать как означающая по меньшей мере один элемент, выбранный из любого одного или более элементов в перечне элементов, но не обязательно включающая по меньшей мере один из каждого элемента, конкретно перечисленного в перечне элементов, и не исключающая любые комбинации элементов в перечне элементов. Данное определение также допускает, что могут необязательно присутствовать элементы, отличные от элементов, конкретно обозначенных в перечне элементов, к которым относится фраза "по меньшей мере один", независимо от того, связаны они или не связаны с этими конкретно обозначенными элементами. Таким образом, в качестве неограничивающего примера "по меньшей мере один из А и В" (или, что то же самое, "по меньшей мере один из А или В" или, что то же самое, "по меньшей мере один из А и/или

В") может относиться, в одном варианте осуществления, по меньшей мере к одному, необязательно включающему больше одного, А, без присутствия В (и необязательно включающему элементы, отличные от В); в другом варианте осуществления по меньшей мере к одному, необязательно включающему больше одного, В, без присутствия А (и необязательно включающему элементы, отличные от А); в еще одном варианте осуществления по меньшей мере к одному, необязательно включающему больше одного А, и по меньшей мере одному, необязательно включающему больше одного В (и необязательно включающему другие элементы); и т.п.

Также следует понимать, что, если явно не указано обратное, в любых здесь способах, заявленных в настоящем документе, которые включают больше одного этапа или действия, порядок этапов или действий способа не должен обязательно ограничиваться порядком, в котором такие этапы или действия способа перечисляются.

ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

> Лидерная последовательность Каппа, аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 1): METDTLLLWVLLLWVPGSTG

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

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

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

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

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

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

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

> Тетрамерная суперспираль, аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 9): ASGGGGSGELAAIKQELAAIKKELAAIKWELAAIKQGAG

> Димерная суперспираль, аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 10): ASESKYGPPCPPCP

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

atgaagtgccctttgtacttagcctttttattcattgggggtgaattgcaagttcacatagttttccacacaaccaaaaaggaaactgg
aaaaatgttccttctaattaccattattgcccgtcaagctcagatttaattggcataatgacttaataggcacagccatacaagtcaaaatgcc
aagagtcacaaggctattcaagcagacgggtggatgtgtcatgctccaaatgggtcactactgtgattccgctggtatggaccgaagtata
taacacagtcctccgatccttctactccatctgtagaacaatgcaaggaaagcattgaacaaacgaacaaggaactggctgaatccaggc
ttccctcctcaaagttgtggatatgcaactgtgacggatgccgaagcagtgattgtccaggtgactcctcaccatgtgctggttgatgaataca

caggagaatgggttgattcacagttcatcaacggaaaatgcagcaattacatatgccccactgtccataactctacaacctggcattctgacta
 taaggatcaagggtatgtgattctaacctcatttccatggacatcaccttctctcagaggacggagagctatcatccctgggaaaggaggg
 cacagggttcagaagtaactactttgcttatgaaactggaggcaaggcctgcaaaatgcaatactgcaagcattggggagtcagactcccat
 cagggtgtctggttcgagatggctgataaggatctcttctgtcagccagattccctgaatgccagaagggtcaagtatctctgtccatctca
 gacctcagtggaatgtaagtctaattcaggacgttgagaggatcttgattatccctctgccaagaaacctggagcaaaatcagagcgggtct
 tccaatctctccagtggaatctcagctatcttct
 gaccagatacatcagagtcgataattgctgctccaatctctcaagaatggctggaatgatcagtggaactaccacagaaagggaactgtgg
 gatgactgggcaccatatgaagacgtggaaattggacccaatggagttctgaggaccagttcaggatataagtttctttatacatgattggac
 atgggtatgttgactccgatcttcatcttagctcaaaggctcaggtgttcgaacatctcacattcaagacgtcttcgcaacttctgatgatg
 agagtttatttttgggtgatactgggctatccaaaaatccaatcgagcttgtagaagggtgggtcagtagttggaaaagctctattgcctcttttct
 ttatcataggggtaatcattggactattcttgggtctccagttggatccatcttgcattaaattaagcacaccaagaaaagacagattataca
 gacatagagatgaaccgacttggaaagtaa

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

MKCLLYLAFLFIGVNCFTIVFPHNQKGNWKNVPSNYHYCPSSSDLNWHNDLIG
 TAIQVKMPKSHKAIQADGWMCHASKWVTTCDFRWYGPKYITQSIRSFTPSVEQCKESIE
 QTKQGTWLNPGFPPQSCGYATVTDAAEAVIVQVTPHHVLVDEYTGEWVDSQFINGKCSN
 YICPTVHNSTTWHSYKVKGLCDSNLISMDITFFSEDGELSSLGKEGTGFRSNYFAYETG
 GKACKMQYCKHWGVRLPSGVWFEMADKDLFAAARFPECPEGSSISAPSQTSVDVSLIQ
 DVERILDYSLCQETWSKIRAGLPISPVDLSYLAPKNPGTGPAFTIINGTLKYFETRYIRVDI
 AAPILSRMVGMISGTTTERELWDDWAPYEDVEIGPNGVLRRTSSGYKFPLYMIGHGMLDS
 DLHLSSKAQVFEHPHIQDAASQLPDDESLLFFGDTGLSKNPIELVEGWFWSSWKSSIASFFFI
 GLIIGLFLVLRVGIHLCKIKLHTKKRQIYTDIEMNRLGK

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

KFTIVFPHNQKGNWKNVPSNYHYCPSSSDLNWHNDLIGTAIQVKMPKSHKAIQA
 DGWMCHASKWVTTCDFRWYGPKYITQSIRSFTPSVEQCKESIEQTKQGTWLNPGFPPQS
 CGYATVTDAAEAVIVQVTPHHVLVDEYTGEWVDSQFINGKCSNYICPTVHNSTTWHSY
 KVKGLCDSNLISMDITFFSEDGELSSLGKEGTGFRSNYFAYETGGKACKMQYCKHWGV
 RLPSGVWFEMADKDLFAAARFPECPEGSSISAPSQTSVDVSLIQDVERILDYSLCQETWS
 KIRAGLPISPVDLSYLAPKNPGTGPAFTIINGTLKYFETRYIRVDIAAPILSRMVGMISGTT
 TERELWDDWAPYEDVEIGPNGVLRRTSSGYKFPLYMIGHGMLDSDLHLSSKAQVFEHPHI
 QDAASQLPDDESLLFFGDTGLSKNPIELVEGWFWSSWKSSIASFFFIIGLIIGLFLVLRVGIHL
 CKIKLHTKKRQIYTDIEMNRLGK

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

atgaagtgcctttttagcttagccttttattcattgggggaattgcaagttcaccatagttttccacacaacaaaaaggaaactgg
 aaaaatgttcttctaattaccattattgcccgtcaagctcagatttaattggcataatgacttaataggcacagccttacaagtcaaaatgcc
 cagagtcacaaggctattcaagcagacgggttgatgtgtcatgctccaaatgggtcactactgtgatttccgctggatggaccgaagtata
 taacacagtcctccgatccttctcctcatctgtagaacaatgcaaggaaagcattgaacaaacgaacaaaggaactggctgaatccaggc

ttccctctcaaaagtgtggatgatgcaactgtgacggatgccgaagcagtgattgtccaggtgactcctaccatgtgctggtgatgaataca
 caggagaatgggttgattcacagttcatcaacggaaaatgcagcaattacatatgccccactgtccataactctacaacctggcattctgacta
 taaggatcaaaaggctatgtgattctaacctcatttccatggacatcaccttctctcagaggacggagagctatcatccctgggaaaggaggg
 cacaggggtcagaagtaactactttgcttatgaaactggaggcaaggcctgcaaaatgcaatactgcaagcattggggagtcagactcccat
 caggtgtctgggtcgagatggctgataaggatctcttctgctgcagccagattccctgaatgccagaagggtcaagtatctctgctccatctca
 gacctcagtggaatgtaagtctaattcaggacgttgagaggatcttgattatccctctgccaagaaacctggagcaaaatcagagcgggtct
 tccaatctctccagtggaatcagctatcttctctctaaaaaccaggaaccggctctgcttcaccataatcaatggtaccctaaaaatacttga
 gaccagatacatcagagtcgatatgtctccaatcctctcaagaatggtcggaatgatcagtggaactaccacagaagccgaactgtggg
 atgactgggcaccatatgaagacgtggaaattggacccaatggagttctgaggaccagttcaggatataagtttctttatacatgattggaca
 tggatgttggactccgactctcatcttagctcaaaggctcaggtgttcgaacatcctcacattcaagacgctgcttcgcaactctctgatgatga
 gagtttatttttgggtgatactgggctatccaaaaatccaatcgagctttagaagggttggttcagtagttggaaaagctctattgctctttttctt
 tatcataggggttaactattggactattcttgggtctccgagttggatccatcttgcattaaattaaagcacaccaagaaaagacagattataca
 gacatagagatgaaccgacttggaagtaa

> Блок оболочки VSV-G (с лидерной последовательностью), аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 15):

MKCLLYLAFLFIGVNCKFTIVFPHNQKGNWKNVPSNYHYCPSSSDLNWHNDLIG
 TALQVKMPQSHKAIQADGWMCHASKWVTTCDFRWYGPKYITQSIRSFTPSVEQCKESIE
 QTKQGTWLNPGFPPQSCGYATVTDAEAVIVQVTPHHVLVDEYTGEWVDSQFINGKCSN
 YICPTVHNSTTWHSYKVKGLCDSNLISMDITFFSEDGELSSLGKEGTGFRSNYFAYETG
 GKACKMQYCKHWGVRLPSGVWFEMADKDLFAAARFPECPEGSSISAPSQTSVDVSLIQ
 DVERILDYSLCQETWSKIRAGLPISPVDLSYLAPKNPGTGPAFTIINGTLKYFETRYIRVDI
 AAPILSRMVGMISGTTTEAELWDDWAPYEDVEIGPNGVLRRTSSGYKFPLYMIGHGMLDS
 DLHLSSKAQVFEHPHIQDAASQLPDDESLEFFGDTGLSKNPIELVEGWFWSSWKSSIASFFFII
 GLIIGLFLVLRVGIHLCKIKLHHTKKRQIYTDIEMNRLGK

> Блок оболочки VSV-G I41L/K47Q/R354A, аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 16):

KFTIVFPHNQKGNWKNVPSNYHYCPSSSDLNWHNDLIGTALQVKMPQSHKAIQ
 ADGWMCHASKWVTTCDFRWYGPKYITQSIRSFTPSVEQCKESIEQTKQGTWLNPGFPPQ
 SCGYATVTDAEAVIVQVTPHHVLVDEYTGEWVDSQFINGKCSNYICPTVHNSTTWHSY
 YKVKGLCDSNLISMDITFFSEDGELSSLGKEGTGFRSNYFAYETGGKACKMQYCKHWG
 VRLPSGVWFEMADKDLFAAARFPECPEGSSISAPSQTSVDVSLIQDVERILDYSLCQETW
 SKIRAGLPISPVDLSYLAPKNPGTGPAFTIINGTLKYFETRYIRVDIAAPILSRMVGMISGT
 TTEAELWDDWAPYEDVEIGPNGVLRRTSSGYKFPLYMIGHGMLDSDLHLSSKAQVFEHP
 HIQDAASQLPDDESLEFFGDTGLSKNPIELVEGWFWSSWKSSIASFFFII
 GLIIGLFLVLRVGIHLCKIKLHHTKKRQIYTDIEMNRLGK

> Блок оболочки VSV-G K47Q/R354A, аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 17):

KFTIVFPHNQKGNWKNVPSNYHYCPSSSDLNWHNDLIGTAIQVKMPQSHKAIQA
 DGWMCHASKWVTTCDFRWYGPKYITQSIRSFTPSVEQCKESIEQTKQGTWLNPGFPPQS
 CGYATVTDAEAVIVQVTPHHVLVDEYTGEWVDSQFINGKCSNYICPTVHNSTTWHSY

KVKGLCDSNLISMDITFFSEDGELSSLGKEGTGFRSNYFAYETGGKACKMQYCKHWGV
 RLPSGVWFEMADKDLFAAARFPECPEGSSISAPSQTSVDVSLIQDVERILDYSLCQETWS
 KIRAGLPISPDLSYLA PKNPGTGPAFTIINGTLKYFETRYIRVDIAAPILSRMVGMISGTT
 TEAELWDDWAPYEDVEIGPNGVLRTSSGYKFPLYMIGHGMLDSDLHLSSKAQVFEHPHI
 QDAASQLPDDES LFFGDTGLSKNPIELVEGW FSSWKSSIASFFFIIGLIIGLFLVLRVGIHLC
 IKLKHTKKRQIYTDIEMNRLGK

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

ATGGGCAGCCGATCGTGATCAACCGGGAGCACCTGATGATCGACCGGCCCT
 ACGTGCTGCTGGCCGTGCTGTTCGTGATGTTCTGAGCCTGATCGGCTTGCTAGCCA
 TTGCTGGAATCCGGCTGCACAGAGCCGCCATCTACACCGCCGAGATCCACAAGAGC
 CTGAGCACCAACCTGGACGTGACCAACAGCATCGAGCATCAGGTCAAGGACGTGCT
 GACCCCCCTGTTTAAGATCATCGGCGACGAAGTGGGCCTGCGGACCCCCCAGAGAT
 TCACCGACCTGGTCAAGTTCATCAGCGACAAGATCAAGTTCCTGAACCCCGACCGG
 GAGTACGACTTCCGGGACCTGACCTGGTGCATCAACCCCCCGAGCGGATCAAGCT
 GGACTACGACCAGTACTGCGCCGATGTGGCCGCCGAGGAACTGATGAATGCATTGG
 TGA ACTCAACTCTACTGGAGACCAGAACAACCAATCAGTTCCTAGCTGTCTCAAAGG
 GAAACTGCTCAGGGCCCACTACAATCAGAGGTCAATTCTCAAACATGTCGCTGTCCC
 TGTTAGACTTGTATTTAGGTTCGAGGTTACAATGTGTCATCTATAGTCACTATGACATC
 CCAGGGAATGTATGGGGGAACTTACCTAGTGGA AAAAGCCTAATCTGAGCAGCAAAA
 GGTCAGAGTTGTCACAACTGAGCATGTACCGAGTGTTTGAAGTAGGTGTTATCAGAA
 ATCCGGGTTTGGGGGCTCCGGTGTTCATATGACAAACTATCTTGAGCAACCAGTCA
 GTAATGATCTCAGCAACTGTATGGTGGCTTTGGGGGAGCTCAA ACTCGCAGCCCTTT
 GTCACGGGGAAGATTCTATCACAATTCCTATCAGGGATCAGGGAAAGGTGTCAGC
 TTCCAGCTCGTCAAGCTAGGTGTCTGGAAATCCCCAACCGACATGCAATCCTGGGTC
 CCCTTATCAACGGATGATCCAGTGATAGACAGGCTTTACCTCTCATCTCACAGAGGT
 GTTATCGCTGACAACCAAGCAAAAATGGGCTGTCCCGACAACACGAACAGATGACAA
 GTTGCGAATGGAGACATGCTTCCAACAGGCGTGTAAGGGTAAAATCCAAGCACTCT
 GCGAGAATCCCGAGTGGGCACCATTGAAGGATAACAGGATTTCCTTCATACGGGGTC
 TTGTCTGTTGATCTGAGTCTGACAGTTGAGCTTAAAATCAAAATTGCTTCGGGATTC
 GGGCCATTGATCACACACGGTTCAGGGATGGACCTATACAAATCCAACCACAACAA
 TGTGTATTGGCTGACTATCCCGCCAATGAAGAACCTAGCCTTAGGTGTAATCAACAC
 ATTGGAGTGGATACCGAGATTCAAGGTTAGTCCCtatCTCTTCaGTCCCAATTAAGG
 AAGCAGGCGGAGACTGCCATGCCCCAACATACTACCTGCGGAGGTGGATGGTGAT
 GTCAA ACTCAGTTC AATCTGGTGATTCTACCTGGTCAAGATCTCCAATATGTTTTGG
 CAACCTACGATACTTCCcgGGTTGAACATGCTGTGGTTTATTACGTTTACAGCCCAAG
 CCGCTCATTTTCTTACTTTTATCCTTTTAGGTTGCCTATAAAGGGGGTCCCCATCGAA
 TTACAAGTGGAATGCTTCACATGGGACCAAAAACTCTGGTGCCGTCACCTTCTGTGTG
 CTTGCGGACTCAGAATCTGGTGGACATATCACTCACTCTGGGATGGTGGGCATGGGA
 GTCAGCTGCACAGTCACCCGGGAAGATGGAACCAATGACTACAAAGACGATGACGA

CAAGTGA

> Примерный белок оболочки кори дикого типа, аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 19):

MGSRIVINREHLMIDRPYVLLAVLFVFMFLSLIGLLAIAGIRLHRAAIYTAEIHKSLS
TNLDVTNSIEHQVKDVLTPLFKIIGDEVGLRTPQRFTDLVKFISDKIKFLNPDREYDFRDL
TWCINPPERIKLDYDQYCADVAAEELMNALVNSTLLETTRTNQFLAVSKGNCSGPTTIR
GQFSNMSLSLLDLYLGRGYNVSSIVTMTSQGMYG GTYLVEKPNLSSKRSELSQLSMYR
VFEVGVIRNPGLGAPVFHMTNYLEQPVSNDSLNIQMBALGELKLAALCHGEDSITIPYQG
SGKGVSFQLVKLG VWKSP TDMQSWVPLSTDDPVIDRLYLSSH RGV IADNQA KWA VPTT
RTDDKLRMETCFQQACKGKIQA L CENPEWAPLKDN RIPS YGVLSVDLSLTVELKIKIASG
FGPLITHGSGMDLYKSNHNNVYWLTI PPMKNLALGVINTLEWIPRFKVSPYLFTVPIKEA
GGDCHAPTYLPAEVDGDVKLSSNLVILPGQDLQYVLATYDTSRVEHAVVYYVYSPSR
FSYFYPPFRLPIKGVPIELQVECF TWDQKLWCRHFCVLADSESGGHITHSGMVG MGV SCT
VTREDGTNDYKDDDDK

> Примерный мутантный белок оболочки кори, последовательность ДНК (SEQ ID NO: 20):

ATGGGCAGCCGGATCGTGATCAACCGGGAGCACCTGATGATCGACCGGCCCT
ACGTGCTGCTGGCCGTGCTGTTCGTGATGTTCTGAGCCTGATCGGCTTGCTAGCCA
TTGCTGGAATCCGGCTGCACAGAGCCGCCATCTACACCGCCGAGATCCACAAGAGC
CTGAGCACCAACCTGGACGTGACCAACAGCATCGAGCATCAGGTCAAGGACGTGCT
GACCCCCCTGTTTAAGATCATCGGCGACGAAGTGGGCCTGCGGACCCCCCAGAGAT
TCACCGACCTGGTCAAGTTCATCAGCGACAAGATCAAGTTCCTGAACCCCGACCGG
GAGTACGACTTCCGGGACCTGACCTGGTGCATCAACCCCCCGAGCGGATCAAGCT
GGACTACGACCAGTACTGCGCCGATGTGGCCGCCGAGGAACTGATGAATGCATTGG
TGA ACTCAACTCTACTGGAGACCAGAACAAACCAATCAGTTCCTAGCTGTCTCAAAGG
GAAACTGCTCAGGGCCCACTACAATCAGAGGTCAATTCTCAAACATGTCGCTGTCCC
TGTTAGACTTGTATTTAGGTTCGAGGTTACAATGTGTGCATCTATAGTCACTATGACATC
CCAGGGAATGTATGGGGGAACTTACCTAGTGGAAGAGCCTAATCTGAGCAGCAAAA
GGTCAGAGTTGTCACAACTGAGCATGTACCGAGTGTTTGAAGTAGGTGTTATCAGAA
ATCCGGGTTTGGGGGCTCCGGTGTTCATATGACAACTATCTTGAGCAACCAGTCA
GTAATGATCTCAGCAACTGTATGGTGGCTTTGGGGGAGCTCAAACCTCGCAGCCCTTT
GTCACGGGGAAGATTCTATCACAATTCCTATCAGGGATCAGGGAAAGGTGTCAGC
TTCCAGCTCGTCAAGCTAGGTGTCTGGAAATCCCCAACCGACATGCAATCCTGGGTC
CCCTTATCAACGGATGATCCAGTGATAGACAGGCTTTACCTCTCATCTCACAGAGGT
GTTATCGCTGACAACCAAGCAAAAATGGGCTGTCCCGACAACACGAACAGATGACAA
GTTGCGAATGGAGACATGCTTCCAACAGGCGTGTAAGGGTAAAATCCAAGCACTCT
GCGAGAATCCCGAGTGGGCACCATTAAGGATAACAGGATTCTTCATACGGGGTCT
TTGTCTGTTGATCTGAGTCTGACAGTTGAGCTTAAAATCAAAATTGCTTCGGGATTC
GGGCCATTGATCACACACGGTTCAGGGATGGACCTATACAAATCCAACCACAACAA
TGTGTATTGGCTGACTATCCCGCCAATGAAGAACCTAGCCTTAGGTGTAATCAACAC

ATTGGAGTGGATACCGAGATTCAAGGTTAGTCCCGCGCTCTTCAATGTCCCAATTAA
 GGAAGCAGGCGGAGACTGCCATGCCCCAACATACCTACCTGCGGAGGTGGATGGTG
 ATGTCAAACCTCAGTTCCAATCTGGTGATTCTACCTGGTCAAGATCTCCAATATGTTTT
 GGCAACCTACGATACTTCCGCGGTTGAACATGCTGTGGTTTATTACGTTTACAGCCC
 AAGCCGCTCATTTTCTTACTTTTATCCTTTTAGGTTGCCTATAAAGGGGGTCCCCATC
 GAATTACAAGTGGAATGCTTCACATGGGACCAAAAACTCTGGTGCCGTCACCTTCTGT
 GTGCTTGCGGACTCAGAATCTGGTGGACATATCACTCACTCTGGGATGGTGGGCATG
 GGAGTCAGCTGCACAGTCACCCGGGAAGATGGAACCAATGACTACAAAGACGATGA
 CGACAAGTGA

> Примерный мутантный белок оболочки кори, аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 21):

MGSRIVINREHLMIDRPYVLLAVLFVMFLSLIGLLAIAGIRLHRAAIYTAEIHKSLS
 TNLDVTNSIEHQVKDVLTPFKIIGDEVGLRTPQRFTDLVKFISDKIKFLNPDREYDFRDL
 TWCINPPERIKLDYDQYCADVAAEELMNALVNSTLLETRTTNQFLAVSKGNCSGPTTIR
 GQFSNMSLSLLDLYLGRGYNVSSIVTMTSQGMYGTYLVEKPNLSSKRSELSQLSMYR
 VFEVGVIRNPGLGAPVFHMTNYLEQPVSNDSLNIQMBALGELKLAALCHGEDSITIPYQG
 SGKGVSFQLVKLGWKSPTDMQSWVPLSTDDPVIDRLYLSSHRGVIADNQAKWAVPTT
 RTDDKLRMETCFQQACKGKIQALCENPEWAPLKDNRIPSYGVLSVDLSLTVELKIKIASG
 FGPLITHGSGMDLYKSNHNNVYWLTIIPPMKNLALGVINTLEWIPRFKVSPALFNVPIKEA
 GGDCHAPTYLPAEVDGDVKLSSNLVILPGQDLQYVLATYDTSAVEHAVVYYVYSPSR
 FSYFYPPFRLPIKGVPIELQVECFWDQKLWCRHFCVLADSESGGHITHSGMVGMGVSCT
 VTREDGTNDYKDDDDK

> Примерный мутантный белок оболочки Нипах, последовательность ДНК (SEQ ID NO: 22):

ATGAAGAAGATCAACGAGGGCCTGCTGGACAGCAAGATCCTGAGCGCCTTCA
 ACACCGTGATTGCCCTGCTGGGCTCTATCGTGATCATCGTGATGAACATCATGATCA
 TCCAGAACTACACCCGGTCCACCGACAACCAGGCCGTGATTAAGGATGCTCTGCAG
 GGAATCCAGCAGCAGATCAAAGGCCTGGCCGACAAGATCGGCACAGAGATCGGCCC
 TAAGGTGTCCCTGATCGACACCAGCAGCACCATCACAATCCCCGCCAATATCGGACT
 GCTGGGAAGCAAGATCAGCCAGAGCACC GCCAGCATCAACGAGAACGTGAACGAG
 AAGTGCAAGTTCACCCTGCCTCCACTGAAGATCCACGAGTGCAACATCAGCTGCCCC
 AATCCTCTGCCATTACAGAGAGTACAGACCCACAGAGAGGGCGTGTCCAATCTCGT
 GGGCCTGCCTAACAAACATCTGCCTGCAGAAAACCAGCAACCAGATCCTGAAGCCTA
 AGCTGATCTCCTACACACTGCCCCGTCGTGGGCCAGAGCGGCACCTGTATTACAGATC
 CTCTGCTGGCCATGGACGAGGGCTACTTTGCCTACAGCCACCTGGAAAGAATCGGC
 AGCTGTAGCCGGGGAGTGTCCAAGCAGAGAATCATCGGCGTGGGCGAAGTGCTGGA
 TAGAGGCGACGAAGTGCCAGCCTGTTTCATGACCAATGTGTGGACCCCTCCTAATCC
 TAACACCGTGTACCACTGCAGCGCCGTGTACAACAACGAGTTCTACTACGTGCTGTG
 CGCCGTGTCCACAGTGGGCGACCCTATCCTGAACAGCACCTATTGGAGCGGCAGCCT
 GATGATGACCAGACTGGCCGTGAAGCCCAAGAGCAATGGCGGCGGATACAACCAGC

ATCAGCTGGCCCTGCGGTCCATCGAGAAGGGCAGATACGACAAAGTGATGCCTTAC
 GGCCCCAGCGGCATCAAGCAAGGCGATACCCTGTACTTTCCCGCCGTGGGATTTCTC
 GTGCGGACCGAGTTCAAGTACAACGACAGCAACTGCCCCATCACCAAGTGCCAGTA
 CAGCAAGCCCCGAGAACTGCAGACTGAGCATGGGCATCAGACCCAACAGCCACTACA
 TCCTGAGAAGCGGCCTGCTGAAGTACAACCTGAGCGACGGCGAGAACCCCAAGGTG
 GTGTTTCATCGAGATCAGCGACCAGCGGCTGTCTATCGGCAGCCCCCTCCAAGATCTAC
 GACTCTCTGGGCCAGCCAGTGTTCTACCAGGCCAGCTTTAGCTGGGACACCATGATC
 AAGTTCGGCGACGTGCTGACCGTGAATCCCCTGGTGGTCAACTGGCGGAACAATAC
 CGTGATCAGCCGGCCTGGCCAGTCTCAGTGCCCCAGATTCAATACCTGTCCTGCCAT
 TTGCGCCGAAGGCGTGTACAATGACGCCTTCCTGATCGATCGGATCAACTGGATCTC
 TGCCGGCGTGTTCTTGACTCTAATGCCACAGCCGCCAATCCTGTGTTACCCGTGTT
 CAAGGACAATGAGATCCTGTATCGGGCCCAGCTGGCCTCCGAGGACACAAATGCCC
 AGAAAACAATCACCAACTGCTTTCTGCTCAAGAACAAGATCTGGTGCATCAGCCTG
 GTGGAAATCTACGACACCGGCGACAACGTGATCAGGCCCAAGCTGTTCGCCGTGAA
 GATCCCTGAGCAGTGTACAGGCGGCGGAGGATCTGGCGGAGGTGGAAGCGGAGGC
 GGTGGATCTGCTAGCGATTACAAGGATGACGACGATAAGTGA

> Примерный мутантный белок оболочки Нипах, аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 23):

MKKINEGLLDKILSAFNTVIALLGSIIVMNIMIIQNYTRSTDNQAVIKDALQGI
 QQQIKGLADKIGTEIGPKVSLIDTSSTITIPANIGLLGSKISQSTASINENVNEKCKFTLPPL
 KIHECNISCPNPLPFREYRPQTEGVSNLVGLPNNICLQKTSNQILKPKLISYTLPPVVGQSGT
 CITDPLLAMDEGYFAYSHLERIGSCSRGVSKQRIIGVGEVLDRGDEVPSLFMTNVWTPPN
 PNTVYHCSAVYNNEFYVLCVSTVGDPIINSTYWSGLMMTRLAVKPKSNGGGYNQ
 HQLALRSIEKGRYDKVMPYGPSGIKQGDTLYFPAVGFLVRTEFKYNDNSNCPITKCQYSK
 PENCRLSMGIRPNSHYILRSGLLKYNLSDGENPKVVFIEISDQRLSIGSPSKIYDSLQGPVF
 YQASFSWDTMIKFGDVLTVNPLVVNWRNNTVISRPGQSQCPRENTCPAICAEGVYNDAF
 LIDRINWISAGVFLDSNATAANPVFTVFKDNEILYRAQLASEDTNAQKTTITNCFLLNKI
 WCISLVEIYDTGDNVIRPKLFAVKIPEQCTGGGGSGGGGSGGGGSASDYKDDDDK

> TCR IG4 (Вариант, который связывается с антигеном NYESO-1 с аффинностью связывания 32 мкМ), аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 24):

MSIGLLCCAALSLLWAGPVNAGVTQTPKFQVLKTGQSMTLQCAQDMNHEYMS
 WYRQDPGMGLRLIHYSVGAGITDQGEVPNGYNVSRSTTEDFPLRLLSAAPSQTSVYFCA
 SSVVGNTGELFFGEGSRLTVLEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPD
 HVELSWWWNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSAFWQNPRNHFRQC
 VQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATILYEILLGKA
 TLYAVLVSAVLMMAMVKRKDSRGGSATNFSLLKQAGDVEENPGPMETLLGLLILWLQL
 QWVSSKQEVTPAALSVEGENLVNCSFTDSAIYNLQWFRQDPGKGLTSLLLIQSSQR
 EQTSGRLNASLDKSSGSSTLYIAASQPGDSATYLC AVRPTSGGSYIPTFGRGTS LIVHPYI
 QNPDPVAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKSDSVYITDKTVLDMRSMDFKSNS
 AVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDTNLNFQNLSVIGFRI

LLLKVAGFNLLMTLRLWSSAAA

> TCR IG4 (Вариант, который связывается с антигеном NYESO-1 с аффинностью связывания 84 нМ), аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 25):

MSIGLLCCAALSLLWAGPVNAGVTQTPKFQVLKTGQSMTLQCAQDMNHEYMS
WYRQDPGMGLRLIHYSVGAQTDDQGEVPNGYNVSRSTIEDFPLRLLSAAPSQTSVYFCA
SSYLGNLTGELFFGEGSRLTVLEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPD
HVELSWWWNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRCQ
VQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATILYEILLGKA
TLYAVLVSAVLMLAMVVKRKDSRGGSATNFSLLKQAGDVEENPGPMETLLGLLILWLQL
QWVSSKQEVTPIPAALSVPEGENLVLNCSFTDSAIYNLQWFRQDPGKGLTSLLLIQSSQR
EQTSGRNLNASLDKSSGSSTLYIAASQPGDSATYLC AVRPMIGGTIYPTFGRGTSLIVHPYI
QNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNS
AVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDTNLNLFQNLSVIGFRI
LLLKVAGFNLLMTLRLWSSAAA

> TCR IG4 (Вариант, который связывается с антигеном NYESO-1 с аффинностью связывания 5 нМ), аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 26):

MSIGLLCCAALSLLWAGPVNAGVTQTPKFQVLKTGQSMTLQCAQDMNHEYMS
WYRQDPGMGLRLIHYSVGAGTTDRGEVPNGYNVSRSTIEDFPLRLLSAAPSQTSVYFCA
SSYVGDTGELFFGEGSRLTVLEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPD
HVELSWWWNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRCQ
VQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATILYEILLGKA
TLYAVLVSAVLMLAMVVKRKDSRGGSATNFSLLKQAGDVEENPGPMETLLGLLILWLQL
QWVSSKQEVTPIPAALSVPEGENLVLNCSFTDSAIYNLQWFRQDPGKGLTSLLLIQSSQR
EQTSGRNLNASLDKSSGSSTLYIAASQPGDSATYLC AVRPLLDGTIYPTFGRGTSLIVHPYI
QNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNS
AVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDTNLNLFQNLSVIGFRI
LLLKVAGFNLLMTLRLWSSAAA

> TCR IG4 (Вариант, который связывается с антигеном NYESO-1 с аффинностью связывания 26 пМ), аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 27):

MSIGLLCCAALSLLWAGPVNAGVTQTPKFQVLKTGQSMTLQCAQDMNHEYMS
WYRQDPGMGLRLIHYSVAIQTTDDQGEVPNGYNVSRSTIEDFPLRLLSAAPSQTSVYFCAS
SYLGNTGELFFGEGSRLTVLEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDH
VELSWWWNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRCQV
QFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATILYEILLGKAT
LYAVLVSAVLMLAMVVKRKDSRGGSATNFSLLKQAGDVEENPGPMETLLGLLILWLQLQ
WVSSKQEVTPIPAALSVPEGENLVLNCSFTDSAIYNLQWFRQDPGKGLTSLLLITPWQRE
QTSGRNLNASLDKSSGSSTLYIAASQPGDSATYLC AVRPLLDGTIYPTFGRGTSLIVHPYIQ
NPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSA
VAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDTNLNLFQNLSVIGFRILL
LKVAGFNLLMTLRLWSSAAA

> 868 TCR (бета цепь-P2A-альфа цепь), аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 31):

MSIGLLCCAALSLLWAGPVNADAGVTQSPTHLIKTRGQQVTLRCSKQGHDTVS
WYQQALGQGPQFIFQYEEEEERQGRNFPDRFSGHQFPNYSELNVNALLGDSALYLCA
SSDTVSYEQYFGPGTRLTVTEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYDPH
VELSWWVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQDPRNHFRQV
QFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATILYEILLGKAT
LYAVLVSAVLMLMAMVKRKDSRGGSATNFSLLKQAGDVEENPGPMETLLGLLILWLQLQ
WVSSKEVEQNSGPLSVPEGAIASLNCTYSRGSQSFFWYRQYSGKSPELIMFIYSNGDKE
DGRFTAQLNKASQYISLLIRDSKLSDSATYLCVARTNSGYALNFGKGTSLLVTPHIQKPD
PAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVA
WSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDTNLNFQNLSVIGFRILLK
VAGFNLLMTLRLWSS

> TCR C7 ЦМБ, аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 33):
MGTRLLFWVAFCLLGADHTGAGVSQSPSNKVTEKGDVELRCDPISGHTALYWYRQR
LGQGLEFLIYFQNSAPDKSGLPSDRFSAERTGESVSTLTQRTQQEDSAVYLCASSQTQL
WETQYFGPGTRLVLEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYDPHVELS
WWVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPARNHFRQVQFY
GLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATILYEILLGKATLYA
VLVSALVLMAMVKRKDSRGGSATNFSLLKQAGDVEENPGPMEKNPLAAPLLILWFHLD
CVSSILNVEQSPQSLHVQEGDSTNFTCSFPSSNFYALHWYRWETAKSPEALFVMTLNGD
EKKKGRISATLNTKEGYSLYIKGSQPEDSATYLCAFITGNQFYFGTGTSITVIPNIQNP
PAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVA
WSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDTNLNFQNLSVIGFRILLK
VAGFNLLMTLRLWSSAAA

> SL9 pMHC (часть пептида SL9 выделена жирным шрифтом), аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 35):
MSRSVALAVLALLSLSGLEAS**LYNTVATL**GGGASGGGGSGGGGSIQRTPKIQVYSRHPA
ENGKSNFLNCYVSGFHPSDIEVDLLKNGERIEKVEHSDLSFSKDWSFYLLYYTEFTPEK
DEYACRVNHVTLSPKIVKWDRDMGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSHSMRYFFTSVSRP
GRGEPRFIAVGYYDDTQFVRFDSDAASQRMEPRAPWIEQEGPEYWDGETRKKVKAHSQT
HRVDLGTLRGAYNQSEAGSHTVQRMYGCDVGSWDRFLRGYHQYAYDGKDYIALKED
LRSWTAADMAAQTTKHKWEAAHVAEQLRAYLEGTCVEWLRRYLENGKETLQRTDAP
KTHMTHHAVSDHEATLRCWALSFYPAEITLTWQRDGEDQTQDTELVETRPAGDGTFFQK
WAAVVVPSGQEQRYTCHVQHEGLPKPLTLRWEPSQPTIPVGIAGLVLFGAVITGAVV
AAVMWRRKSS

> ЦМБ pMHC (часть пептида NLV ЦМБ выделена жирным шрифтом), аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 37):

MSRSVALAVLALLSLSGLEAN**L**VPMVATV**G**ASGGSGGGSGGGGSIQRTPKIQVY
SRHPAENGKSNFLNCYVSGFHPSDIEVDLLKNGERIEKVEHSDLSFSKDWSFYLLYYTEF

TPTEKDEYACRVNHVTLSPKIVKWDRDMGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSHSMRYFFT
SVSRPGRGEPRFIAVGYYDDTQFVRFDSDAASQRMEPRAPWIEQEGPEYWDGETRQVK
AHSQTHRVLDGLTRGAYNQSEAGSHTVQRMYGCDVGSWDRFLRGYHQYAYDGKDYI
ALKEDLRSWTAADMAAQTTHKWEAAHVAEQLRAYLEGTCVEWLRRYLENGKETLQ
RTDAPKTHMTHHAYSDHEATLRCWALSFPYAEITLTWQRDGEDQTQDTELVEPTRAGD
GTFQKWAAYVVVPSGQEQRYSCHVQHEGLPKPLTLRWEPSSQPTIPVGIAGLVLFGLV
TGAVVAAMWRRKSS

> дисульфидная ловушка МНС, включающая мутацию Y84C (выделена жирным шрифтом) и C в положении 2 линкера (выделено жирным шрифтом); показана с сигнальным пептидом HGH (подчеркнут) и пептидом GL9 (выделен курсивом), аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 39):

MATGSRTSLLLAFLGLCLPWLQEGSAGILGFVFTLGCSSGGSGGGSGGGGSIQRTPK
KIQVYSRHPAENGKSNFLNCYVSGFHPSDIEVDLLKNGERIEKVEHSDLSFSKDWSFYLL
YYTEFTPTEKDEYACRVNHVTLSPKIVKWDRDMGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSHS
MRYFFTSVSRPGRGEPRFIAVGYYDDTQFVRFDSDAASQRMEPRAPWIEQEGPEYWDG
ETRQVKAHSQTHRVLDGLTRGCYNQSEAGSHTVQRMYGCDVGSWDRFLRGYHQYAY
DGKDYIALKEDLRSWTAADMAAQTTHKWEAAHVAEQLRAYLEGTCVEWLRRYLEN
GKETLQRTDAPKTHMTHHAYSDHEATLRCWALSFPYAEITLTWQRDGEDQTQDTELVE
PTRAGDGTFQKWAAYVVVPSGQEQRYSCHVQHEGLPKPLTLRWEPSSQPTIPVGIAGLV
LFGLVITGAVVAAMWRRKSS

> GL9 pMHC (часть пептида GL9 выделена жирным шрифтом), аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 41):

MSRSVALAVLALLSLSGLEAG**ILGFVFTLGGGASGGGGSGGGGSIQRTPKIQVY**
SRHPAENGKSNFLNCYVSGFHPSDIEVDLLKNGERIEKVEHSDLSFSKDWSFYLLYYTEF
TPTEKDEYACRVNHVTLSPKIVKWDRDMGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSHSMRYFFT
SVSRPGRGEPRFIAVGYYDDTQFVRFDSDAASQRMEPRAPWIEQEGPEYWDGETRQVK
AHSQTHRVLDGLTRGAYNQSEAGSHTVQRMYGCDVGSWDRFLRGYHQYAYDGKDYI
ALKEDLRSWTAADMAAQTTHKWEAAHVAEQLRAYLEGTCVEWLRRYLENGKETLQ
RTDAPKTHMTHHAYSDHEATLRCWALSFPYAEITLTWQRDGEDQTQDTELVEPTRAGD
GTFQKWAAYVVVPSGQEQRYSCHVQHEGLPKPLTLRWEPSSQPTIPVGIAGLVLFGLV
TGAVVAAMWRRKSS

> CD80, аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 43):

MGHTRRQGTSPSKCPYLNFFQLLVLAGLSHFCSGVIHVTKEVKEVATLSCGHNV
SVEELAQTRIYWQKEKKMVLTMMSGDMNIWPEYKNRTIFDITNNLSIVILALRPSDEGT
YECVVLKYEKDAFKREHLAEVTLVKADFPTPSISDFEIPSTNIRRIICSTSGGFPEPHLSW
LENGEELNAINTTVSQDPETELYAVSSKLDFNMTTNHSFMCLIKYGHRLVNQTFNWNTT
KQEHFPDNLPSWAITLISVNGIFVICCLTYCFAPRCRE

> CD86, аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 45):

MDPQCTMGLSNILFVMAFLLSGAAPLKIQA YFNETADLPCQFANSQNQSLSELV
VFWQDQENLVLENYLGKEKFDSVHVKYMGRTSFDSDSWTLRLHNLQIKDKGLYQCII

HHKKPTGMIRIHQMNSELSVLNFSQPEIVPISNITENVYINLTCSSIHGYPEPKKMSVLLR
TKNSTIEYDGVMQKSQDNVTELYDVSISLSVSFPDVTSNMTIFCILETDKTRLLSSPFSIEL
EDPQPPPDHIPWITAVLPTVIICVMVFCLILWKWKKKKR

> мышинное Fab-антитело против TCR бета, Клон H57-597 (легкая цепь-P2A-тяжелая цепь, трансмембранный домен PDGFR), аминокислотная последовательность: (SEQ ID NO: 47):

METDTLLLWVLLLWVPGSTGADYKDDDDKDIQMTQSPSSLPASLGDRVTINCQ
ASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTNKLADGVPSRFSGSGSGRDSSFTISSLESEDIGS
YYCQQYYNYPWTFGPGTKLEIKRADAKPTVSIFPPSSEQLTGSATLVCFVNNFYFVKDIN
VKWKVDGSEKRDGVLQSVTDQDSKDYSLSSSTLSLTKADYERHNLYTCEVTHKTSTA
AIVKTLNRNECGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMVPCTLLLLLAAALAPTQTRAEVQLV
ESGGGLVQPGKSLKLSCEASGFTFSGYGMHWVRQAPGRGLESVAYITSSSINIKYADAV
KGRFTVSRDNAKNLLFLQMNILKSЭДТАМYYCARFDWDKNYWGQGTMTVTVSSAKTT
APSVYPLAPACDSTTSTNTVTLGCLVKGYFPEPVTVIWN SGALTSGVHTFPSVLHSGLY
SLSSSVTVPSSTWPSQTVTCNVAHPASSTTVDLKIEAVGQDTQEIVIVVPHSLPFKVVVISA
ILALVVLTHISLIILIMLWQKKPR

> мышинное Fab-антитело против CD3 эpsilon, Клон 145-2C11 (легкая цепь-P2A-тяжелая цепь, трансмембранный домен PDGFR), аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 49):

METDTLLLWVLLLWVPGSTGADYKDDDDKYELIQPSSASVTVGETVKITCSGDQ
LPKNFAYWFQQKSDKNILLIYMDNKRPSGIPERFSGSTSGTTATLTISGAQPEDEAAYY
CLSSYGDNDLVFGSGTQLTVLRGPKSSPKVTVFPPSPEELRTNKATLVCLVNDFYPGSA
TVTWKANGATINDGVKTTKPSKQGQNYMTSSYLSLTADQWKSHNRVSCQVTHEGETV
EKSLSPAEC LGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMVPCTLLLLLAAALAPTQTRAEVYLVE
SGGDLVQPGSSLKVSCAASGFTFSDFWMYWVRQAPGKGLEWVGRIKNIPNNYATEYA
DSVRGRFTISRDDSRNSIYLQMNRLRVDDTAIYYCTRAGRFDHFDYWGQGTMTVTVSSA
TTTAPSVYPLAPACDSTTSTTDTVTLGCLVKGYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPSVLHS
GLYSLSSSVTVPSSTWPKQPITCNVAHPASSTKVDKKIEPRAVGQDTQEIVIVVPHSLPFK
VVVISAILALVVLTHISLIILIMLWQKKPR*

> Гликопротеин вируса Кокал, аминокислотная последовательность: (SEQ ID NO: 51):

MNFLLLTFIVLPLCSHAKFSIVFPQSQKGNWKNVPSSYHYCPSSSDQNWHNDLLG
ITMKVKMPKTHKAIQADGWMCHAAKWITTCDFRWYGPKYITHSIHSIQPTSEQCKESIK
QTKQGTWMSPGFPPQNCGYATVTDVAVVVQATPHHVLVDEYTG EWIDSQFPNGKCE
TEECETVHNSTVWYS DYKVTGLCDATLVDEITFFSEDGKKESIGKPNTGYRSNYFAYE
KGDKVCKMNYCKHAGVRLPSGVWFEFVDQDVYAAAKLPECPVGATISAPTQTSVDVS
LILDVERILDYSLCQETWSKIRSKQPVSPVDSLAPKNPGTGPAFTIINGTLKYFETRYIR
IDIDNPIISKMVGKISGSQTERELWTEWFPYEGVEIGPNGILKTPTGYKFPLFMIGHGMLD
SDLHKTSQAEVFEHPLAEAPKQLPEEETLFFGDTGISKNPVELIEGWFWSSWKSTVVTFFF
AIGVFILLYVVARIVIAVRYRYQGSNNKRIYNDIEMSRFRK*

> Гликопротеин вируса Кокал, последовательность ДНК: (SEQ ID NO: 52):

ATGAAC~~TTTCTGCTGCTCACGTTTATCGTACTCCCGTTGTGCTCTCATGCGAA~~
~~ATTTTCAATAGTCTTTTCCTCAGTCCCAGAAAGGGAATTGGAAAAATGTTCCCTCCAG~~
~~TTACCACTATTGTCCCTCCTCCTCTGACCAAAACTGGCACAATGACTTGCTCGGGATT~~
~~ACAATGAAAGTAAAGATGCCGAAAACCCATAAAGCCATACAGGCGGATGGGTGGA~~
~~TGTGTCACGCTGCGAAGTGGATCACTACATGCGATTTCCGGTGGTATGGCCCTAAGT~~
~~ACATTACACACTCTATCCATAGCATAACAGCCGACATCAGAGCAATGCAAAGAGAGT~~
~~ATTAAACAGACCAACAAGGGACATGGATGAGCCCTGGCTTTCCACCTCAGAATTG~~
~~TGGGTACGCGACCGTCACGGATAGTGTGCTGTTGTGGTGCAGGCCACGCCACATCA~~
~~CGTACTCGTAGATGAATATACTGGTGAATGGATCGACTCCCAATTCCCGAATGGGAA~~
~~ATGTGAGACGGAAGAGTGCGAAACAGTGCATAACTCAACCGTTTGGTATTCCGATT~~
~~ACAAGGTTACTGGTCTTTGCGACGCCACCCTCGTGGATACCGAGATCACGTTTTTTA~~
~~GTGAGGATGGCAAGAAAGAGTCAATAGGCAAACCTAATACTGGCTACCGGAGTAAC~~
~~TATTTGCTTACGAGAAGGGTGACAAGGTATGTAAAATGAACTATTGCAAGCATGC~~
~~GGGAGTGCGACTCCCCAGTGGGGTATGGTTCGAATTTGTTGACCAAGACGTATACGC~~
~~CGCTGCGAAGTTGCCAGAATGCCCCGTAGGCGCGACCATTTACGCACCTACCCAAA~~
~~CGTCCGTTGACGTCTCCTTGATACTGGATGTAGAGCGAATCCTGGACTACAGTCTCT~~
~~GCCAGGAAACGTGGTCAAAAATAAGAAGTAAGCAGCCAGTTTCACCCGTGGATCTG~~
~~TCTTATCTGGCGCCAAAAAACCCGGGCACGGGCCCTGCTTTTACCATAATTAACGGA~~
~~ACGCTTAAATACTTCGAAACCCGCTACATTAGAATCGATATAGACAATCCTATTATC~~
~~AGCAAGATGGTAGGGAAGATATCTGGGTCTCAAACGGAGCGAGAATTGTGGACGGA~~
~~GTGGTTCCCTTATGAGGGAGTGGAATTGGGCCCAACGGGATCCTCAAGACCCCAA~~
~~CGGGTTACAAGTTCCTCTGTTTATGATCGGCCATGGCATGTTGGACAGTGA~~
~~ACTTGCACAAACATCTCAGGCAGAGGTTTTTCGAACATCCACATTTGGCGGAGGCGCCCAAG~~
~~CAACTTCCAGAAGAAGAACTCTCTTCTTTGGAGATACAGGCATTTCAAAAAATCCT~~
~~GTAGAACTGATAGAAGGGTGGTTCTCTTCTTGGAAATCAACGGTTGTCACGTTTTTC~~
~~TTTGCAATAGGCGTATTTATACTCCTGTACGTCGTAGCCCGCATTTGTGATCGCAGTA~~
~~CGATACAGATACCAGGGCAGTAACAATAAACGCATATATAATGACATCGAAATGTC~~
~~AAGGTTCCGAAAG~~tga

> Кокал-инактивированный (мутации для устранения нативного тропизма в белковой последовательности выделены жирным шрифтом; это K64Q и R371A, при нумерации от старт-кодона), аминокислотная последовательность: (SEQ ID NO: 53):

MN~~FLL~~LT~~FIV~~LPLCSHAKFSIVFPQ**SQ**KG**NW**KNPSSYHYCPSSSDQ**NW**HNDLLG
ITMKVKMP**Q**THKAIQADGWMCHAAKWITTCDFRWYGPKYITHSIHSIQPTSEQCKESIK
QTKQGTWMSPGFPPQ**NC**GYATVTD**SV**AVVVQATPHHVLVDEYTG**EW**IDSQFPNGKCE
TEECETVHNSTVWYSDYKVTGLCDATLVDT**ET**FFSEDGKKESIGKPNTGYRSNYFAYE
KGD**KV**CKMNYCKHAGVRLPSGVWFEFVDQDVYAAAKLPECPVGATISAPTQTSVDVS
LILDVERILDYSLCQETWSKIRSKQPVSPVDLSYLAPKNPGTGPAFTIINGTLKYFETRYIR
IDIDNPIISKMVGKISGSQTEAELWTEWFPYEGVEIGPN**IL**KTPTGYKFPLFMIGHGMLD
SDLHKTSQA**EV**FEH**PH**LAEAPKQLPEEETLFFGDTGISKNPVELIEGW**FSS**WKSTVV**TT**FF

AIGVFILLYVVARIVIAVRYRYQGSNNKRIYNDIEMSRFRK

> Кокал-инактивированный (мутации для устранения нативного тропизма),
последовательность ДНК: (SEQ ID NO: 54):

ATGAACTTTCTGCTGCTCACGTTTATCGTACTCCCGTTGTGCTCTCATGCGAA
ATTTTCAATAGTCTTTTCCTCAGTCCCAGAAAGGGAATTGGAAAAATGTTCCCTCCAG
TTACCACTATTGTCCCTCCTCCTCTGACCAAAACTGGCACAATGACTTGCTCGGGATT
ACAATGAAAGTAAAGATGCCGcagACCCATAAAGCCATACAGGCGGATGGGTGGATG
TGTCACGCTGCGAAGTGGATCACTACATGCGATTTCCGGTGGTATGGCCCTAAGTAC
ATTACACACTCTATCCATAGCATACAGCCGACATCAGAGCAATGCAAAGAGAGTAT
TAAACAGACCAAACAAGGGACATGGATGAGCCCTGGCTTTCCACCTCAGAATTGTG
GGTACGCGACCGTCACGGATAGTGTCTGCTGTTGTGGTGCAGGCCACGCCACATCAC
GTA CTCTG TAGATGAATATACTGGTGAATGGATCGACTCCCAATTCCCGAATGGGAA
ATGTGAGACGGAAGAGTGCGAAACAGTGCATAACTCAACCGTTTGGTATTCCGATT
ACAAGGTTACTGGTCTTTGCGACGCCACCCTCGTGGATACCGAGATCACGTTTTTTA
GTGAGGATGGCAAGAAAGAGTCAATAGGCAAACCTAATACTGGCTACCGGAGTAAC
TATTTTCGCTTACGAGAAGGGTGACAAGGTATGTAAAATGAACTATTGCAAGCATGC
GGGAGTGC GACTCCCCAGTGGGGTATGGTTTCGAATTTGTTGACCAAGACGTATACGC
CGCTGCGAAGTTGCCAGAATGCCCCGTAGGCGCGACCATTTACGCACCTACCCAAA
CGTCCGTTGACGTCTCCTTGATACTGGATGTAGAGCGAATCCTGGACTACAGTCTCT
GCCAGGAAACGTGGTCAAAAATAAGAAGTAAGCAGCCAGTTTCACCCGTGGATCTG
TCTTATCTGGCGCCAAAAAACCCGGGCACGGGCCCTGCTTTTACCATAATTAACGGA
ACGCTTAAATACTTCGAAACCCGCTACATTAGAATCGATATAGACAATCCTATTATC
AGCAAGATGGTAGGGAAGATATCTGGGTCTCAAACGGAGgccGAATTGTGGACGGAG
TGGTTCCCTTATGAGGGAGTGGAAATTGGGCCCAACGGGATCCTCAAGACCCCAAC
GGGTACAAGTTCCCTCTGTTTATGATCGGCCATGGCATGTTGGACAGTGA CTTGCA
CAAAACATCTCAGGCAGAGGTTTTCGAACATCCACATTTGGCGGAGGCGCCCAAGC
AACTTCCAGAAGAAGAACTCTCTTCTTTGGAGATACAGGCATTTCAAAAAATCCTG
TAGAACTGATAGAAGGGTGGTTCTCTTCCTGGAAATCAACGGTTGTCACGTTTTTCT
TTGCAATAGGCGTATTTATACTCCTGTACGTCGTAGCCCGCATTGTGATCGCAGTAC
GATACAGATACCAGGGCAGTAACAATAAACGCATATATAATGACATCGAAATGTCA
AGGTTCCGAAAGtga

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ скрининга популяции клеток, включающий:

(i) получение ретровируса, включающего вирусный белок оболочки, включающий по меньшей мере одну мутацию, которая снижает его нативную функцию, невирусный мембраносвязанный белок, включающий мембраносвязанный домен и внеклеточный направляющий домен, и нуклеиновую кислоту, кодирующую репортер;

(ii) объединение ретровируса с популяцией клеток; и

(iii) сортировку популяции клеток на основе присутствия или отсутствия репортера.

2. Способ скрининга популяции клеток, включающий:

(i) получение ретровируса, включающего

нуклеиновую кислоту, включающую невирусный мембраносвязанный белок, включающий структуру: S-ETD-MBD-IRES-R, где S кодирует сигнальную последовательность, ETD кодирует внеклеточный направляющий домен; MBD кодирует мембраносвязанный домен, IRES кодирует участок внутренней посадки рибосомы, и R кодирует репортер; и

мутантный вирусный белок оболочки, включающий по меньшей мере одну мутацию, которая снижает его нативную функцию;

(ii) объединение ретровируса с популяцией клеток; и

(iii) сортировку популяции клеток на основе присутствия или отсутствия репортера.

3. Способ по любому из пп.1 или 2, где клетки являются соматическими клетками, необязательно антигенспецифическими клетками.

4. Способ по п.3, где антигенспецифические клетки являются Т-клетками или В-клетками.

5. Способ по любому из пп.1-3, где ретровирус является лентивирусом.

6. Способ по любому из пп.1-5, где вирусный белок оболочки является белком оболочки VSV-G, белком оболочки вируса кори, белком оболочки вируса Нипах или G-белком вируса Кокал.

7. Способ по п.6, где по меньшей мере одна мутация белка оболочки VSV-G является мутацией, выбранной из группы, состоящей из H8, K47, Y209 и R354.

8. Способ по п.6, где по меньшей мере одна мутация белка оболочки вируса кори является мутацией, выбранной из группы, состоящей из Y481, R533, S548 и F549.

9. Способ по п.6, где по меньшей мере одна мутация белка оболочки вируса Нипах является мутацией, выбранной из группы, состоящей из E501, W504, Q530 и E533.

10. Способ по п.6, где по меньшей мере одна мутация G-белка вируса Кокал является мутацией, выбранной из группы, состоящей из K64 и R371.

11. Способ по любому из пп.1-10, где невирусный мембраносвязанный белок включает белок главного комплекса гистосовместимости (МНС).

12. Способ по любому из пп.1-11, где внеклеточный направляющий домен является

белком, пептидом или антителом.

13. Способ по п.12, где белок является интерлейкином-13 или доменом белка CD80.

14. Способ по п.12, где антитело является антителом против CD19, антителом против TCR или антителом против CD3.

15. Способ по любому из пп.1-14, где репортер является флуоресцентным белком (например, зеленым флуоресцентным белком, желтым флуоресцентным белком, красным флуоресцентным белком) или маркером устойчивости к антибиотику.

16. Способ по любому из пп.1-15, где линкер расположен между мембраносвязанным доменом и внеклеточным направляющим доменом.

17. Способ по п.16, где линкер является жестким линкером, необязательно включающим стебель PDGFR или стебель CD8 α .

18. Способ по п.16 где линкер является гибким линкером, необязательно включающим аминокислотную последовательность, включающую GAPGAS (SEQ ID NO: 5) или GGGGS (SEQ ID NO: 7).

19. Способ по п.16, где линкер является олигомеризованным линкером, необязательно включающим шарнирную область IgG4 или аминокислотную последовательность, которая может формировать тетрамерную суперспираль.

20. Способ по любому из пп.1-19, где ретровирус объединяют с популяцией клеток в (ii) на время от одной минуты до семидесяти двух часов.

21. Способ по любому из пп.1-20, где ретровирус и популяцию клеток объединяют в (ii) в присутствии:

а) среды для культивирования клеток, необязательно среды для культивирования клеток RPMI или DMEM;

б) забуференного солевого раствора, необязательно фосфатно-солевого буферного раствора или забуференного HEPES солевого раствора; и/или

с) усилителя ретровирусной трансдукции, необязательно гепарина сульфата, полибрена, протамина сульфата и/или декстрана.

22. Способ по любому из пп.1-21, где ретровирус и популяцию клеток объединяют в (ii) при температуре в пределах от 4°C до 42°C.

23. Способ по любому из пп.1-22, где внеклеточный направляющий домен способен к связыванию с когнатным белком, присутствующим на поверхности клеток субпопуляции популяции клеток.

24. Способ по п.23, где когнатный белок является белковым рецептором.

25. Способ по любому из пп.23 или 24, где внеклеточный направляющий домен одного ретровируса связывается с когнатным белком, присутствующим на поверхности клеток одной Т-клетки во время (ii), что приводит к проникновению ретровируса в Т-клетку.

26. Способ по любому из пп.1-25, дополнительно включающий промывку популяции клеток между (ii) и (iii), необязательно при использовании фосфатно-солевого

буферного раствора (PBS), необязательно с удалением ретровируса из популяции клеток.

27. Способ по любому из пп.1-26, где сортировку популяции клеток выполняют с помощью сортировки клеток с активированной флуоресценцией, упорядочивание следующего поколения одиночных клеток или отбора с антибиотиком.

28. Способ по любому из пп.1-27, где популяция клеток является популяцией клеток, выделенных у субъекта, необязательно, где субъектом является человек.

29. Способ по п.28, где популяцию клеток выделяют из крови или опухоли субъекта.

30. Способ по любому из пп.1-29, где популяцию клеток поддерживают в жидкой культуре до объединения с ретровирусом.

31. Способ по любому из пп.1-30, дополнительно включающий второй ретровирус, где второй ретровирус включает другой внеклеточный направляющий домен и/или другой репортер по сравнению с первым ретровирусом.

32. Способ по любому из пп.2-31, где:

а) сигнальная последовательность включает SEQ ID NO: 1 (METDTLLLWVLLLWVPGSTG) или SEQ ID NO: 2 (MSRSVALAVLALLSLSGLEA); и/или

б) IRES кодирует последовательность из вируса энцефаломиокардита (ВЭМК).

33. Ретровирус, включающий:

i) нуклеиновую кислоту, включающую невирусный мембраносвязанный белок, включающий структуру: S-ETD-MBD-IRES-R, где S кодирует сигнальную последовательность, ETD кодирует внеклеточный направляющий домен; MBD кодирует мембраносвязанный домен, IRES кодирует участок внутренней посадки рибосомы, и R кодирует репортер; и

ii) мутантный вирусный белок оболочки, включающий по меньшей мере одну мутацию, которая снижает его нативную функцию.

34. Ретровирус по п.33, где ретровирус является лентивирусом.

35. Ретровирус по одному из пп.33 или 34, где вирусный белок оболочки является белком оболочки VSV-G, белком оболочки вируса кори, белком оболочки вируса Нипах или G-белком вируса Кокал.

36. Ретровирус по п.35, где по меньшей мере одна мутация белка оболочки VSV-G является мутацией, выбранной из группы, состоящей из H8, K47, Y209 и R354.

37. Ретровирус по п.36, где по меньшей мере одна мутация белка оболочки вируса кори является мутацией, выбранной из группы, состоящей из Y481, R533, S548 и F549.

38. Ретровирус по п.36, где по меньшей мере одна мутация белка оболочки вируса Нипах является мутацией, выбранной из группы, состоящей из E501, W504, Q530 и E533.

39. Ретровирус по п.36, где по меньшей мере одна мутация G-белка вируса Кокал является мутацией, выбранной из группы, состоящей из K64 и R371.

40. Ретровирус по любому из пп.33-39, где невирусный мембраносвязанный белок включает белок главного комплекса гистосовместимости (МНС).

41. Ретровирус по любому из пп.33-40, где внеклеточный направляющий домен является белком, пептидом или антителом.

42. Ретровирус по п.41, где белок является интерлейкином-13 или доменом белка CD80.

43. Ретровирус по п.41, где антитело является антителом против CD19, антителом против TCR или антителом против CD3.

44. Ретровирус по любому из пп.33-43, где репортер является флуоресцентным белком (например, зеленым флуоресцентным белком, желтым флуоресцентным белком, красным флуоресцентным белком) или маркером устойчивости к антибиотику.

45. Ретровирус по любому из пп.33-44, где линкер расположен между мембраносвязанным доменом и внеклеточным направляющим доменом.

46. Ретровирус по п.45, где линкер является жестким линкером, необязательно включающим стебель PDGFR или стебель CD8 α .

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

48. Ретровирус по п.45, где линкер является олигомеризованным линкером, необязательно включающим шарнирную область IgG4 или аминокислотную последовательность, которая может формировать тетрамерную суперспираль.

49. Ретровирус по любому из пп.33-48, где внеклеточный направляющий домен способен к связыванию с когнатным белком, присутствующим на клеточной поверхности клетки, необязательно, где клетка является антигенспецифической клеткой (например, Т-клеткой или В-клеткой).

50. Ретровирус по любому из пп.33-49, где сигнальная последовательность включает SEQ ID NO: 1 (METDTLLLWVLLLWVPGSTG) или SEQ ID NO: 2 (MSRSVALAVLALLSLSGLEA).

51. Ретровирус по любому из пп.33-50, где IRES кодируют последовательность из вируса энцефаломиокардита (ВЭМК).

52. Способ доставки нуклеиновой кислоты в клетку, включающий:

(i) получение ретровируса, включающего нуклеиновую кислоту, вирусный белок оболочки, включающий по меньшей мере одну мутацию, которая снижает его нативную функцию, и невирусный мембраносвязанный белок, включающий внеклеточный направляющий домен, который способен к связыванию с когнатным лигандом клетки; и

(ii) контакт ретровируса с клеткой,

с доставкой, таким образом, нуклеиновой кислоты в клетку.

53. Способ по п.51, где нуклеиновая кислота кодирует представляющий интерес ген, необязательно, где представляющий интерес ген кодирует белок.

54. Способ по любому из пп.52 или 53, где когнатный лиганд является белком, необязательно белковым рецептором.

55. Способ по любому из пп.52-54, где ретровирус проникает или инфицирует

клетку во время (ii).

56. Способ по любому из пп.52-55, где клетка является соматической клеткой, необязательно антигенспецифической клеткой.

57. Способ по п.56, где антигенспецифическая клетка является Т-клеткой или В-клеткой.

58. Способ по любому из пп.52-57, где ретровирус является лентивирусом.

59. Способ по любому из пп.52-58, где вирусный белок оболочки является белком оболочки VSV-G, белком оболочки вируса кори, белком оболочки вируса Нипах или G-белком вируса Кокал.

60. Способ по п.59, где по меньшей мере одна мутация белка оболочки VSV-G является мутацией, выбранной из группы, состоящей из H8, K47, Y209 и R354.

61. Способ по п.59, где по меньшей мере одна мутация вирусного белка оболочки кори является мутацией, выбранной из группы, состоящей из Y481, R533, S548 и F549.

62. Способ по п.59, где по меньшей мере одна мутация белка оболочки вируса Нипах является мутацией, выбранной из группы, состоящей из E501, W504, Q530 и E533.

63. Способ по п.59, где по меньшей мере одна мутация G-белка вируса Кокал является мутацией, выбранной из группы, состоящей из K64 и R371.

64. Способ по любому из пп.52-63, где невирусный мембраносвязанный белок включает белок главного комплекса гистосовместимости (МНС).

65. Способ по любому из пп.52-64, где внеклеточный направляющий домен является белком, пептидом или антителом.

66. Способ по п.65, где белок является интерлейкином-13 или доменом белка CD80.

67. Способ по п.65, где антитело является антителом против CD19, антителом против TCR или антителом против CD3.

68. Способ по любому из пп.52-67, где линкер расположен между мембраносвязанным доменом и внеклеточным направляющим доменом.

69. Способ по п.68, где линкер является жестким линкером, необязательно включающим стебель PDGFR или стебель CD8 α .

70. Способ по п.68, где линкер является гибким линкером, необязательно включающим аминокислотную последовательность, включающую GAPGAS (SEQ ID NO: 5) или GGGGS (SEQ ID NO: 7).

71. Способ по п.68, где линкер является олигомеризованным линкером, необязательно включающим шарнирную область IgG4 или аминокислотную последовательность, которая может формировать тетрамерную суперспираль.

72. Способ по любому из пп.52-71, где внеклеточный направляющий домен способен к связыванию с когнатным белком, присутствующим на клеточной поверхности Т-клетки.

73. Способ обнаружения взаимодействия между ретровирусом и клеткой, включающий:

(i) контакт образца, включающего ретровирус и клетку, с антителом, где ретровирус включает вирусный белок оболочки, включающий по меньшей мере одну мутацию, которая снижает его нативную функцию, невирусный мембраносвязанный белок, включающий внеклеточный направляющий домен, и где антитело связывается с внеклеточным направляющим доменом ретровируса;

(ii) необязательно, удаление несвязавшегося антитела из образца; и

(iii) визуализацию образца с целью обнаружения, связан ли комплекс антитела-ретровируса с клеткой.

74. Способ по п.73, где антитело дополнительно включает флуоресцентную метку, необязательно, где антитело ковалентно связано с флуоресцентной меткой.

75. Способ по одному из пп.73 или 74, где образец визуализируют в (iii) при использовании конфокальной или флуоресцентной микроскопии.

76. Способ по любому из пп.73-75, где клетка является соматической клеткой, необязательно антигенспецифической клеткой.

77. Способ по п.76, где антигенспецифическая клетка является Т-клеткой или В-клеткой.

78. Способ по любому из пп.73-77, где ретровирус является лентивирусом.

79. Способ по любому из пп.73-78, где вирусный белок оболочки является белком оболочки VSV-G, белком оболочки вируса кори, белком оболочки вируса Нипах или G-белком вируса Кокал.

80. Способ по п.79, где по меньшей мере одна мутация белка оболочки VSV-G является мутацией, выбранной из группы, состоящей из H8, K47, Y209 и R354.

81. Способ по п.79, где по меньшей мере одна мутация белка оболочки вируса кори является мутацией, выбранной из группы, состоящей из Y481, R533, S548 и F549.

82. Способ по п.79, где по меньшей мере одна мутация белка оболочки вируса Нипах является мутацией, выбранной из группы, состоящей из E501, W504, Q530 и E533.

83. Способ по п.79, где по меньшей мере одна мутация G-белка вируса Кокал является мутацией, выбранной из группы, состоящей из K64 и R371.

84. Способ по любому из пп.73-83, где невирусный мембраносвязанный белок включает белок главного комплекса гистосовместимости (МНС).

85. Способ по любому из пп.73-84, где внеклеточный направляющий домен является белком или пептидом.

86. Способ по п.85, где белок является интерлейкином-13 или доменом белка CD80.

87. Способ по любому из пп.73-86, где линкер расположен между мембраносвязанным доменом и внеклеточным направляющим доменом.

88. Способ по п.87, где линкер является жестким линкером, необязательно включающим стебель PDGFR или стебель CD8 α .

89. Способ по п.87, где линкер является гибким линкером, необязательно включающим аминокислотную последовательность, включающую GAPGAS (SEQ ID NO:

5) или GGGGS (SEQ ID NO: 7).

90. Способ по п.87, где линкер является олигомеризованным линкером, необязательно включающим шарнирную область IgG4 или аминокислотную последовательность, которая может формировать тетрамерную суперспираль.

91. Библиотека ретровирусов, включающая множество уникальных ретровирусов, где каждый уникальный ретровирус включает вирусный белок оболочки, включающий по меньшей мере одну мутацию, которая снижает его нативную функцию, невирусный мембраносвязанный белок, включающий мембраносвязанный домен и внеклеточный направляющий домен, и нуклеиновую кислоту, кодирующую репортер, и

где каждый уникальный ретровирус включает отличающийся и уникальный внеклеточный направляющий домен.

92. Библиотека по п.91, где библиотека может быть подвергнута скринингу против популяции антигенспецифических клеток, необязательно, где антигенспецифические клетки являются В-клетками или Т-клетками.

93. Библиотека по п.91 или 92, где библиотека включает по меньшей мере 10^2 , по меньшей мере 10^3 , по меньшей мере 10^4 , по меньшей мере 10^5 , по меньшей мере 10^6 , по меньшей мере 10^7 , по меньшей мере 10^8 , по меньшей мере 10^9 или по меньшей мере 10^{10} уникальных ретровирусов.

94. Библиотека по любому из пп.91-93, где каждый внеклеточный направляющий домен включает по меньшей мере 5, по меньшей мере 10, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20 или по меньшей мере 50 аминокислот.

95. Библиотека по любому из пп.91-94, где невирусный мембраносвязанный белок включает белок главного комплекса гистосовместимости (МНС).

96. Библиотека по любому из пп.91-95, где каждый отличающийся и уникальный внеклеточный направляющий домен получен с помощью сайт-направленного мутагенеза.

97. Популяция клеток, где субпопуляция в популяции клеток содержит ретровирус, включающий: вирусный белок оболочки, включающий по меньшей мере одну мутацию, которая снижает его нативную функцию, невирусный мембраносвязанный белок, включающий мембраносвязанный домен и внеклеточный направляющий домен, и нуклеиновую кислоту, кодирующую репортер.

98. Популяция клеток, где субпопуляция в популяции клеток содержит ретровирус по любому из пп.33-51.

99. Популяция по п.97 или 98, где клетки являются антигенспецифическими клетками, необязательно В-клетками или Т-клетками.

100. Популяция по любому из пп.97 или 98, где субпопуляция в популяции клеток содержит ретровирус в каждой клетке субпопуляции, необязательно в ядре каждой клетки субпопуляции.

101. Популяция по любому из пп.97-100, где субпопуляция популяции экспрессирует репортер, необязательно, где репортер является флуоресцентным белком.

102. Популяция по любому из пп.97-101, где субпопуляция популяции, которая

содержит ретровирус, выделена и/или отсортирована от клеток популяции, не содержащих ретровирус.

103. Ретровирус, включающий:

- i) домен белка CD80; и
- ii) мутантный вирусный белок оболочки, включающий по меньшей мере одну мутацию, которая снижает его нативную функцию.

104. Ретровирус по п.103, где ретровирус является лентивирусом.

105. Ретровирус по одному из пп.103 или 104, где вирусный белок оболочки является белком оболочки VSV-G, белком оболочки вируса кори, белком оболочки вируса Нипах или G-белком вируса Кокал.

106. Ретровирус по п.105, где по меньшей мере одна мутация белка оболочки VSV-G является мутацией, выбранной из группы, состоящей из H8, K47, Y209 и R354.

107. Ретровирус по п.105, где по меньшей мере одна мутация вирусного белка оболочки кори является мутацией, выбранной из группы, состоящей из Y481, R533, S548 и F549.

108. Ретровирус по п.105, где по меньшей мере одна мутация белка оболочки вируса Нипах является мутацией, выбранной из группы, состоящей из E501, W504, Q530 и E533.

109. Ретровирус по п.105, где по меньшей мере одна мутация G-белка вируса Кокал является мутацией, выбранной из группы, состоящей из K64 и R371.

110. Ретровирус по любому из пп.103-109, где домен белка CD80 является внеклеточным доменом, необязательно, где внеклеточный домен связывается с рецептором на клетке-мишени.

111. Ретровирус по любому из пп.103-110, дополнительно включающий невирусный мембраносвязанный белок, включающий внеклеточный направляющий домен, который способен к связыванию с когнатным лигандом клетки.

112. Ретровирус по п.111, где невирусный мембраносвязанный белок включает белок главного комплекса гистосовместимости (МНС).

113. Ретровирус по п.111 или 112, где внеклеточный направляющий домен является белком, пептидом или антителом.

114. Способ доставки нуклеиновой кислоты в клетку, включающий:

- (i) получение ретровируса, включающего нуклеиновую кислоту, вирусный белок оболочки, включающий по меньшей мере одну мутацию, которая снижает его нативную функцию, и домен белка CD80; и
- (ii) контакт ретровируса с клеткой, с доставкой, таким образом, нуклеиновой кислоты в клетку.

115. Способ по п.114, где нуклеиновая кислота кодирует представляющий интерес ген, необязательно, где представляющий интерес ген кодирует белок.

116. Способ по одному из пп.114 или 115, где ретровирус проникает или инфицирует клетку во время (ii).

117. Способ по любому из пп.114-116, где клетка является соматической клеткой, необязательно антигенспецифической клеткой.

118. Способ по п.117, где антигенспецифическая клетка является Т-клеткой или В-клеткой.

119. Способ по любому из пп.114-118, где ретровирус является лентивирусом.

120. Способ по любому из пп.114-119, где вирусный белок оболочки является белком оболочки VSV-G, белком оболочки вируса кори, белком оболочки вируса Нипах или G-белком вируса Кокал.

121. Способ по п.120, где по меньшей мере одна мутация белка оболочки VSV-G является мутацией, выбранной из группы, состоящей из H8, K47, Y209 и R354.

122. Способ по п.120, где по меньшей мере одна мутация белка оболочки вируса кори является мутацией, выбранной из группы, состоящей из Y481, R533, S548 и F549.

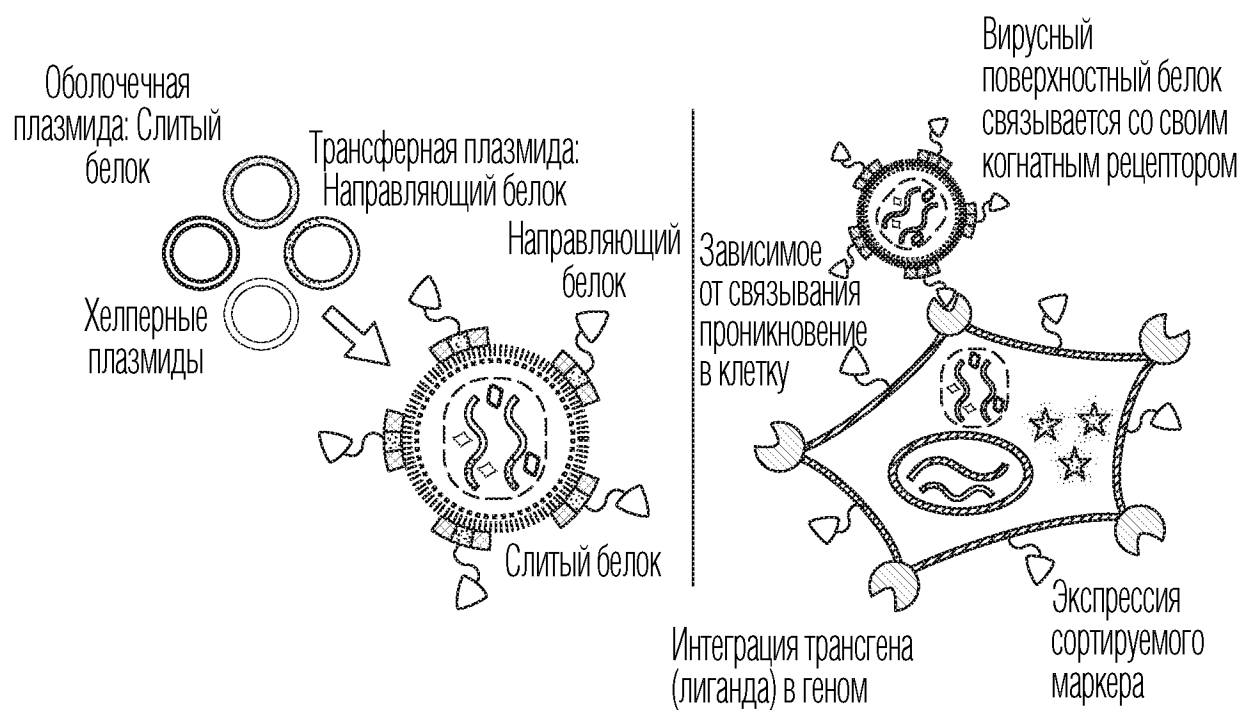
123. Способ по п.120, где по меньшей мере одна мутация белка оболочки вируса Нипах является мутацией, выбранной из группы, состоящей из E501, W504, Q530 и E533.

124. Способ по п.120, где по меньшей мере одна мутация G-белка вируса Кокал является мутацией, выбранной из группы, состоящей из K64 и R371.

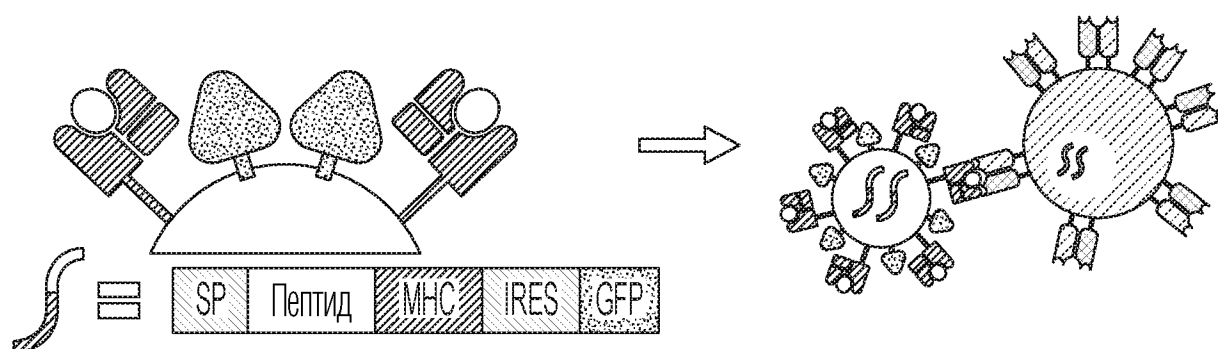
125. Способ по любому из пп.114-124, где домен белка CD80 является внеклеточным доменом, необязательно, где внеклеточный домен связывается с рецептором на клетке.

По доверенности

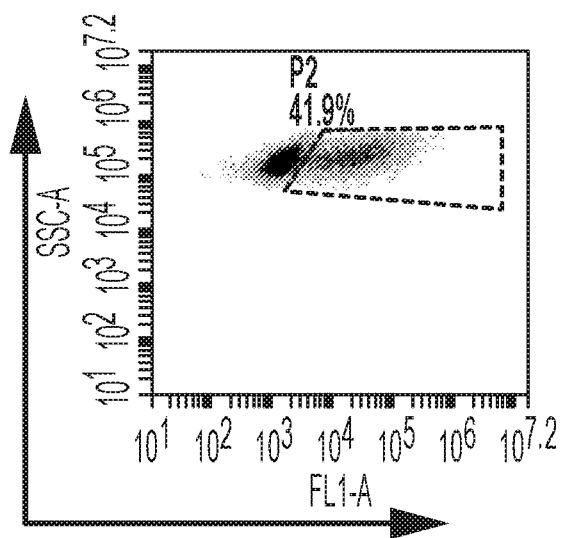
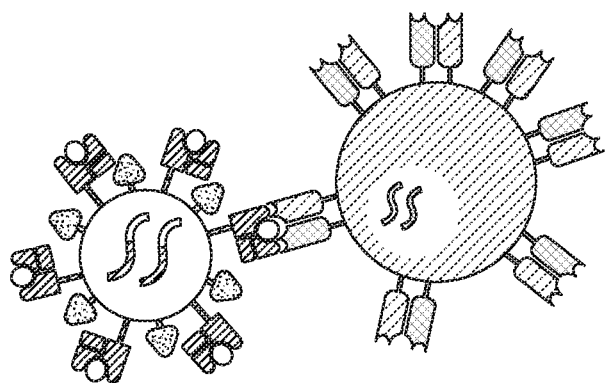
1/24



ФИГ. 1

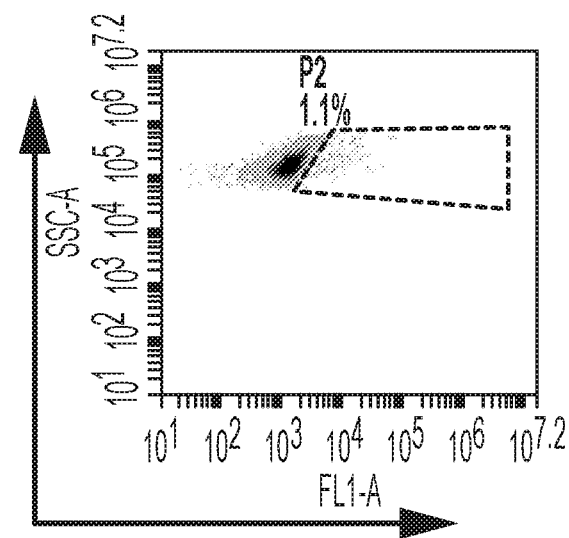
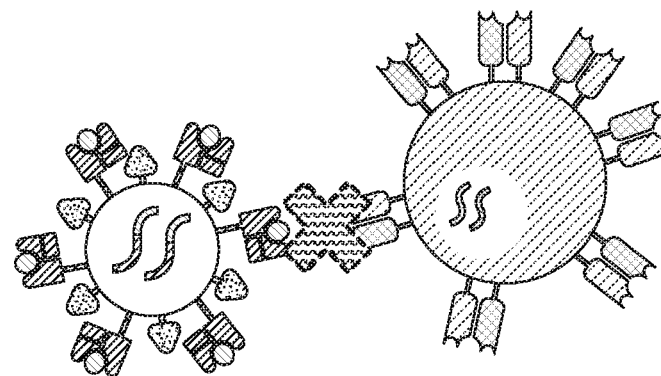


ФИГ. 2



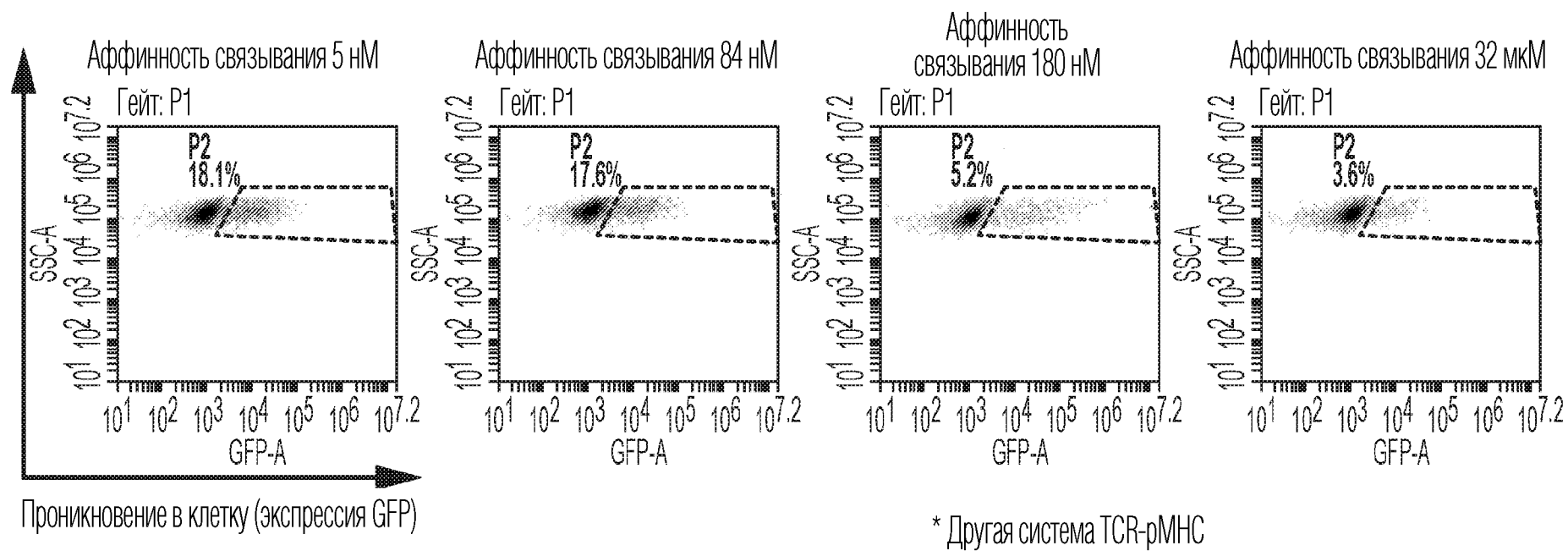
Проникновение в клетку (экспрессия GFP)

ФИГ. 3А

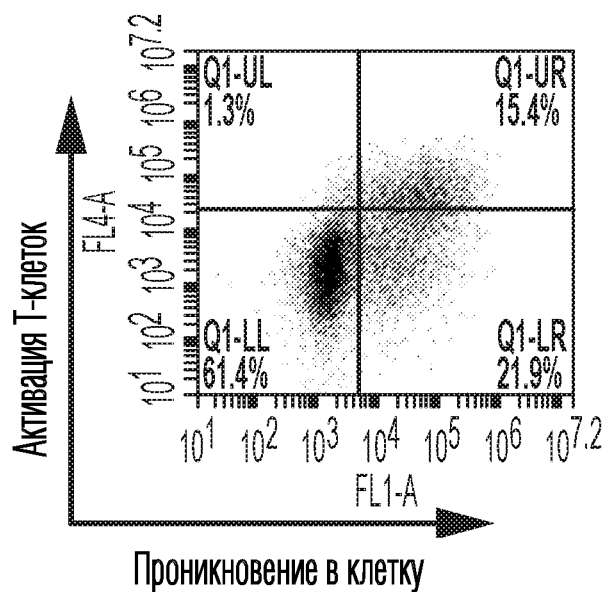
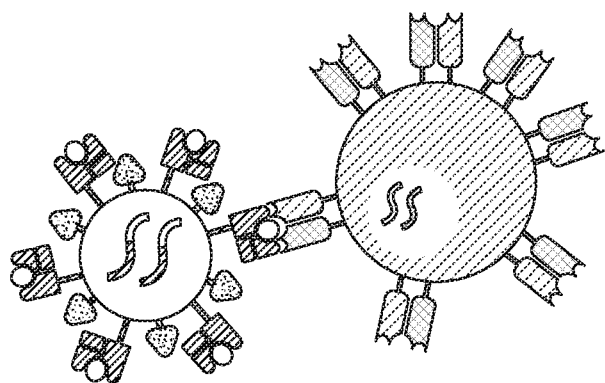


Проникновение в клетку (экспрессия GFP)

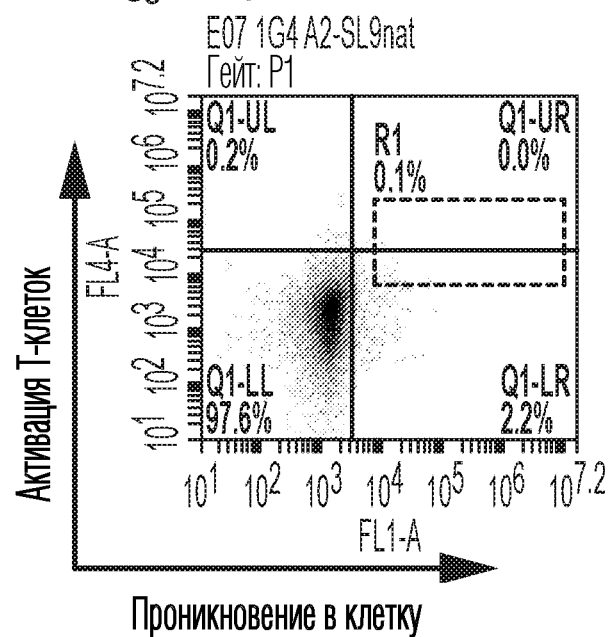
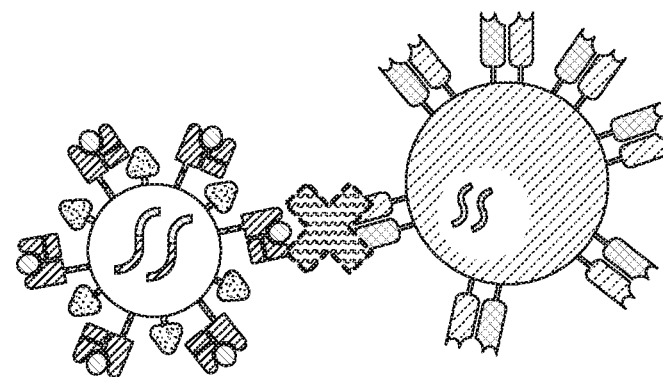
ФИГ. 3В



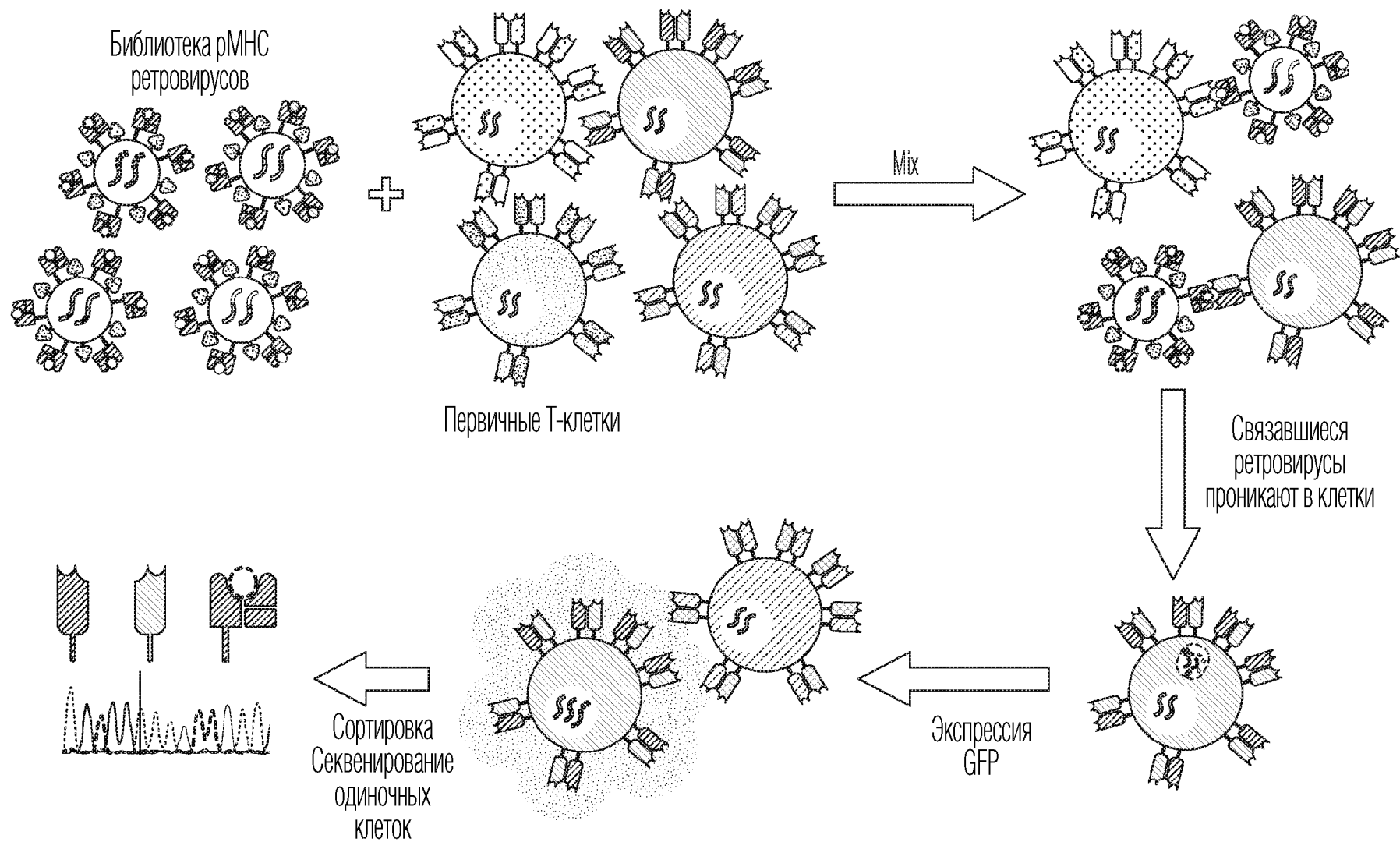
ФИГ. 4



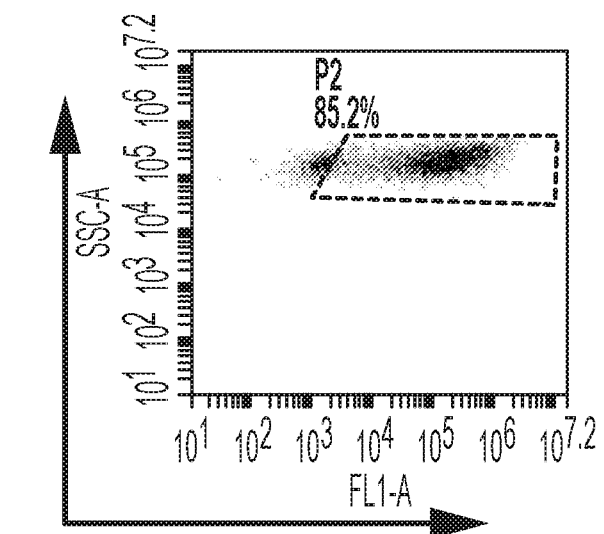
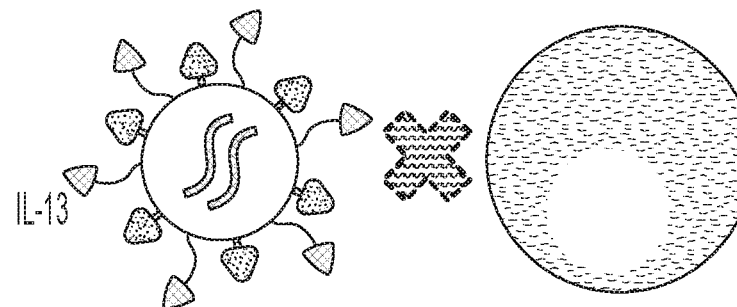
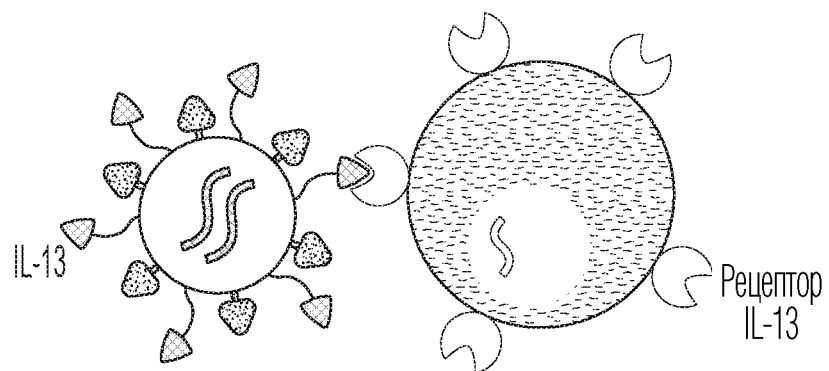
ФИГ. 5А



ФИГ. 5В

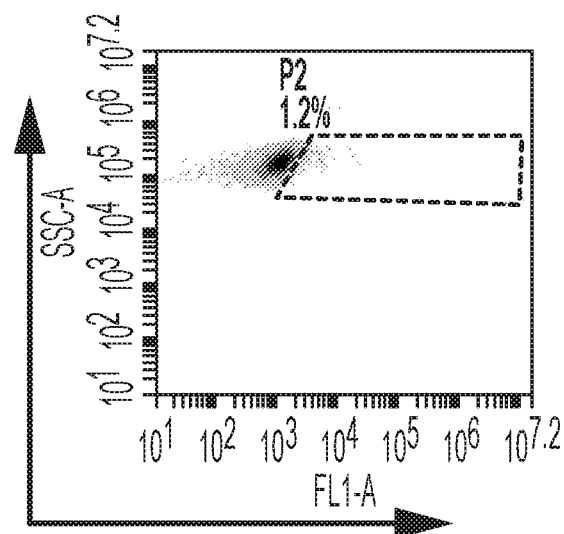


ФИГ. 6



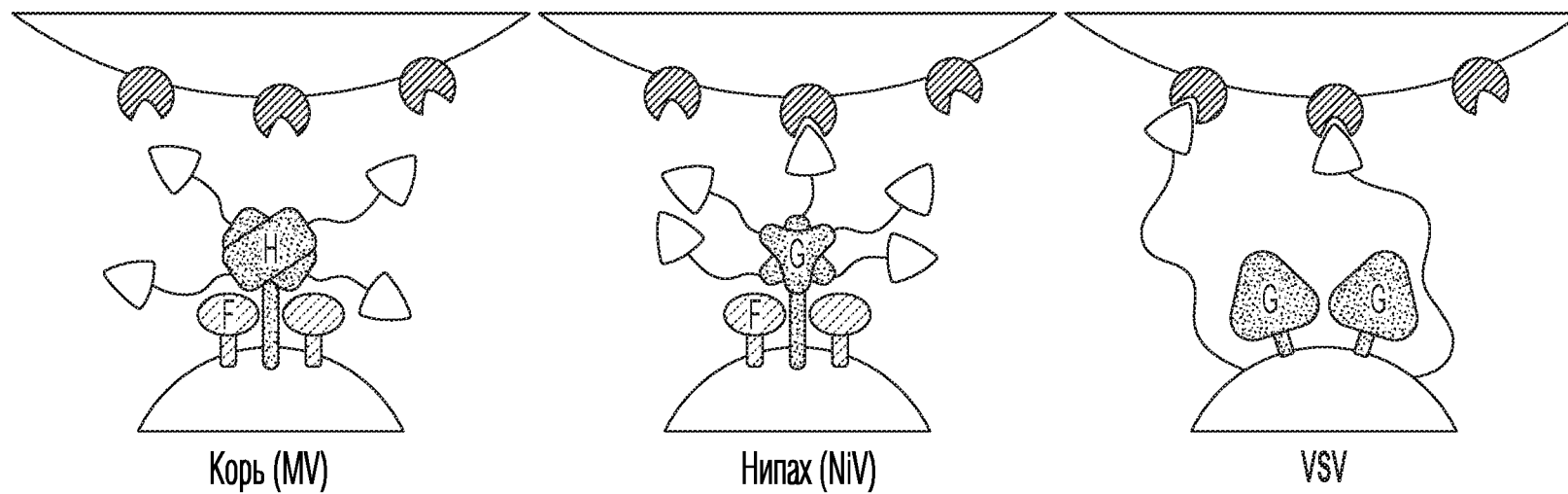
Проникновение в клетку (экспрессия GFP)

ФИГ. 7А

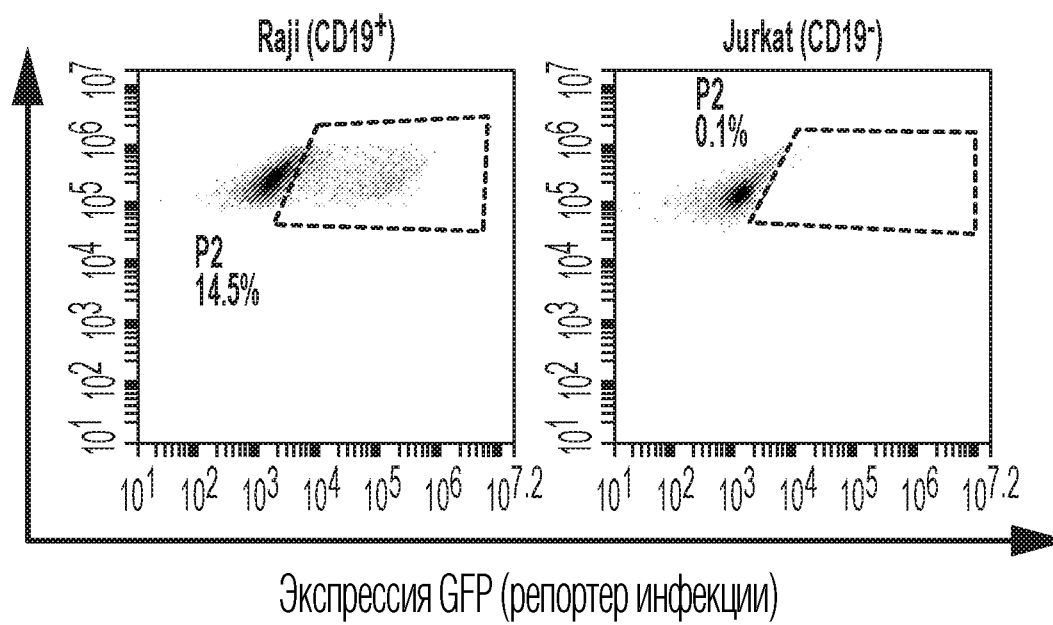
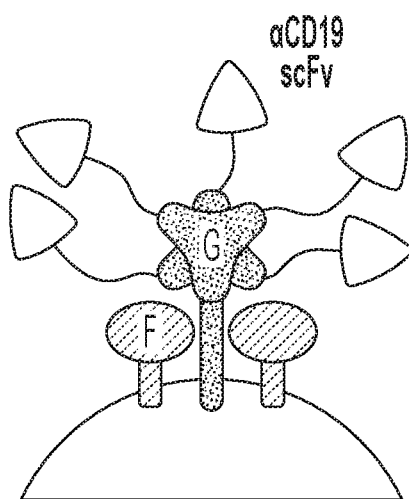


Проникновение в клетку (экспрессия GFP)

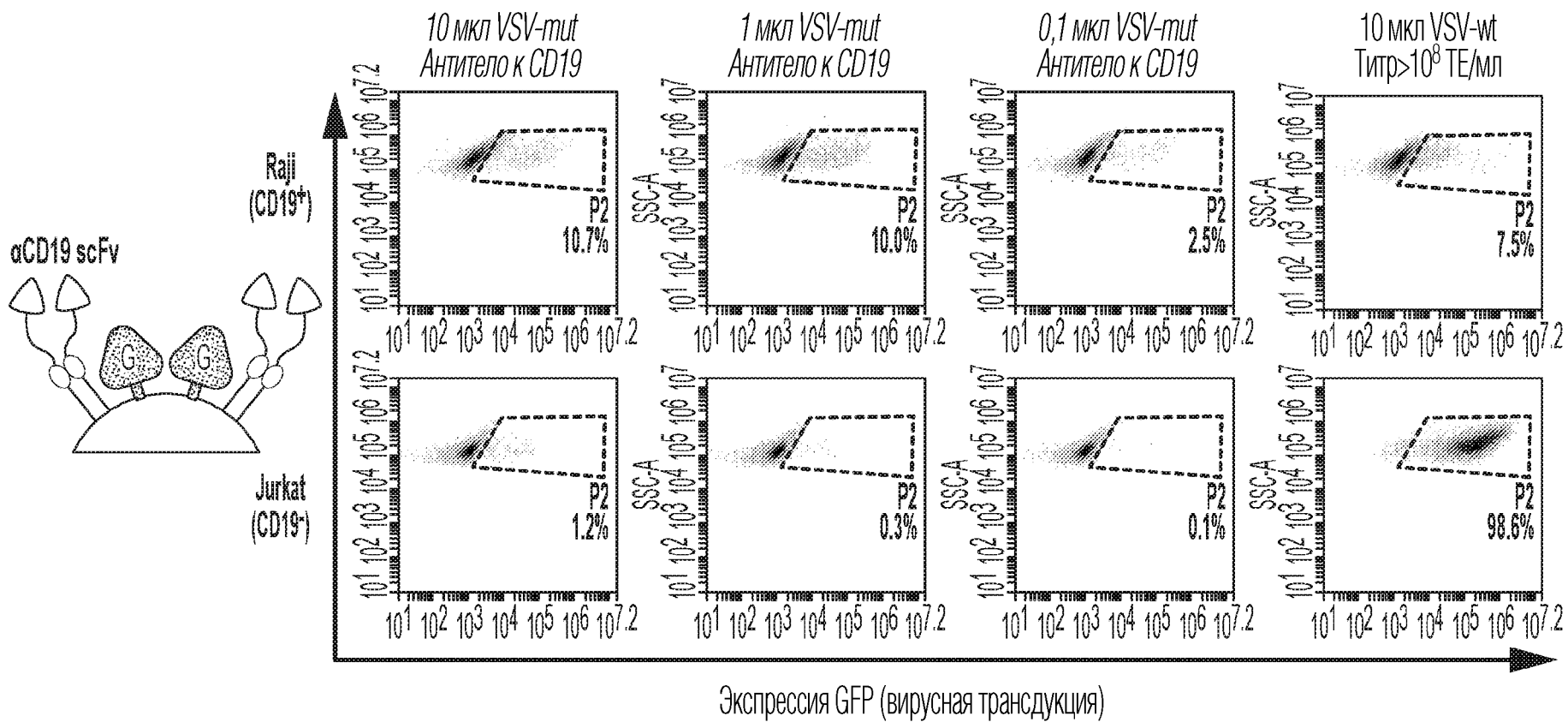
ФИГ. 7В



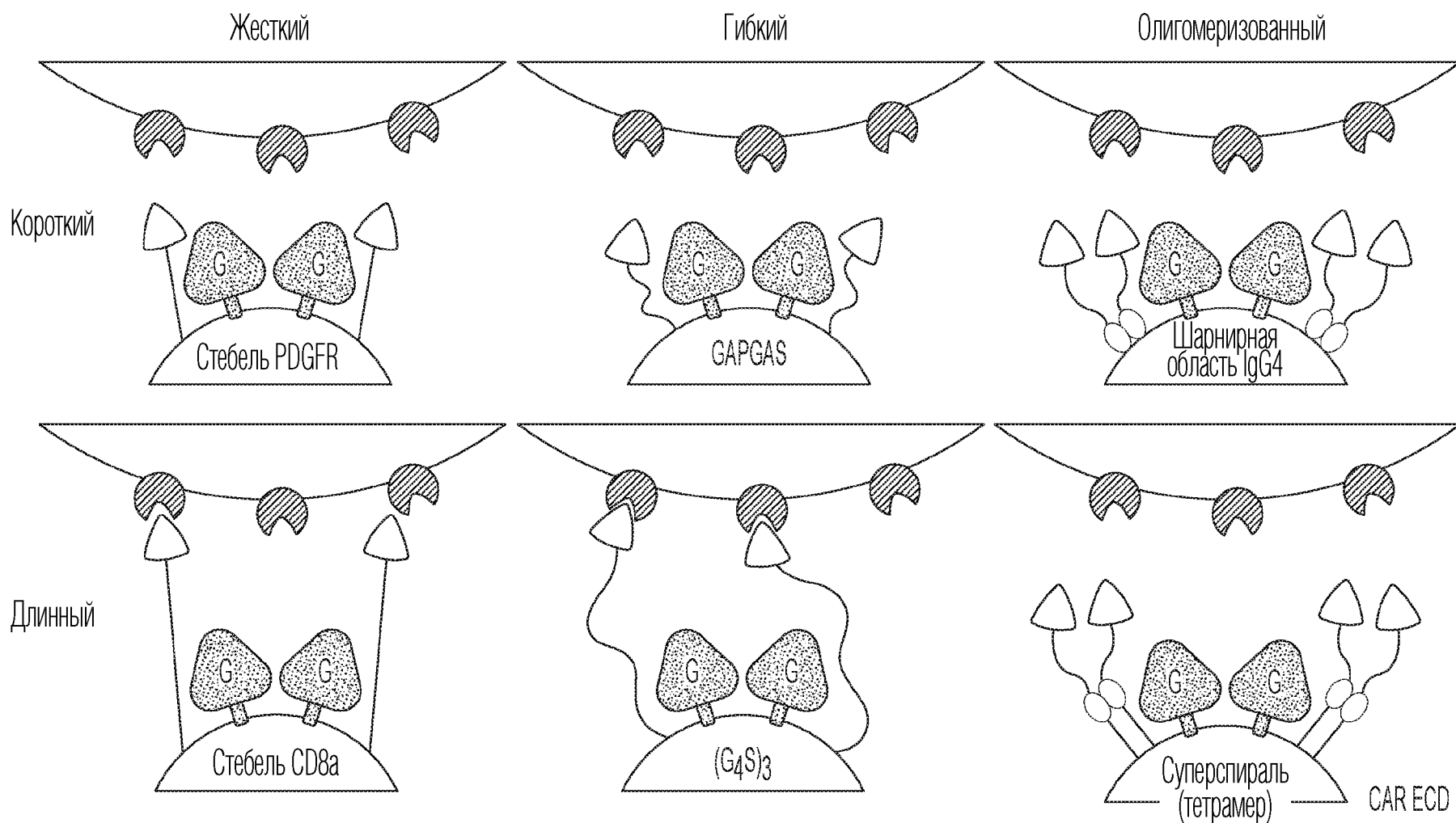
ФИГ. 8



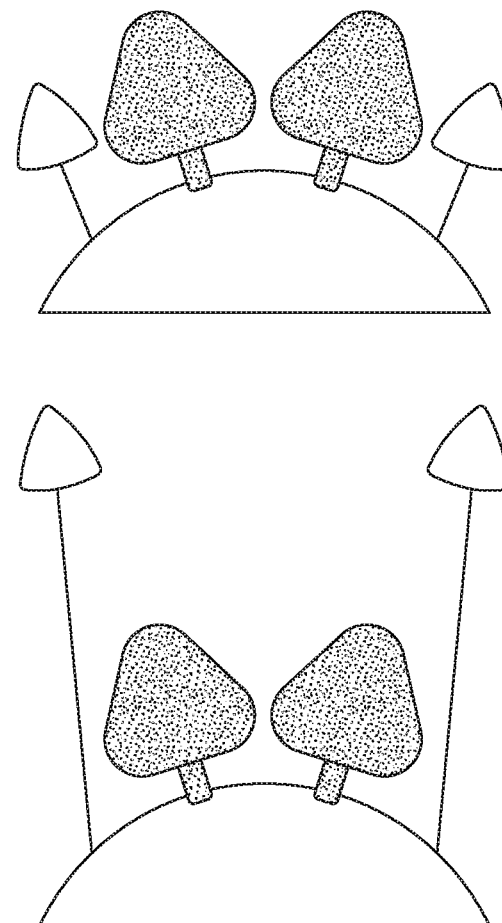
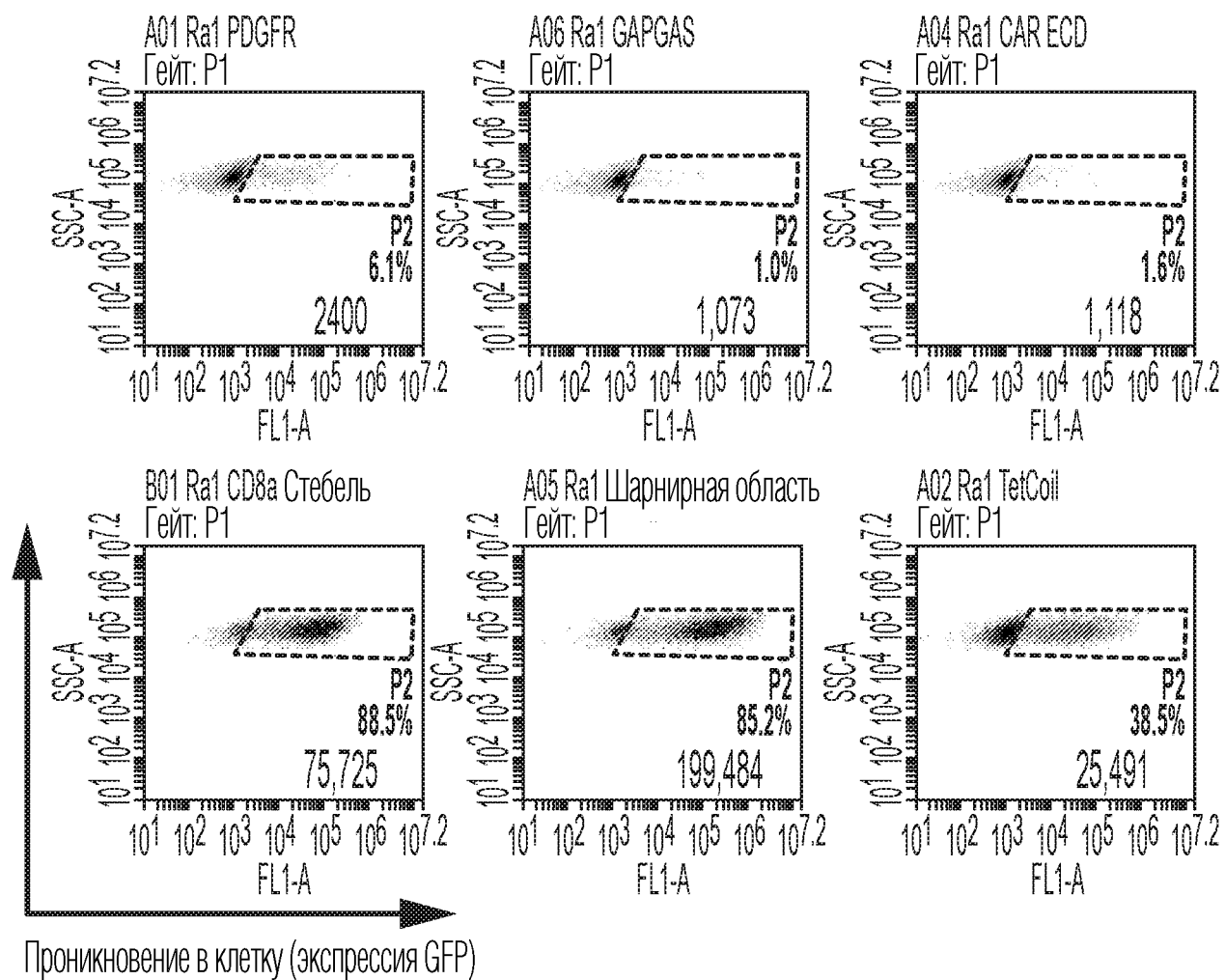
ФИГ. 9



ФИГ. 10

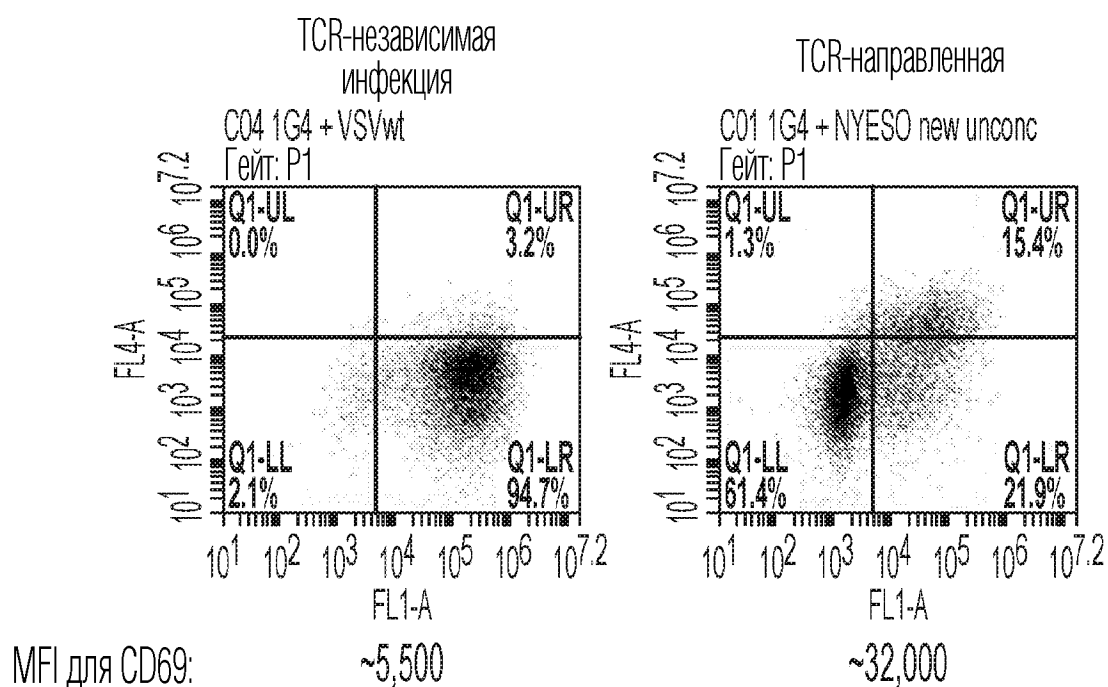


ФИГ. 11

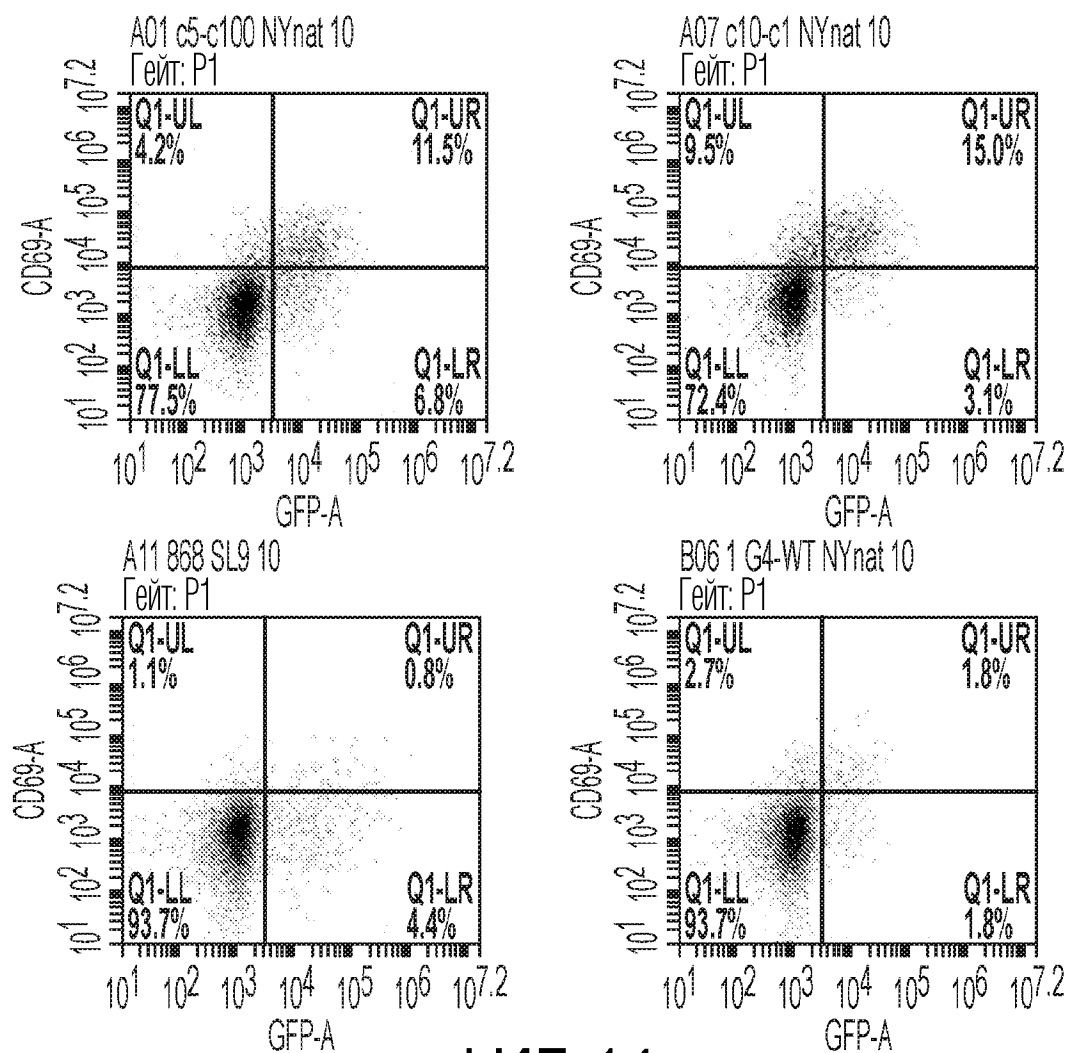


ФИГ. 12

12/24

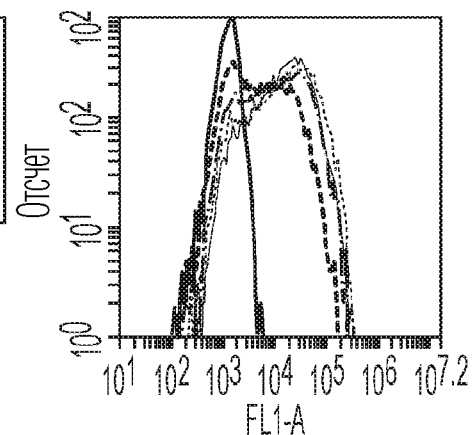


ФИГ. 13

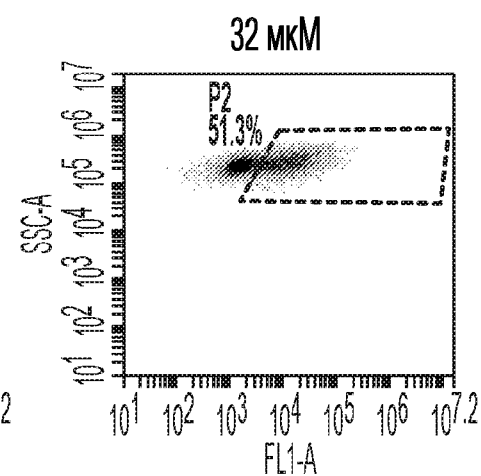
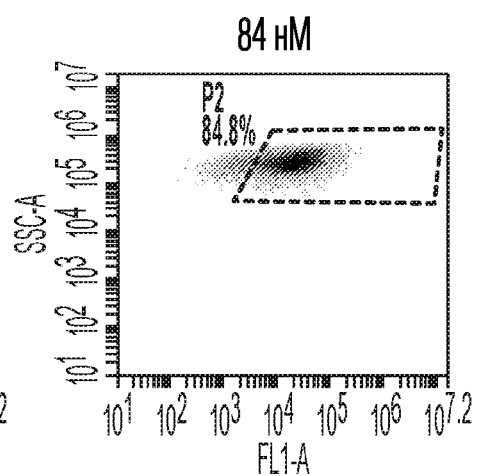
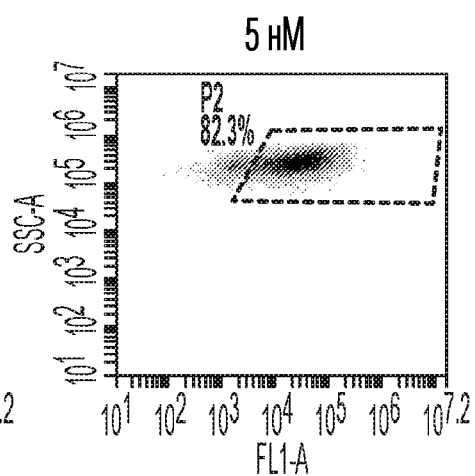
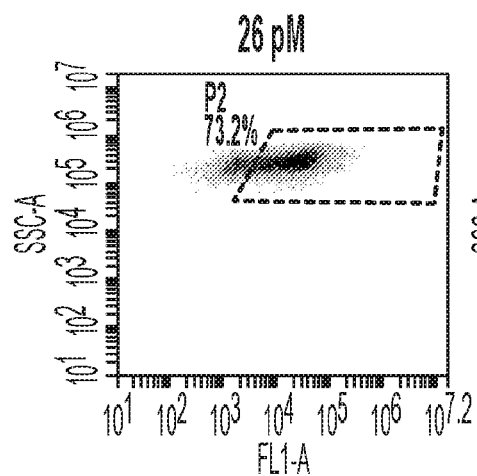


ФИГ. 14

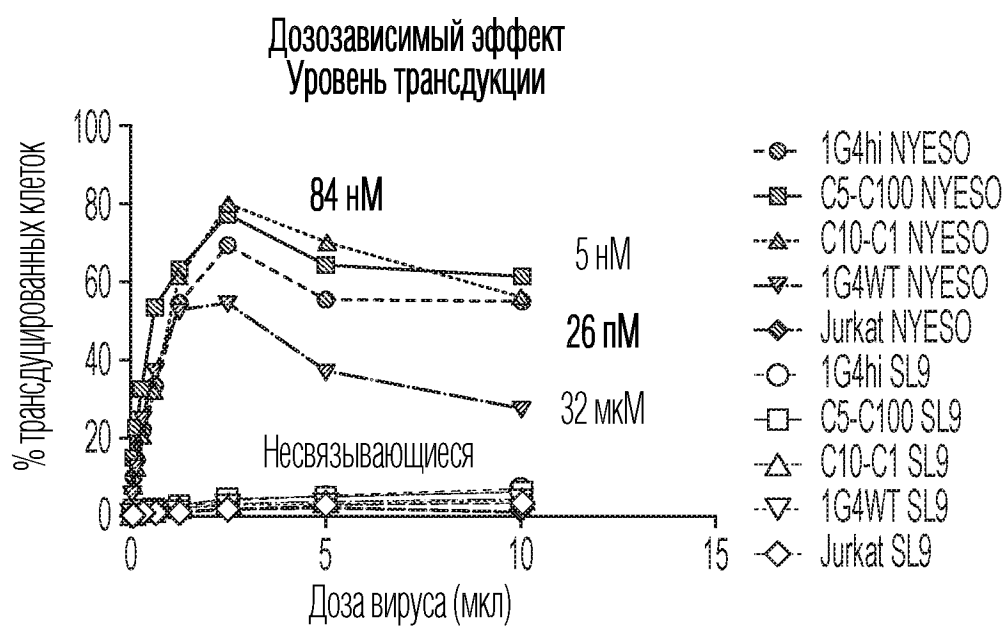
- A01 1G4hi Нетрансдуцированный контроль
- ▤ A02 1G4hi Трансдуцированные
- ▥ A03 C5-C100 Трансдуцированные
- ▧ A04 C10-C1 Трансдуцированные
- ▨ A05 1G4 WT Трансдуцированные



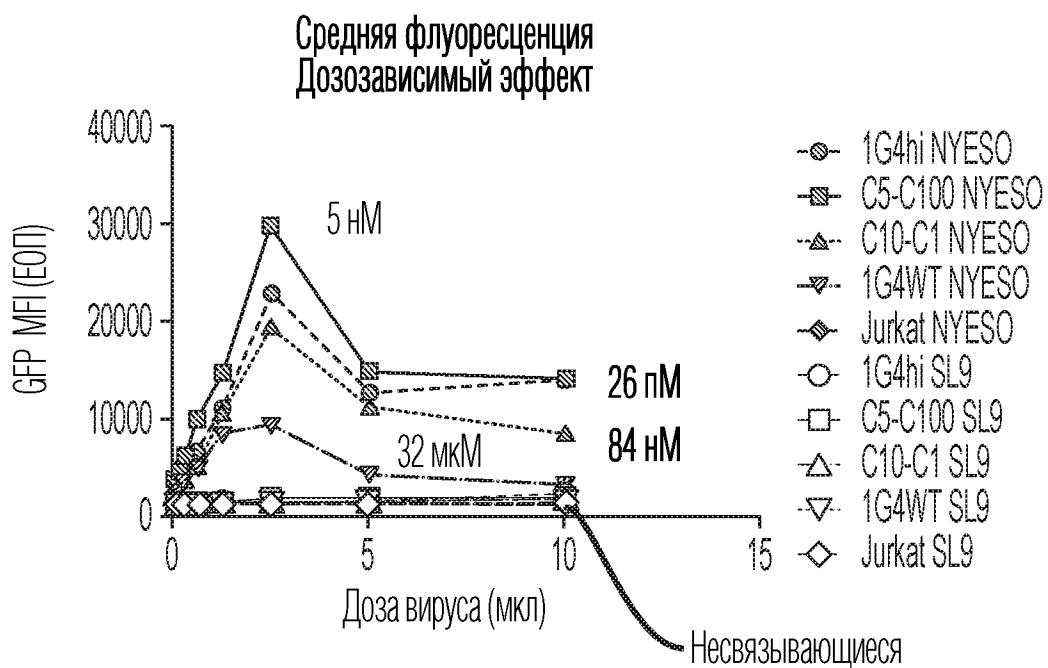
Образец	% положительных	GFP MFI
Нетрансдуцированный	0	1377
1G4hi (26 пМ)	73.2	21890
C5-C100 (5 нМ)	82.3	31325
C10-C1 (84 нМ)	84.8	26000
1G4 WT (32 мкМ)	51.3	10225



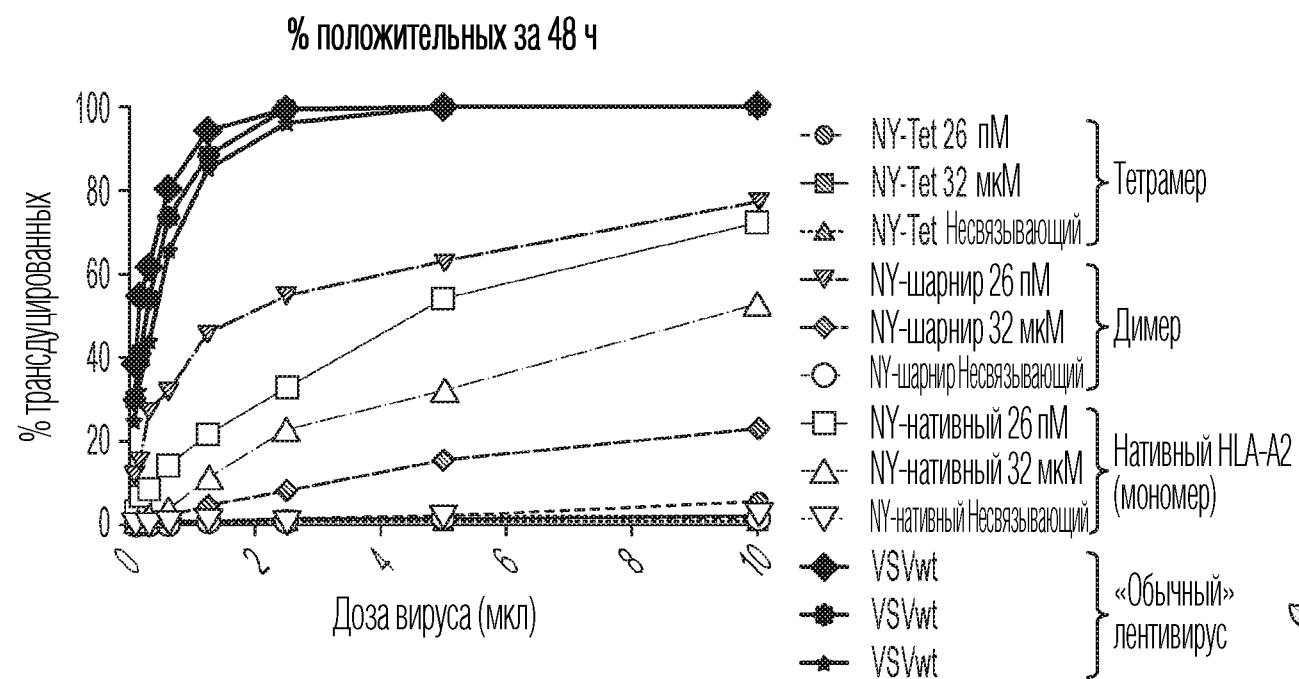
ФИГ. 15



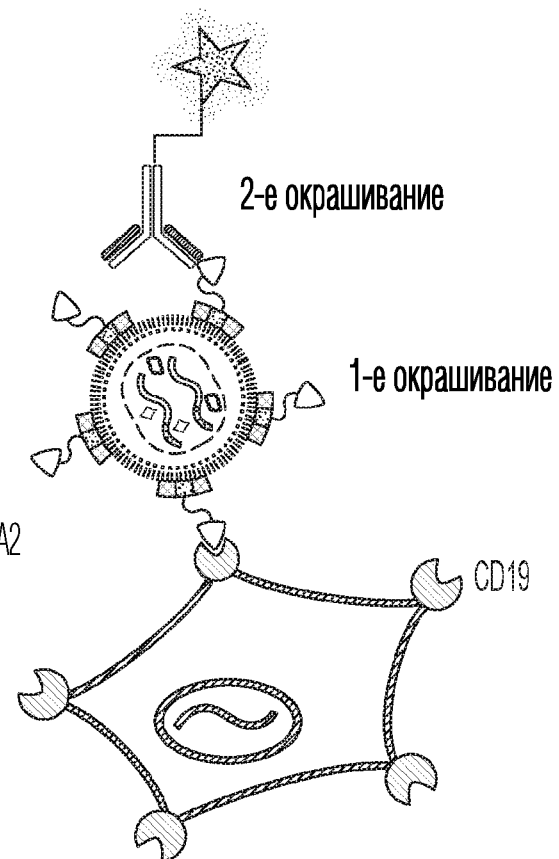
ФИГ. 16А



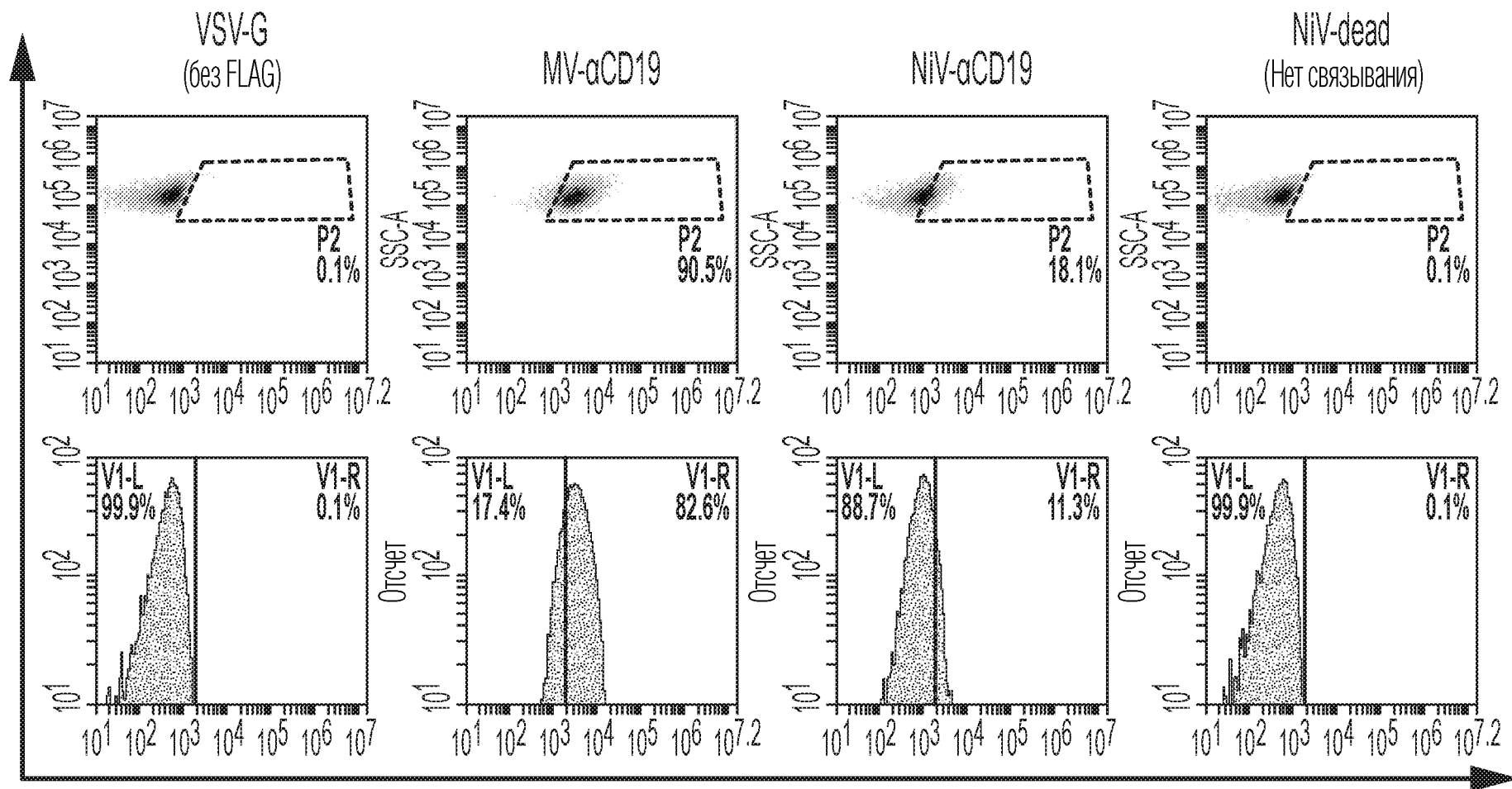
ФИГ. 16В



ФИГ. 17



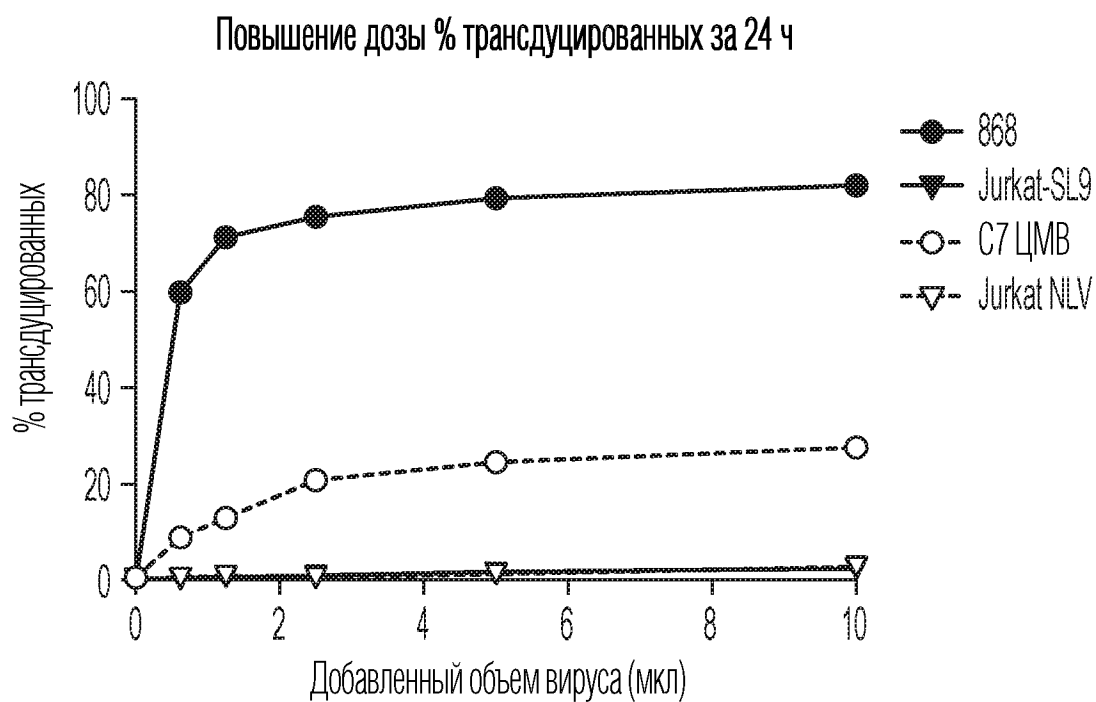
ФИГ. 18А



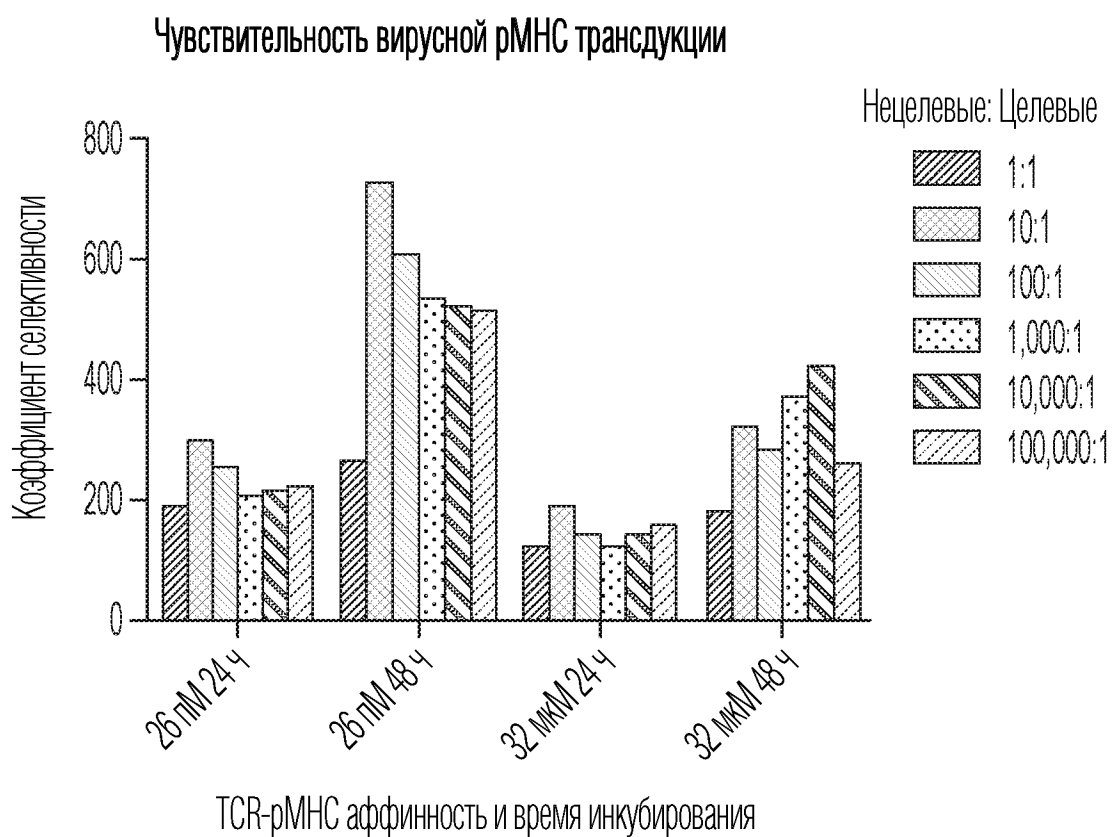
Окраска αFLAG-ФЭ эпитопной метки на поверхности вируса

ФИГ. 18В

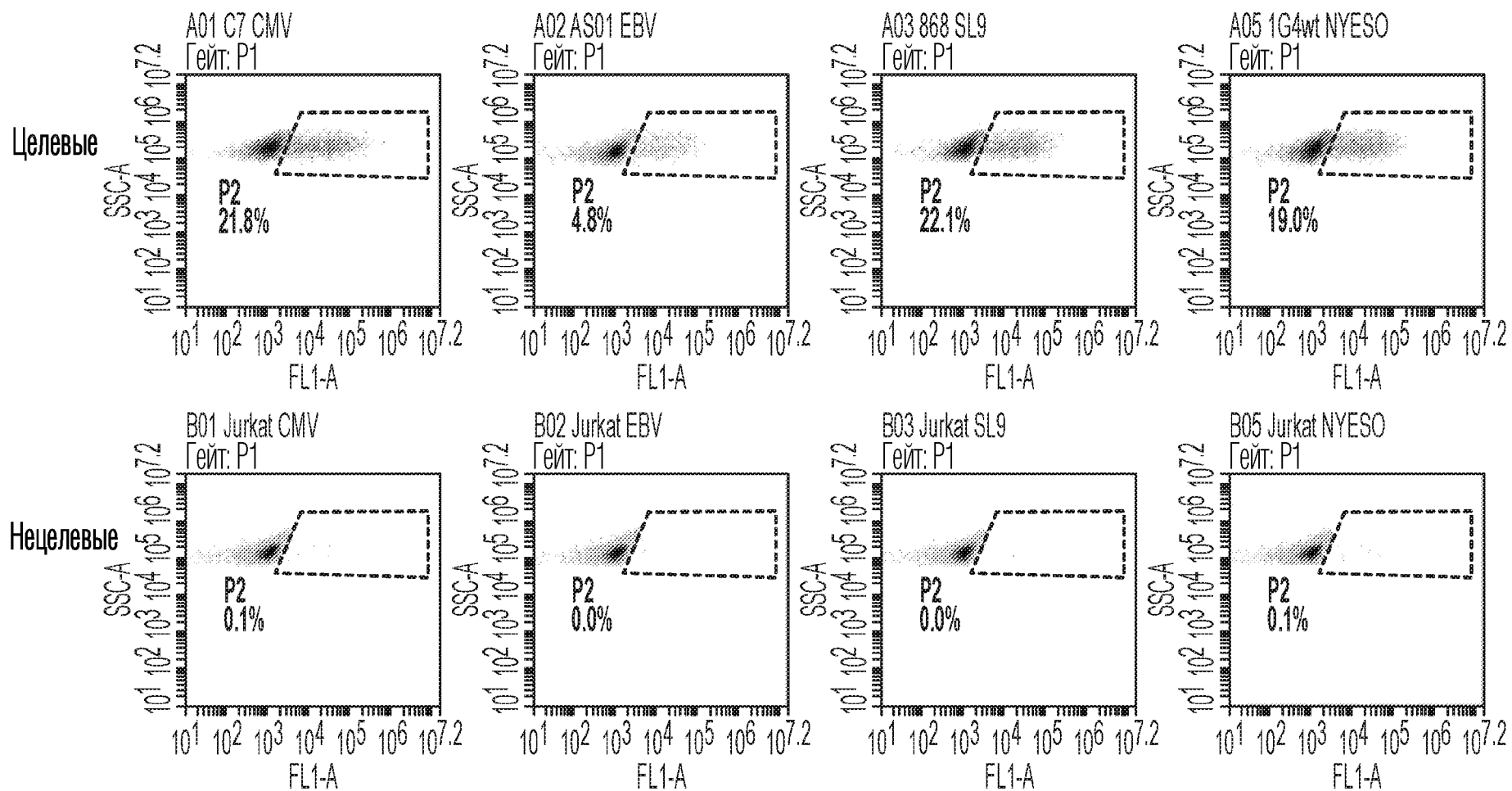
17/24



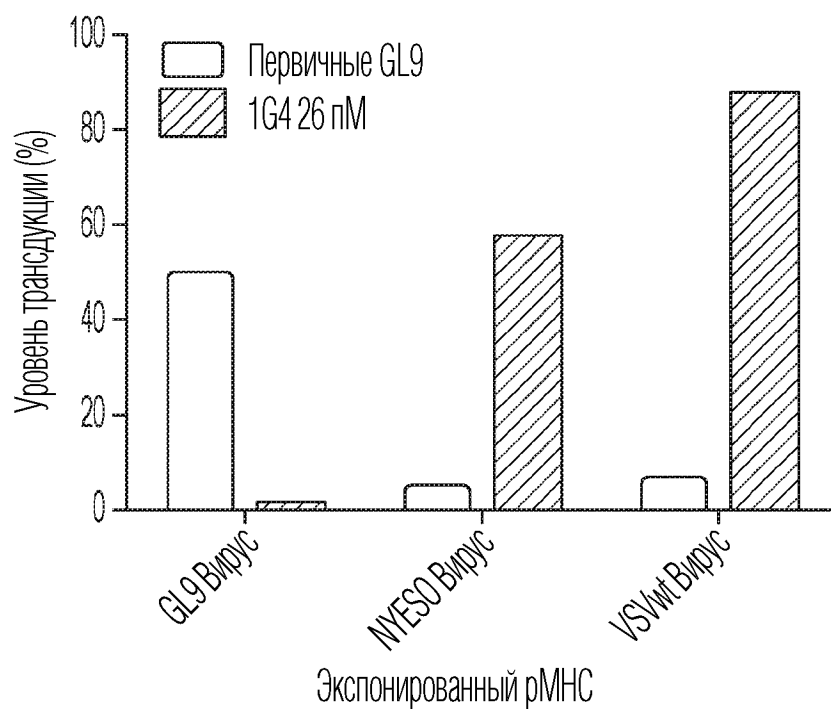
ФИГ. 19



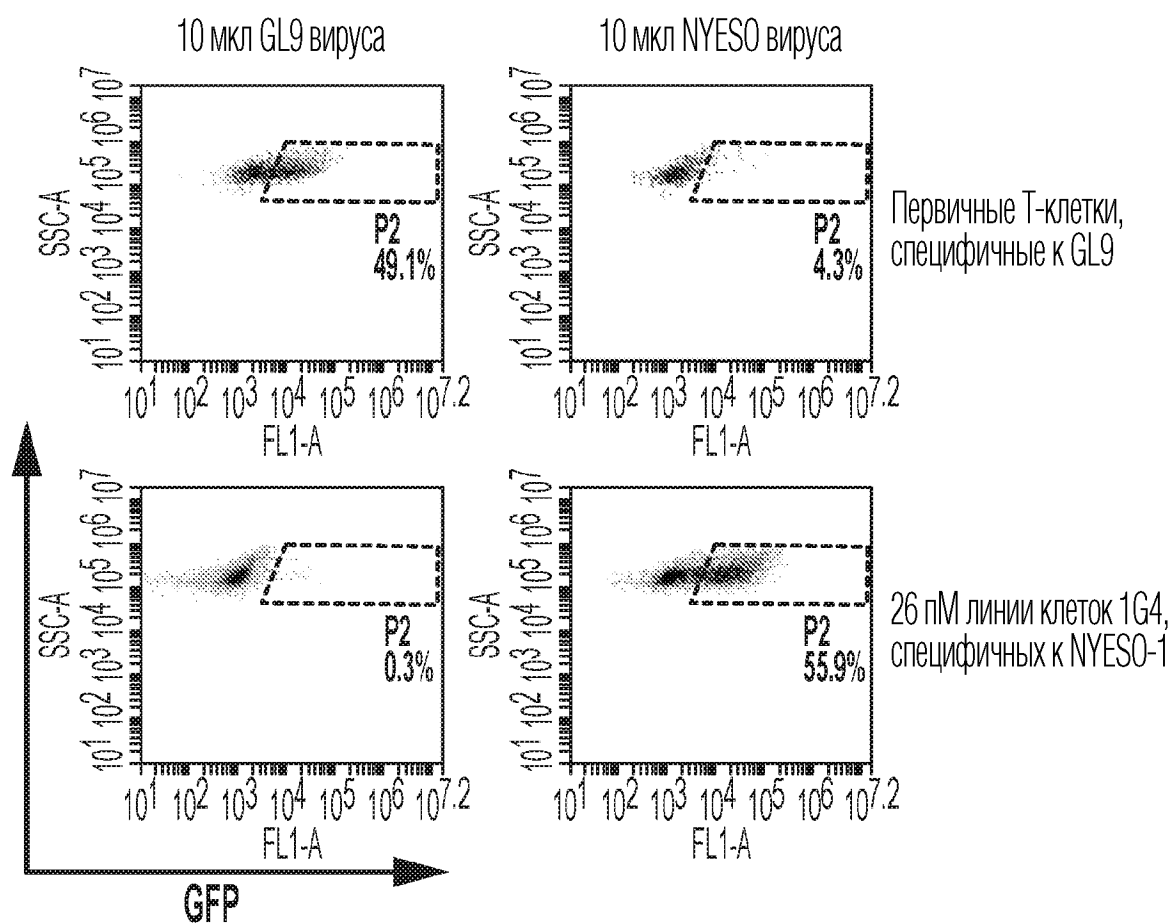
ФИГ. 20



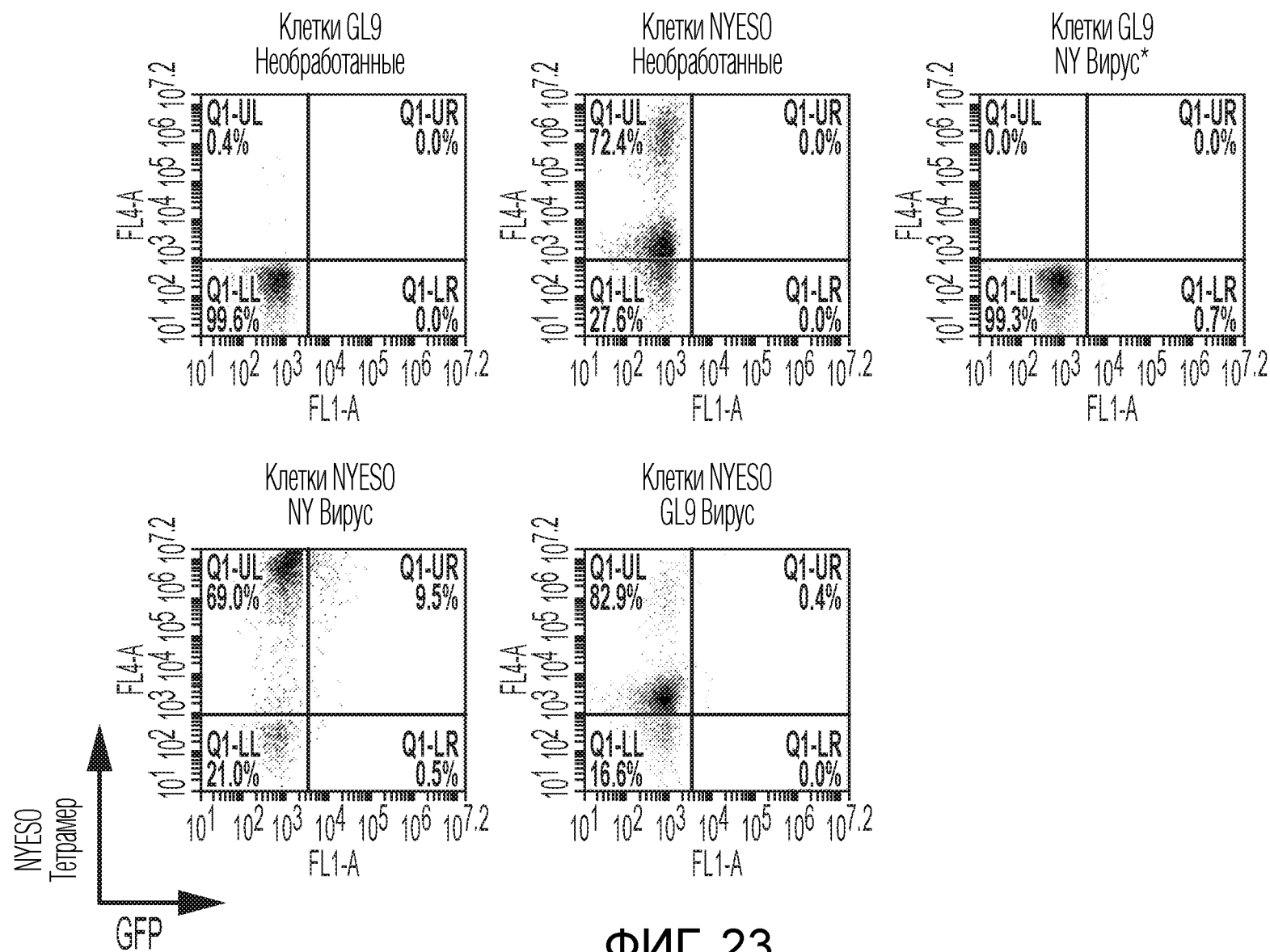
ФИГ. 21



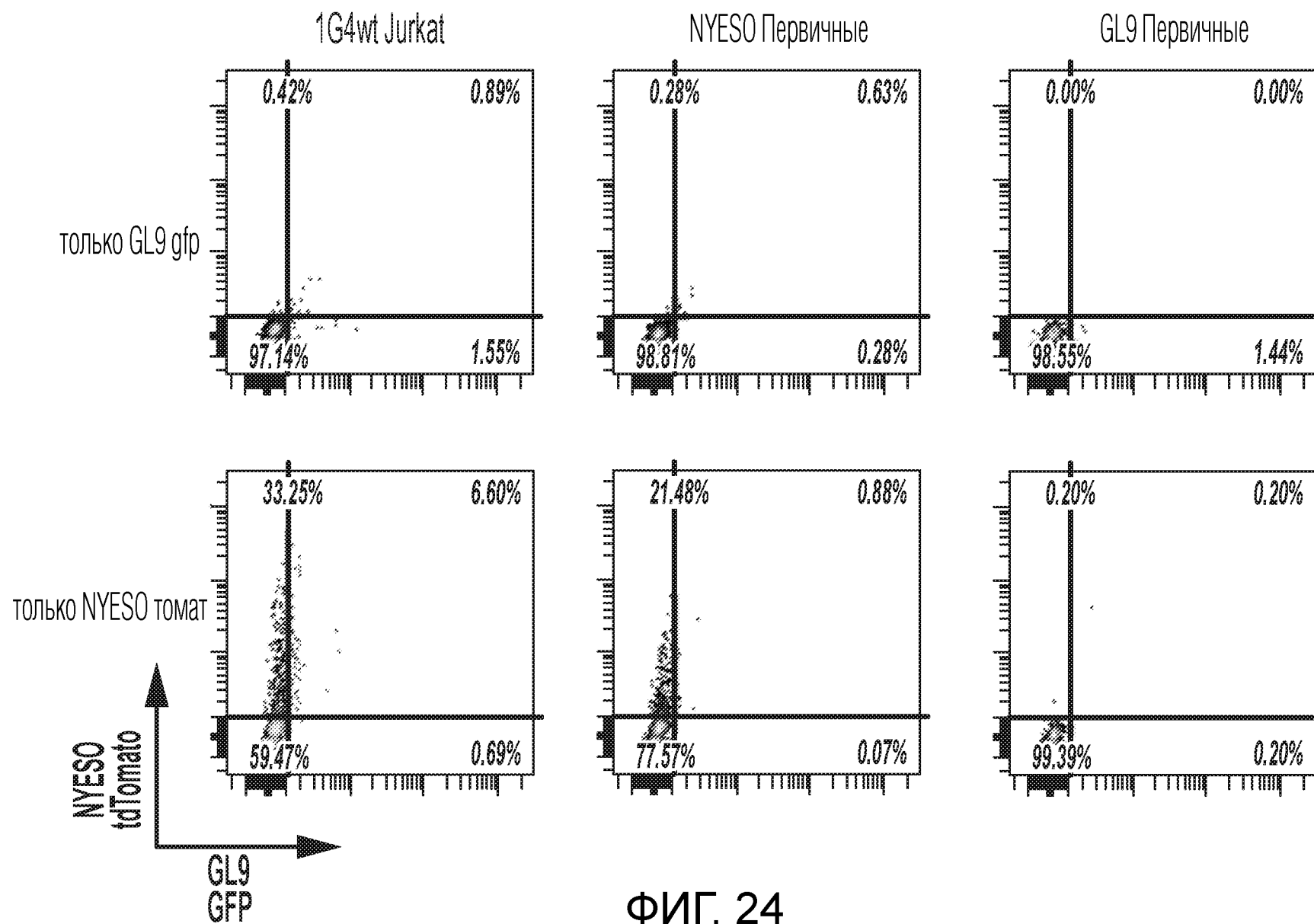
ФИГ. 22А



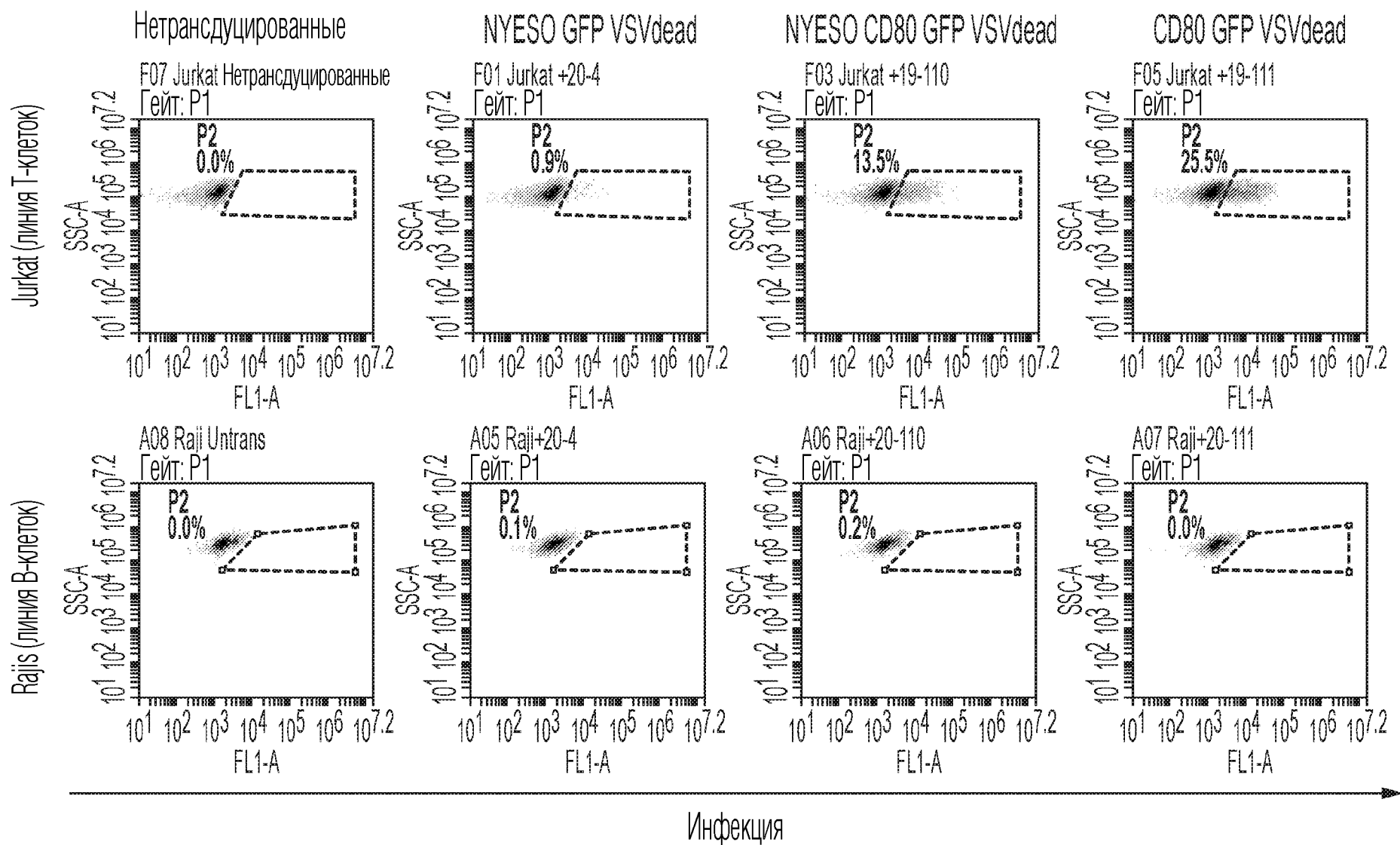
ФИГ. 22В



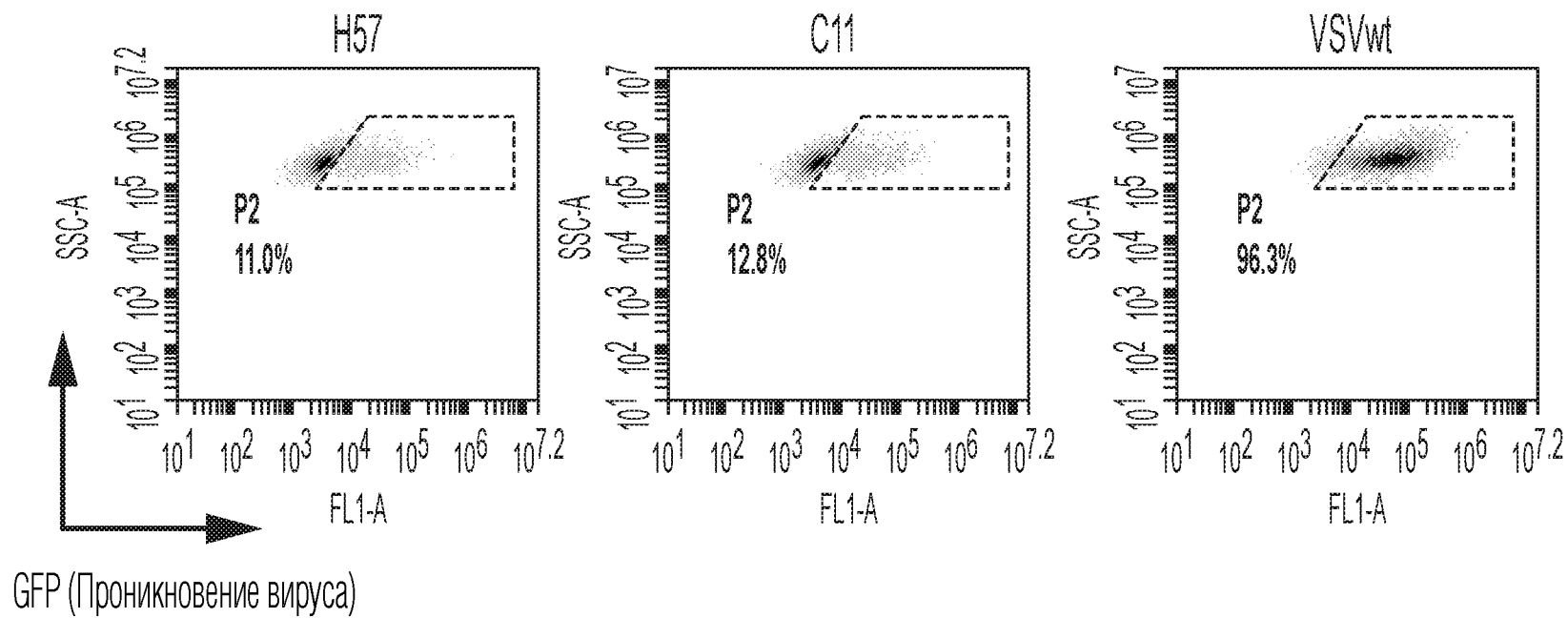
ФИГ. 23



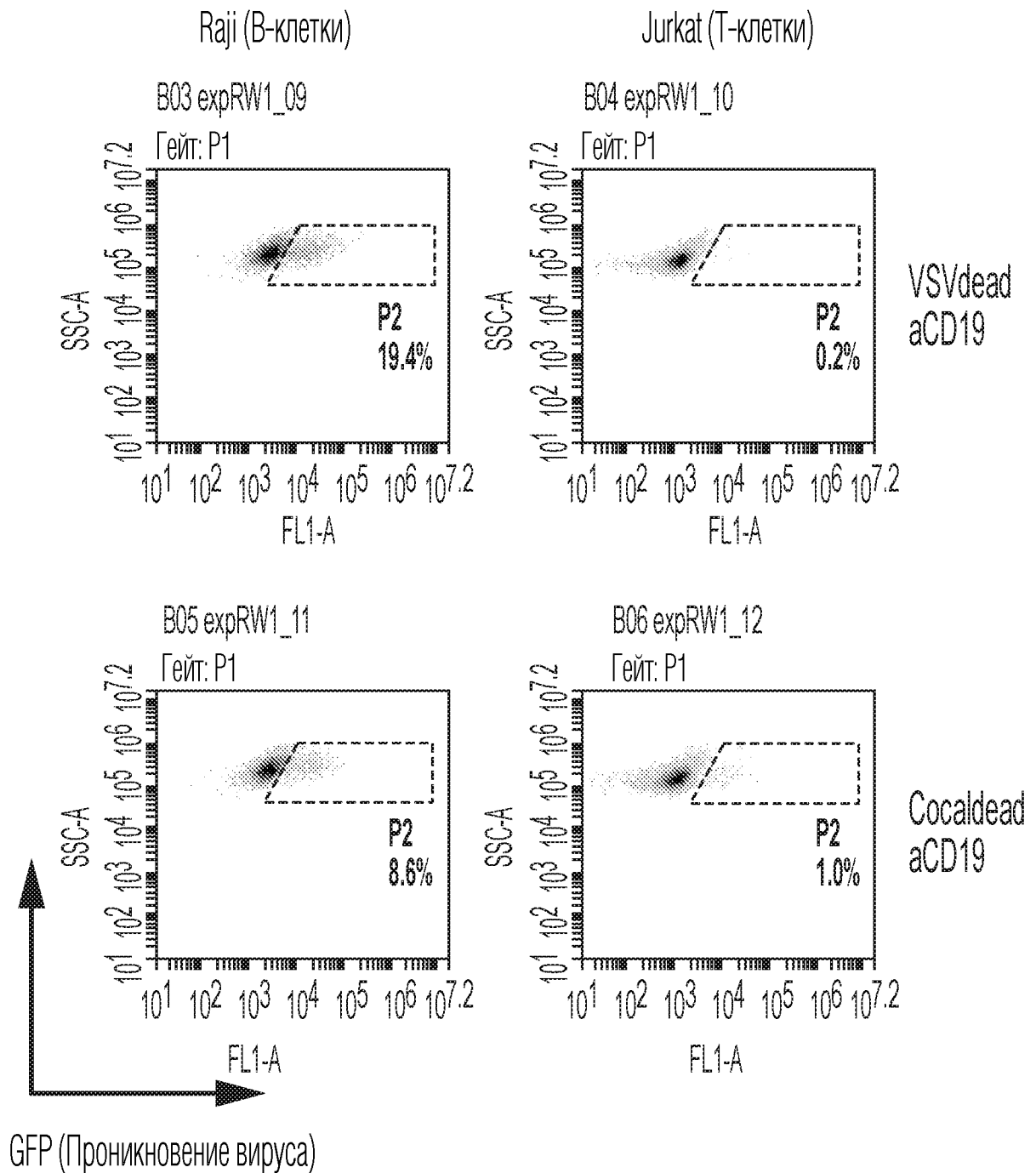
ФИГ. 24



ФИГ. 25



ФИГ. 26



ФИГ. 27