



МІНІСТЕРСТВО  
ЕКОНОМІЧНОГО  
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ  
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **118652** (13) **C2**  
(51) МПК  
**C12N 5/0783** (2010.01)

## (12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

- (21) Номер заявки: **а 2014 13888**
- (22) Дата подання заявки: **13.05.2013**
- (24) Дата, з якої є чинними права на винахід: **25.02.2019**
- (31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **61/651,933, 61/696,612**
- (32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **25.05.2012, 04.09.2012**
- (33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: **US, US**
- (41) Публікація відомостей про заявку: **25.05.2015, Бюл.№ 10**
- (46) Публікація відомостей про видачу патенту: **25.02.2019, Бюл.№ 4**
- (86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: **PCT/US2013/040755, 13.05.2013**
- (72) Винахідник(и):  
**Галетто Роман (FR),  
Губль Аньєс (FR),  
Гросс Стефані (FR),  
Манніуї Сесіль (FR),  
Пуаро Лоран (FR),  
Шаренберг Ендрю (US),  
Сміт Джуліанна (FR)**
- (73) Власник(и):  
**СЕЛЛЕКТИС,  
8 rue de la Croix Jarry, F-75013 Paris, France (FR)**
- (74) Представник:  
**Мошинська Ніна Миколаївна, реєстр.  
№115**

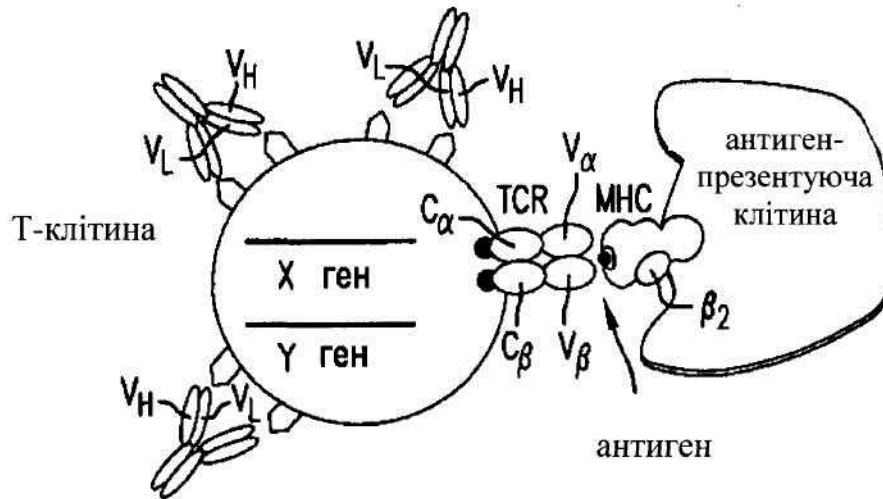
- (56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:  
MIZOGUCHI E ET AL, "Pathogenic role of IL-4, but not IFN-gamma in colitis of TCRalpha knockout mice", GASTROENTEROLOGY, ELSEVIER, PHILADELPHIA, PA, ABSTRACT G4261, vol. 114, doi:10.1016/S0016-5085(98)84235-2, ISSN 0016-5085, (19980415), page A1041  
H. TORIKAI ET AL, "A foundation for universal T-cell based immunotherapy: T cells engineered to express a CD19-specific chimeric-antigen-receptor and eliminate expression of endogenous TCR", BLOOD, PUBLISHED ONLINE APRIL 24, 2012, (20120424), vol. 119, no. 24, doi:10.1182/blood-2012-01-405365, ISSN 0006-4971, pages 5697 - 5705  
M. M. MAHFOUZ ET AL, "De novo-engineered transcription activator-like effector (TALE) hybrid nuclease with novel DNA binding specificity creates double-strand breaks", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, (20110208), vol. 108, no. 6, doi:10.1073/pnas.1019533108, ISSN 0027-8424, pages 2623 - 2628  
OESTERBORG A ET AL, "CLONAL CD8+ AND CD52-T CELLS ARE INDUCED IN RESPONDING B CELL LYMPHOMA PATIENTS TREATED WITH CAMPATH-1H\* (ANTI-CD52)", EUROPEAN JOURNAL OF HAEMATOLOGY, MUNKSGAARD, COPENHAGEN, DK, (19970101), vol. 58, no. 1, ISSN 0902-4441, pages 5 - 13  
GREENWALD R J ET AL, "Negative co-receptors on lymphocytes", CURRENT OPINION IN IMMUNOLOGY, ELSEVIER, OXFORD, GB, (20020601), vol. 14, no. 3, doi:10.1016/S0952-7915(02)00341-2, ISSN 0952-7915, pages 391 - 396  
KIM K D ET AL, "Synergistic inhibition of T-cell activation by a cell-permeable ZAP-70 mutant and ctCTLA-4", BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, ACADEMIC PRESS INC. ORLANDO, FL, US, vol. 381, no. 3, doi:10.1016/J.BBRC.2009.02.046, ISSN 0006-291X, (20090410), pages 355 - 360  
WO 2010/027423 A2, 11.03.2010

(54) СПОСІБ КОНСТРУЮВАННЯ НЕАЛОРЕАКТИВНОЇ І СТИЙКОЇ ДО ІМУНОСУПРЕСІЇ Т-КЛІТИНИ ДЛЯ ІМУНОТЕРАПІЇ

UA 118652 C2

## (57) Реферат:

Винахід стосується способу розробки Т-клітин, отриманих методами генної інженерії, для імунотерапії, які є як неалореактивними, так і стійкими до імуносупресорних лікарських засобів, а саме способу модифікації Т-клітин шляхом інактивації як генів, що кодують мішень імуносупресорного засобу, так і Т-клітинного рецептора, зокрема генів, що кодують CD52 і TCR. Спосіб включає застосування специфічних рідкорозщеплювальних ендонуклеаз, зокрема TALE-нуклеаз (TAL-ефекторних ендонуклеаз) і полінуклеотидів, що кодують такі поліпептиди, для точно спрямованого вибору ключових генів у Т-клітинах, які доступні від донорів або з культури первинних клітин. Винахід відкриває шлях до стандартних і доступних стратегій адаптивної імунотерапії для лікування раку і вірусних інфекцій.



Фіг. 1

## Опис

Перехресне посилання на споріднені заявки

За даною заявкою заявляється пріоритет відповідно до параграфу 35 U.S.C. 119(e) попередньої заявки США No. 61/651933, поданої 25 травня 2012 р.; і попередньої заявки США No. 61/696612, поданої 4 вересня 2012 р., які включені в даний опис за допомогою посилання в повному обсязі.

Галузь техніки, до якої належить винахід

Даний винахід стосується способів розробки Т-клітин, отриманих методами генної інженерії, для імунотерапії, які є неалореактивними і стійкі до імуносупресорних лікарських засобів. Даний винахід стосується способів модифікації Т-клітин шляхом інактивації обох генів, що кодують мішені для імуносупресорного засобу і Т-клітинного рецептора. Цей метод включає використання специфічних рідкорозщеплювальних ендонуклеаз, зокрема TALE-нуклеаз (ендонуклеаз TAL-ефектора), і полінуклеотидів, що кодують такі поліпептиди, для точно спрямованої селекції ключових генів Т-клітин, доступних від донорів або з культури первинних клітин. Винахід також стосується пре-TCR $\alpha$  («pT-альфа») і його функціональних похідних, химерного рецептора антигену (CAR), мультиланцюгового (CAR) і їхнього застосування для підвищення ефективності імунотерапії. Винахід відкриває шлях до стандартних і прийнятних стратегій адаптивної імунотерапії для лікування раку і вірусних інфекцій.

Передумови створення винаходу

Адаптивна імунотерапія, що включає перенесення аутологічних антигенспецифічних Т-клітин, отриманих *ex vivo*, є багатообіцяючою стратегією для лікування вірусних інфекцій і раку. Т-клітини, використовувані для адаптивної імунотерапії, можуть бути створені або шляхом експансії антигенспецифічних Т-клітин, або переспрямування активності Т-клітин за допомогою генної інженерії (Park, Rosenberg et al. 2011). Перенесення Т-клітин, специфічних відносно вірусного антигену, є добре відомим методом, використовуваним для лікування вірусних інфекцій, пов'язаних із трансплантацією, і рідкісних злоякісних пухлин, пов'язаних з вірусами. Аналогічно, виділення і перенесення Т-клітин, специфічних для пухлини, як показано, є сприятливим для лікування меланоми.

Нова специфічність Т-клітин успішно створюється шляхом генетичного перенесення трансгенних Т-клітинних рецепторів або химерних рецепторів антигену (CAR) (Jena, Dotti et al. 2010). CAR являють собою синтетичні рецептори, що складаються з направляючої частини, яка пов'язана з одним або більше сигнальними доменами в єдиній гібридній молекулі. Як правило, зв'язувальна частина CAR складається з антигензв'язувального домену одноланцюгового антитіла (scFv), що включає легкий ланцюг і варіабельні фрагменти моноклонального антитіла, з'єднані гнучким лінкером. Успішно використовуються також зв'язувальні частини, основані на доменах рецептора або ліганду. Сигнальні домени першого покоління CAR походять з цитоплазматичної області CD3-дзета або гамма ланцюгів рецептора Fc. CAR першого покоління, як показано, успішно перенаправляють цитотоксичність Т-клітин, однак, вони не забезпечують пролонгованої експансії і протипухлинної активності *in vivo*. Сигнальні домени коstimулюючих молекул, що включають CD28, OX-40 (CD134) і 4-1BB (CD137), були додані поодиноці (друге покоління) або в комбінації (третє покоління) для росту виживаності і підвищення проліферації Т-клітин, модифікованих CAR. CAR успішно дозволяли Т-клітинам бути переспрямованими проти антигенів, які експресуються на поверхні пухлинних клітин з різних злоякісних пухлин, включаючи лімфоми і солідні пухлини (Jena, Dotti et al. 2010).

Сучасні конструкти CAR основані на такому дизайні молекули, коли усі відповідні домени містяться в межах одного поліпептиду. Такий конструкт вимагає серійного приєднання сигнальних доменів, у результаті чого виникає необхідність переміщення деяких доменів відносно їхнього природного навколосмембранного положення. Таким чином, конструкти, у яких ліганди і сигнальні домени розділені, можуть забезпечити поліпшення функції коstimуляторних доменів, розташованих на різних ланцюгах при їх нормальному навколосмембранному положенні, а не з'єднаних разом з деякими доменами, розташованими дистально плазматичної мембрани. Природний рецептор, високоафінний рецептор IgE (Fc $\epsilon$ RI), дає можливість створити такий конструкт. Fc $\epsilon$ RI, що є присутнім на тучних клітинах і базофілах, зв'язує IgE з високою афінністю. Fc $\epsilon$ RI являє собою тетрамерний рецепторний комплекс, що складається з лігандзв'язувальної альфа-субодиниці, бета-субодиниці і гомодимера двох гамма-субодиниць, які передають сигнал (Metzger, Alcaraz et al. 1986). Альфа-домен Fc $\epsilon$ RI складається з позаклітинного домену, що містить два Ig-подібні домени, що зв'язують IgE, трансмембранного домену і короткого цитоплазматичного хвоста. Бета-субодиниця містить чотири трансмембранні сегменти, що розділяють аміно- і карбокси-кінцеві цитоплазматичні хвости. Гамма-ланцюг складається по суті з трансмембранної області і цитоплазматичного хвоста, що містить один

мотив активації імунорецептора на основі тирозину (ITAM) (Cambier 1995). Дзета-ланцюг комплексу TCR є близькоспорідненим гамма-ланцюгом і може замінювати гамма-ланцюг FcεRI (Howard, Rodewald et al. 1990).

В даний час протокол лікування пацієнтів з використанням адоптивної імунотерапії ґрунтується на перенесенні аутологічних клітин. При такому підході Т-лімфоцити виділяють з пацієнтів, генетично модифікують або відбирають *ex vivo*, культивують *in vitro* для збільшення кількості клітин, якщо це необхідно, і потім вводять пацієнту. На додаток до інфузії лімфоцитів хазяїна можна лікувати іншими способами, що підтримують приживлення Т-клітин або їхню участь в імунній відповіді, наприклад, шляхом попереднього кондиціонування (за допомогою променевої терапії або хіміотерапії) і введення факторів росту лімфоцитів (таких як IL-2). Кожен пацієнт одержує індивідуально підготовлене лікування з використанням власних лімфоцитів пацієнта (тобто аутологічну терапію). Аутологічні види терапії зіштовхуються зі значними технічними і логістичними перешкодами для практичного застосування, покоління цих видів терапії вимагає дорогого спеціалізованого устаткування і висококваліфікованого персоналу, ці види терапії повинні бути створені в короткий час після встановлення діагнозу пацієнта, і, у багатьох випадках, попереднє лікування пацієнта приводить до погіршення імунної функції, так що лімфоцити пацієнта можуть функціонувати погано і бути присутніми у дуже малих кількостях. Через ці перешкоди одержання препарату аутологічних клітин для кожного пацієнта є фактично новим продуктом, що приводить до істотних варіацій в ефективності і безпеці. В ідеалі, бажано використовувати стандартизовану терапію, у якій алогенні терапевтичні клітини можна буде попередньо обробити, докладно охарактеризувати і зробити доступними для негайного введення пацієнтам. Під алогенними маються на увазі клітини, які отримані від індивідумів, що належать до того самого виду, але генетично різноманітні. Однак використання алогенних клітин у даний час має багато недоліків. У імунотропних хазяїнів алогенні клітини швидко відриваються в результаті процесу, що позначається реакцією хазяїна проти трансплантата (HvG), і це істотно обмежує ефективність перенесених клітин. У імунотропних хазяїнів алогенні клітини здатні прижитися, але через специфічність їх ендогенних TCR тканини хазяїна визнаються як чужорідні, що приводить до захворювання трансплантат проти хазяїна (GvHD), що приводить до серйозного ушкодження тканин і смерті. Для того щоб ефективно використовувати алогенні клітини, обидві ці проблеми повинні бути подолані.

У імунотропних хазяїнів алогенні клітини швидко відриваються імунною системою хазяїна. Показано, що алогенні лейкоцити, які присутні у неопромінених продуктах крові, зберігаються протягом не більше ніж 5-6 днів (Boni, Muranski et al. 2008). Таким чином, щоб запобігти відторгненню алогенних клітин, імунна система хазяїна повинна бути ефективно пригнічена. Глюкокортикоїди широко використовуються для терапевтичної імуносупресії (Coutinho and Chapman 2011). Цей клас стероїдних гормонів зв'язується з рецептором глюкокортикоїдів (GR), який присутній у цитозолі Т-клітин, приводячи до його транслокації в ядро і зв'язування зі специфічними мотивами ДНК, що регулюють експресію ряду генів, які беруть участь в імунологічних процесах. Обробка Т-клітин глюкокортикоїдними стероїдами приводить до зниження рівнів продукції цитокінів, що веде до Т-клітинної анергії і заважає активації Т-клітин. Алемтузумаб, також відомий як CAMPATH-1H, є гуманізованим моноклональним антитілом, спрямованим на CD52, глікопротеїдом, зв'язаним із глікозилфосфатидилінозитолом (GPI), що складається з 12 амінокислот (Waldmann and Hale 2005). CD52 експресується на високому рівні на Т- і В-лімфоцитах і на більш низьких рівнях на моноцитах, однак відсутній на гранулоцитах і попередниках кісткового мозку. Лікування алемтузумабом, гуманізованим моноклональним антитілом, спрямованим проти CD52, як показано, викликає швидке виснаження циркулюючих лімфоцитів і моноцитів. Цей препарат часто використовується при лікуванні Т-клітинних лімфом і, у деяких випадках, у вигляді частини схеми кондиціонування при трансплантації. Однак у випадку адоптивної імунотерапії, використання імуносупресорних лікарських засобів також буде впливати на введені терапевтичні Т-клітини. Таким чином, щоб ефективно використовувати підхід адоптивної імунотерапії в цих умовах, введені клітини повинні бути стійкими до лікування імуносупресорними засобами.

З іншого боку, Т-клітинні рецептори (TCR) являють собою рецептори клітинної поверхні, що беруть участь в активації Т-клітин у відповідь на презентацію антигену. TCR звичайно складаються з двох ланцюгів, альфа і бета, що поєднуються з утворенням гетеродимера і зв'язуються з CD3-передавальними субодиницями з утворенням комплексу Т-клітинного рецептора, що присутній на клітинній поверхні. Кожен альфа- і бета-ланцюг TCR складається з імунотропної V-кінцевої варіабельної (V) і константної (C) області, гідрофобного



трансмембранного домену і короткої цитоплазматичної області. Що стосується молекул імуноглобуліну, варіабельна область альфа- і бета-ланцюгів генерується шляхом рекомбінації V(D)J, створюючи велику розмаїтість антигенної специфічності в популяції Т-клітин. Однак на відміну від імуноглобулінів, які розпізнають інтактний антиген, Т-клітини активуються пептидними фрагментами, утвореними в результаті процесингу, зв'язаними з молекулою МНС, що вводить додатковий параметр для розпізнавання антигену Т-клітинами, відомий як МНС-рестрикція. Розпізнавання несумісності МНС між донором і реципієнтом через Т-клітинний рецептор приводить до проліферації Т-клітин і потенційного розвитку GVHD. Показано, що нормальна експресія TCR на поверхні залежить від узгодженого синтезу і зборки всіх семи компонентів комплексу (Ashwell and Klusner 1990). Інактивація або TCR-альфа TCR-бета може привести до видалення TCR з поверхні Т-клітин, запобігаючи розпізнаванню алоантигена і, таким чином, GVHD. Однак порушення роботи TCR веде до видалення компонента передачі сигналу CD3 і змінює способи подальшої експансії Т-клітин.

У нормальних Т-клітинах Т-клітинні рецептори походять із пре-Т-клітинних рецепторів (pTCR), які експресуються в незрілих тимocyтах і мають вирішальне значення для розвитку Т-клітин зі стадії подвійної негативної (CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup>) до стадії подвійної позитивної (CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup>). Пре-Т-клітини, у яких успішно відбулася реорганізація локусу TCR-бета, експресують функціональний ланцюг TCR-бета, що утворює пари з інваріантним ланцюгом пре-Т-альфа і сигнальними компонентами CD3 з утворенням комплексу пре-TCR. Експресія пре-TCR на клітинній поверхні необхідна для запуску бета-селекції, процесу, що індукує експансію Т-клітин, що розвиваються, здійснює алельне виключення локусу TCR-бета і приводить до індукції реорганізацій у локусі TCR-альфа (von Boehmer 2005). Після здійснення реорганізацій TCR-альфа і заміни pT-альфа на TCR-альфа з утворенням зрілого TCR, тимocyти проходять другий етап селекції, що позначається як позитивна селекція або селекція TCR-альфа/бета при своєму зв'язуванні з комплексами пептид-МНС, які експресуються на епітеліальних клітинах тимусу. Таким чином, зрілі Т-клітини розпізнають комплекс антиген/МНС і реагують на нього через свої TCR. Головним негайним наслідком активації TCR є ініціація сигнальних шляхів через зв'язані субодиниці CD3, що веде до множинних подій, включаючи клональну експансію Т-клітин, позитивну регуляцію маркерів активації на клітинній поверхні й індукцію цитотоксичності або секрецію цитокінів.

Завдяки природній селекції ланцюгів TCR-бета через утворення пар із пре-Т-альфа в процесі розвитку тимусу в Т-клітинах, у яких TCR-альфа був інактивований, гетерологічне введення трансгена pT-альфа може привести до утворення пре-TCR. Цей pTCR може служити як засіб активації або стимуляції Т-клітин таким чином, що вона не залежить від МНС, наприклад, надає можливість безупинної експансії альфа/бета-Т-клітин після інактивації TCR-альфа. Важливо відзначити, що комплекс pTCR має подібний до TCR біохімічний склад в плані асоційованих субодиниць CD3 (Carrasco, Ramiro et al. 2001). Крім того, на відміну від TCR передача сигналу пре-TCR може здійснюватися частково незалежним від ліганду шляхом. Кристалічна структура позаклітинного домену pTCR визначає структурну основу можливості незалежної від ліганду передачі сигналу pTCR. pTCR, як показано, утворює димер від голови до хвоста, де зв'язані два гетеродимери pT-альфа-TCR-бета (Pang, Berry et al. 2010).

У даному винаході автори домоглися одержання генетично модифікованих Т-клітин, які долають обмеження наявних у даний час стратегій імунотерапії, даючи можливість їм бути як неалореактивними, так і стійкими до імуносупресорних засобів. Це стало можливим завдяки інактивації генів з використанням специфічних TALE-нуклеаз, спрямованих проти TCR-альфа або TCR-бета, у сполученні з інактивацією генів, що кодують мішені різних імуносупресорних агентів, зокрема, CD52 і GR.

Зокрема, інактивація TCR-альфа або TCR-бета в сполученні з інактивацією CD52 або глюкокортикоїдного рецептора в Т-лімфоцитах, які походять від алогенного донора, значно знижує ризик GVHD шляхом елімінації TCR, відповідального за розпізнавання несумісних МНС, допускаючи при цьому, здійснення проліферації й активності введених лімфоцитів у присутності імуносупресорних агентів, таких як алемтузумаб або глюкокортикоїдні стероїди, що запобігає відторгненню цих клітин. Таким чином, ці модифіковані алогенні Т-клітини, як очікується, будуть більш ефективно здійснювати експансію в крові пацієнта, де вони можуть направлено діяти на пухлинні клітини або інфіковані клітини.

На додаток до представленої вище концепції генетично модифікованих Т-клітин, які можуть бути як неалореактивними, так і стійкими до імуносупресорних засобів, автори при використанні і створенні специфічних TALE-нуклеаз одночасно інактивували ці різні гени в Т-клітинах, тим самим одержавши подвійні мутанти. Справді, дотепер не було досягнуто спрямованої дії на два гени в Т-клітинах за допомогою DSB через труднощі одержання і підтримки Т-клітин у культурі

протягом довгого часу, їхню низьку швидкість трансформації і втрати при процедурах відбору. Ці труднощі приводять до низької імовірності успіху при одержанні таких клітин.

Таким чином, однією істотною частиною даного винаходу є створення специфічних TALE-нуклеаз, що дозволяють досягти більш високих показників подій DSB у Т-клітинах, що добре переносяться клітинами (особливо при спільній трансфекції), здатних направлено відбирати гени відповідно до винаходу. З використанням рідкорозщеплювальних ендонуклеаз, таких як TALE-нуклеази, описані в даному описі, імовірність одержання подвійної інактивації генів у трансфікованих Т-клітинах була істотно підвищена, так що в даний час надається можливість одержувати конструкти Т-клітин, регулярно доступних від донорів, при використанні стандартних методик.

Крім того, у даному винаході пропонується варіант здійснення, у якому Т-клітини сконструйовані таким чином, щоб проліферація дозволялася при інактивації TCR-альфа. У Т-клітин, у яких субодиниця TCR піддалася інактивації, існує важлива проблема, яка полягає в тому, що клітини не можуть більше здійснювати експансію за рахунок комплексу CD3. Щоб подолати цю проблему, автори дійсно пропонують спосіб здійснення експансії Т-клітин, у яких TCR-альфа інактивований за допомогою комплексу CD3, шляхом експресії в клітинах пре-Т-альфа, у такий спосіб відновлюючи функціонуючий комплекс CD3 під час відсутності функціонуючого TCR-альфа/бета.

Нарешті, Т-клітини додатково трансформуються CAR, щоб перенаправляти специфічність алогенних клітин убік антигенів, пов'язаних з пухлиною, незалежно від МНС. Зокрема, винахід стосується мультиланцюгового CAR, у якому костимуляторні домени розташовані в їх нормальному навколOMEMбранному положенні для поліпшення їхніх функцій і, таким чином, підвищення виживаності і збільшення проліферації конструктів Т-клітин. Як результат, винахід пропонує способи, поліпептиди і полінуклеотиди, що дають можливість здійснити ефективну трансформацію алогенних Т-клітин для адаптивної імунотерапії і полегшити їхню експансію за допомогою комплексу CD3.

Суть винаходу

В одному аспекті в даному винаході описані способи розробки Т-клітин методами генної інженерії, зокрема алогенних Т-клітин, доступних від донорів, щоб зробити їх придатними для цілей імунотерапії. Більш конкретно, способи за даним винаходом дозволяють точно модифікувати геном клітин, що мають відношення до імунотерапії, шляхом інактивації або заміни генів, залучених до розпізнавання МНС і/або мішеней імуносупресорних лікарських засобів, для лікування раку і/або вірусних інфекцій. У деяких варіантах здійснення модифіковані клітини, що мають відношення до імунотерапії, додатково включають екзогенні рекомбінантні полінуклеотиди, що кодують CAR, для специфічного клітинного розпізнавання. Дані CAR являють собою єдині гібридні молекули, що вимагають серійного приєднання сигнальних доменів. Переміщення сигнальних доменів з їх природного навколOMEMбранного положення може заважати їхній функції. Таким чином, щоб подолати цей недолік, автори створили мультиланцюговий CAR, який походить від FcεRI, щоб забезпечити можливість нормального навколOMEMбранного положення усіх відповідних сигнальних доменів. Високоафінний IgE-зв'язувальний домен альфа-ланцюга FcεRI був замінений на позаклітинний лігандзв'язувальний домен, такий як scFv, для переспрямування специфічності Т-клітини відносно клітин-мішеней, і N- і/або C-кінці хвостів бета-ланцюга FcεRI використовувалися для розміщення костимуляторних сигналів у нормальному навколOMEMбранному положенні.

В іншому аспекті для того, щоб сприяти активації або стимуляції Т-клітин, у яких TCR-альфа був інактивований, у конструкти Т-клітин вводять рТ-альфа або його функціональний варіант. Використовуваний рТ-альфа або його функціональний варіант може являти собою або повнорозмірний рТ-альфа або сплайсинговий варіант (Saint-Ruf, Lechner et al. 1998), C-кінцевий укорочений варіант, що, як показано, збільшує експресію пре-TCR (Carrasco, Ramiro et al. 2001). Можуть бути використані інші додаткові укорочення, або коротші, або довші, ніж описані. Різні варіанти пре-Т-альфа можуть додатково включати сигнальні фрагменти від інших молекул (CD28, CD137, CD8, TCR-альфа і т. д.), щоб сприяти проліферації і виживанню, або включати мутації, що впливають на його здатність до димеризації, наприклад, мутації D22A, R24A, R102A або R117A, описані раніше в мишей (Yamasaki, Ishikawa et al. 2006), або мутацію W46R, описану в людей (Pang, Berry et al. 2010), щоб зменшити проліферативний потенціал. Частина scFv CAR може бути також з'єднана з позаклітинним доменом рТ-альфа або з його функціональним варіантом, таким чином, поєднуючи специфічність відносно безпосередньо антигенів-мішеней із проліферативною активністю пре-TCR.

В іншому аспекті даний винахід стосується поліпептидів і полінуклеотидів, що кодують рідкорозщеплювальні ендонуклеази, для точно спрямованої дії на вказані вище гени, які

становлять інтерес, зокрема на TCR-альфа, TCR-бета, GR і CD52, тим самим створюючи можливість генетичної модифікації Т-клітин для імунотерапії. У даному винаході пропонуються більш конкретні специфічні послідовності-мішені в межах цих генів, і TALE-нуклеази, сконструйовані для відповідних мішеней цих генів.

5 Даний винахід стосується також виділених клітин або клітинних ліній, що включають будь-який з білків, поліпептидів або векторів, описаних у даному описі. У деяких варіантах здійснення Т-клітини за даним винаходом включають інактивовані гени TCR-альфа, TCR-бета, GR або CD52 для їхнього використання в імунотерапії. Виділені клітини за даним винаходом або клітинні лінії можуть додатково включати екзогенні рекомбінантні полінуклеотиди, зокрема

10 полінуклеотиди, що кодують рТ-альфа або його функціональний варіант, CAR або мультиланцюгові CAR.

У переважному варіанті здійснення модифіковані Т-клітини використовують як терапевтичний продукт, в ідеалі, як «готовий до використання» продукт.

В іншому аспекті даний винахід стосується способу лікування або профілактики раку або інфекції в пацієнта шляхом введення сконструйованих Т-клітин, отриманих вказаними вище способами.

Короткий опис фігур і таблиць

На додаток до приведених вище ознак винахід додатково включає інші ознаки, які будуть зрозумілі з наступного опису, а також із прикладених фігур. Більш повне розуміння винаходу і багатьох його супутніх переваг буде легко досягнуте й у той же самий час стане більш зрозуміло при посиланні на наступні фігури в сполученні з наступним докладним описом.

На фіг. 1 представлено схематичне зображення нормальних взаємин між Т-клітинами й антигенпрезентуючою клітиною.

На фіг. 2 представлено схематичне зображення генетично модифікованих терапевтичних Т-клітин відповідно до винаходу і пухлинних клітин пацієнта.

На фіг. 3 представлено схематичне зображення мультиланцюгового CAR.

На фіг. 4 представлена схема різних варіантів мультиланцюгового CAR. А. Схема рецептора FcεRI. В-С. Різні варіанти мультиланцюгового CAR (csm1-csm10), що містять ScFv і область стебла CD8, з'єднані з трансмембранним доменом альфа-ланцюга FcεRI. Щонайменше один з доменів 41BB, CD28 і/або CD3-дзета може бути з'єднаний з альфа-, бета- і/або гамма-ланцюгом FcεRI.

На фіг. 5 представлено схематичне зображення одного приклада способу конструювання алогенних клітин людини для імунотерапії.

На фіг. 6 представлена концентрація в клітинах на мілілітр живих CD52-позитивних або CD52-негативних клітин після лікування антитілом проти CD52 (CAMPATH1-H) з комплементом або контрольними пробами.

На фіг. 7 представлено рівняння розподілу прямого світлорозсіювання (FSC), показника розміру клітин, між TCR-позитивними і TCR-негативними клітинами або між CD52-позитивними і CD52-негативними клітинами і неактивованими клітинами як контролем.

На фіг. 8 представлений аналіз за допомогою протокової цитометрії експресії CD107a (маркера дегрануляції) на Т-клітинах-мішенях з інактивованими CD52 і TCR-альфа. Експресію CD107 аналізували на CD52+TCRαβ + клітинах (перший стовпець), CD52-TCRαβ - клітинах (другий стовпець), CD52-TCRαβ + клітинах (третій стовпець) і CD52+TCRαβ - клітинах (четвертий стовпець) до (А) і після інкубації з клітинами Daudi (В); С) представляє аналіз за допомогою протокової цитометрії Т-клітин з додатковою трансфекцією CAR і інкубацією з клітинами Daudi; D) представляє аналіз за допомогою протокової цитометрії Т-клітин, трансфікованих CAR, але не інкубованих із клітинами Daudi, і E) представляє аналіз за допомогою протокової цитометрії Т-клітин, трансфікованих CAR і оброблених РМА/іономіцином (позитивний контроль).

На фіг. 9 представлений аналіз методом глибокого секвенування потенційних зовнішніх мішеней TALE-нуклеаз CD52 і TRAC.

На фіг. 10 представлений аналіз геномного локусу PDCD1 і CTLA-4 за допомогою тесту з T7-ендонуклеазою. Стрілки вказують на гідролізовані продукти ПЛР.

На фіг. 11 представлено схематичне зображення деяких прикладів конструктів пре-Т-альфа.

На фіг. 12 представлений аналіз за допомогою протокової цитометрії ефективності трансдукції (% BFP+ клітин) і активності конструктів FL, Δ18, Δ48 рТ-альфа (% експресії CD3 на поверхні) клітин Jurkat з інактивованим TCR-альфа.

На фіг. 13 представлено схематичне зображення конструкта лентівірусу, що кодує білок рТ-альфа (пре-TCRα).

На фіг. 14 А. Представлений експериментальний протокол. В. Представлений аналіз за допомогою протокової цитометрії TCR-альфа/бета, експресії CD3 і експресії BFR на Т-клітинах з інактивованим TCR-альфа (КО), трансдукованих або BFR-2A-pT-альфаΔ48 (КО/Δ48), або контрольним лентівірусним вектором BFP (КО/BFP) до і після очищення. С. Представлений аналіз за допомогою протокової цитометрії TCR-альфа/бета й експресії CD3 на очищених клітинах з інактивованим TCR-альфа, трансдукованих лентівірусним вектором BFP-2A-pT-альфаΔ48 (BFPpos) або без трансдукції (BFPneg). NEP позначає неелектропоровані клітини з TALE-нуклеазами TRAC.

На фіг. 15 А-В. Представлений аналіз за допомогою протокової цитометрії експресії маркера ранньої активації CD69 (А), маркера пізньої активації CD25 (В) через 24 і 48 годин після повторної активації кульками анти-CD3/CD28, відповідно, на неелектропорованих клітинах (NEP) і клітинах з інактивованим TCR-альфа (КО), трансдукованих лентівірусним вектором BFP-2A-PTA-Δ48 (pTα-Δ48), лентівірусним вектором BFP-2A-PTA-Δ48.41BB (pTα-Δ48.BB) або контрольним вектором BFP (BFP). Гістограми pTα-Δ48 відповідають виявленому сигналу в клітинах з інактивованим TCR-альфа, які експресують pTα-Δ48 (BFP+ клітини), у той час як гістограми КО відповідають клітинам з інактивованим TCR-альфа, що не експресують pTα-Δ48 (BFP- клітини), гістограми pTα-Δ48.BB відповідають сигналу, який виявляється в клітинах з інактивованим TCR-альфа, які експресують pTα-Δ48.41BB (BFP+ клітини), у той час як гістограми КО відповідають клітинам з інактивованим TCR-альфа, які не експресують pTα-Δ48.41BB (BFP - клітини). Гістограми NEP (без електропорації) відповідають сигналу, що виявляється в немодифікованих клітинах. С. Представлений аналіз за допомогою протокової цитометрії розміру клітин через 72 години після повторної активації кульками анти-CD3/CD28 клітин без електропорації (NEP) і клітин з інактивованим TCR-альфа (КО), трансдукованих лентівірусним вектором BFP-2A-pTα-Δ48 (pTα-Δ48), лентівірусним вектором BFP-2A-pTα-Δ48.41BB (pTα-Δ48.41BB) або контрольним вектором BFP (BFP). Значення, вказані у верхній частині кожного графіка, відповідає середньому геометричному флуоресценції кожної популяції.

На фіг. 16 представлений аналіз росту клітин з інактивованим TCR-альфа (КО), трансдукованих вектором pT-альфа-Δ48 (pTαΔ48) або контрольним вектором BFP (BFP), підтримуваних у середовищі з IL-2 або в середовищі з IL-2 і кульками анти-CD3/CD28 у різні моменти часу (вісь х). Кількість клітин BFP+ оцінювали в різні моменти часу для кожного стану, і ступінь індукції цих клітин (вісь Y) оцінювали відносно значення, отриманого на 2 день після реактивації. Результати отримані від двох незалежних донорів. У другого донора визначали також ріст клітин для клітин, трансдукованих pT-альфа-Δ48.41BB (PTA-A48.BB), і повнорозмірний pT-альфа-(PTA-FL).

На фіг. 17 представлений аналіз за допомогою протокової цитометрії GFP-позитивних клітин у PBMC, електропорованих за допомогою п'яти різних програм Cytopulse. Верхня лінія відповідає трансфекції  $6 \times 10^6$  клітин на кювету, у той час як нижня лінія відповідає трансфекції  $3 \times 10^6$  клітин на кювету.

На фіг. 18 представлений аналіз за допомогою протокової цитометрії загибелі очищених Т-клітин з використанням барвника на виживаність (eFluor-450) і GFP-позитивних клітин серед життєздатної популяції після електропорації мПНК GFP, ДНК GFP і контрольної ДНК pUC. NEP відповідає клітинам, що підтримувалися в буфері для електропорації, але не піддавалися електропорації, і NT відповідає неелектропорованим клітинам, підтримуваним у культуральному середовищі.

На фіг. 19 представлений аналіз за допомогою протокової цитометрії експресії TCR-альфа/бета і CD3 на первинних Т-клітинах людини після електропорації мПНК TALE-нуклеази TRAC (угорі). Аналіз методом глибокого секвенування геномної ДНК, проекстрагованої з первинних Т-клітин людини після електропорації мПНК TALE-нуклеази TRAC (унизу).

На фіг. 20 А. Представлений аналіз за допомогою протокової цитометрії експресії CAR (анти F(ab')<sub>2</sub>) після електропорації Т-клітин мПНК, що кодує один ланцюг CAR, або без неї. В. Представлений аналіз за допомогою протокової цитометрії експресії CD107a (маркера дегрануляції) на електропорованих Т-клітинах, культивованих разом із клітинами Daudi.

На фіг. 21 А. Представлене зображення мПНК, що кодує мультиланцюговий CAR. В. Представлений аналіз за допомогою протокової цитометрії експресії CAR (анти F(ab')<sub>2</sub>) на життєздатних Т-клітинах, електропорованих поліцистронною мПНК, що кодує мультиланцюговий CAR, або без неї. С. Представлений аналіз за допомогою протокової цитометрії експресії CD107a (маркера дегрануляції) на електропорованих Т-клітинах, культивованих разом із клітинами Daudi.

Таблиця 1: Представлений опис TALE-нуклеаз GR і послідовностей сайтів-мішеней TALE-нуклеаз у гені GR людини.

Таблиця 2: Представлена розщеплювальна GR активність TALE-нуклеаз у дріжджах. Значення в діапазоні від 0 до 1. Максимальне значення дорівнює 1.

Таблиця 3: Представлений відсоток направлено мутагенезу в ендогенних сайтах-мішенях TALE-нуклеаз у клітинах 293.

5 Таблиця 4: Представлений відсоток направлено мутагенезу в ендогенних сайтах-мішенях TALE-нуклеаз у первинних Т-лімфоцитах.

Таблиця 5: Представлений опис TALE-нуклеаз для CD52, TRAC і TRBC і послідовностей сайтів-мішеней TALE-нуклеаз у відповідних генах людини.

Таблиця 6: Представлені додаткові послідовності-мішені для TALE-нуклеаз TRAC і CD52.

10 Таблиця 7: Представлений відсоток вставок-делецій у мішеней для TALE-нуклеази, спрямованої на CD52\_T02, TRAC\_T01, TRBC\_T01 і TRBC\_T02.

Таблиця 8: Представлені відсотки CD52-негативних, TCR-негативних і CD52/TCR-подвійних негативних Т-лімфоцитів після трансфекції відповідних полінуклеотидів, які експресують TALE-нуклеазу.

15 Таблиця 9: Представлені відсотки TCR-негативних Т-лімфоцитів після трансфекції полінуклеотидів, які експресують TALE-нуклеази TRBC.

Таблиця 10: Представлений опис TALE-нуклеаз для CTLA4 і PDCD1 і послідовностей сайтів-мішеней TALE-нуклеаз у відповідних генах людини.

Таблиця 11: Представлений опис підгрупи конструктів рТ-альфа.

20 Таблиця 12: Представлена активність різних конструктів рТ-альфа в клітині Jurkat з інактивованим TCR-альфа. Активність вимірювали, аналізуючи за допомогою протокової цитометрії експресію CD3 на клітині Jurkat з інактивованим TCR-альфа, трансфікованої різними конструктами пре-Т-альфа.

25 Таблиця 13: Представлені різні програми Cytopulse, використовувані для визначення мінімальної напруги, необхідної для електропорації в Т-клітині, які походять від PBMC.

Таблиця 14: Представлена програма Cytopulse, використовувана для електропорації очищених Т-клітин.

Докладний опис винаходу

30 Якщо в даному описі спеціально не обговорене інше, усі використовувані технічні і наукові терміни мають те ж значення, що і те, що звичайно розуміється фахівцем в галузі генної терапії, біохімії, генетики і молекулярної біології.

35 Усі методи і матеріали, аналогічні або еквівалентні описаним у даному описі, можуть бути використані на практиці або при тестуванні даного винаходу, причому придатні методи і матеріали описані в даному описі. Усі публікації, патентні заявки, патенти й інші посилання, приведені в даному описі, включені за допомогою посилання в повному обсязі. У випадку конфлікту, даний опис, включаючи визначення, буде мати перевагу. Крім того, матеріали, методи і приклади є тільки ілюстративними і не призначені для обмеження, якщо не вказане інше.

40 У практиці даного винаходу будуть використовуватися, якщо не вказане інше, звичайні методи клітинної біології, культивування клітин, молекулярної біології, трансгенної біології, мікробіології, рекомбінантної ДНК і імунології, які відомі фахівцям у даній галузі техніки. Такі методи докладно описані в літературі. Див., наприклад, Current Protocols in Molecular Biology (Frederick M. AUSUBEL, 2000, Wiley and son Inc, Library of Congress, USA); Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Third Edition, (Sambrook et al, 2001, Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press); Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait ed., 1984); Mullis et al., патент США 4683195; Nucleic Acid Hybridization (B. D. Harries & S. J. Higgins eds. 1984); Transcription And Translation (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984); Culture Of Animal Cells (R. I. Freshney, Alan R. Liss, Inc., 1987); Immobilized Cells And Enzymes (IRL Press, 1986); B. Perbal, A Practical Guide To Molecular Cloning (1984); the series, Methods In ENZYMOLOGY (J. Abelson and M. Simon, eds. -in-chief, Academic Press, Inc., New York), особливо Vols.154 і 155 (Wu et al. eds.) і Vol. 185, "Gene Expression Technology" (D. Goeddel, ed.); Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells (J. H. Miller and M. P. Calos eds., 1987, Cold Spring Harbor Laboratory); Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology (Mayer and Walker, eds., Academic Press, London, 1987); Handbook Of Experimental Immunology, Volumes I-IV (D. M. Weir and C. C. Blackwell, eds., 1986); і Manipulating the Mouse Embryo, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1986).

55 У загальному аспекті даний винахід стосується способів для нових стратегій адаптивної імунотерапії при лікуванні раку й інфекцій.

Неалореактивні і стійкі до імуносупресії Т-клітини

60 У конкретному аспекті даний винахід стосується способу конструювання Т-клітин особливо для імунотерапії. Зокрема цей спосіб включає:

(а) модифікацію Т-клітин шляхом інактивації щонайменше:

першого гена, який експресує мішень для імуносупресорного засобу, і  
другого гена, що кодує компонент Т-клітинного рецептора (TCR);

(b) експансію вказаних клітин необов'язково в присутності вказаного імуносупресорного засобу.

Імуносупресорний засіб являє собою засіб, що пригнічує імунну функцію за допомогою одного з декількох механізмів дії. Іншими словами, імуносупресорний засіб відіграє роль сполуки, що має можливість зменшити ступінь і/або активність імунної відповіді. Як необмежувальний приклад, імуносупресорний засіб може являти собою інгібітор кальциневрину, мішень рапаміцину, блокатор  $\alpha$ -ланцюга інтерлейкіну-2, інгібітор інозинмонофосфатдегідрогенази, інгібітор редуктази дигідрофолевої кислоти, кортикостероїд або імуносупресорний антиметаболіт. Класичні цитотоксичні імуносупресорні засоби діють шляхом інгібування синтезу ДНК. Інші засоби можуть діяти через активацію Т-клітин або шляхом інгібування активації клітин-хелперів. Спосіб за винаходом дозволяє додати Т-клітинам для імунотерапії стійкості до імуносупресії шляхом інактивації мішені імуносупресорного засобу в Т-клітинах. Як необмежувальні приклади, мішенню для імуносупресорного засобу може бути рецептор імуносупресорного засобу, такий як: CD52, глюкокортикоїдний рецептор (GR), член сімейства генів FKBP і член сімейства генів циклофілінів.

У конкретному варіанті здійснення стадія способу генетичної модифікації залежить від інактивації одного гена, вибраного з групи, яка складається з CD52, GR, TCR-альфа і TCR-бета. В іншому варіанті здійснення стадія способу генетичної модифікації залежить від інактивації двох генів, вибраних із групи, яка складається з CD52 і GR, CD52 і TCR-альфа, CDR52 і TCR-бета, GR і TCR-альфа, GR і TCR-бета, TCR-альфа і TCR-бета. В іншому варіанті здійснення стадія способу генетичної модифікації залежить від інактивації більше двох генів. Генетична модифікація переважно відбувається *ex vivo*.

Під інактивацією гена мається на увазі, що ген, який представляє інтерес, не експресується у формі функціонального білка. У конкретному варіанті здійснення спосіб генетичної модифікації залежить від експресії в клітинах, пропонувананих для конструювання, однієї рідкорозщеплювальної ендонуклеази так, що рідкорозщеплювальна ендонуклеаза специфічно каталізує розщеплення в одному гені-мішені, тим самим ініціюючи вказаний ген-мішень. Розриви ланцюга нуклеїнової кислоти, викликані рідкорозщеплювальною ендонуклеазою, звичайно репаруються за допомогою чітких механізмів гомологічної рекомбінації або негомологічного приєднання кінця (NHEJ). Однак NHEJ є недосконалим процесом репарації, що часто приводить до змін у послідовності ДНК у сайті розщеплення. Механізми включають повторне з'єднання того, що залишилося від двох кінців ДНК шляхом прямого повторного лігування (Critchlow and Jackson 1998) або шляхом з'єднання так званого опосередкованого мікрогомологією кінця (Ma, Kim et al. 2003). Репарація за допомогою негомологічного приєднання кінця (NHEJ) часто приведе до невеликих вставок або делецій і може бути використана для створення специфічних нокаутів генів. Вказана модифікація може являти собою заміну, делецію або додавання щонайменше одного нуклеотиду. Клітини, у яких відбулася подія індукованого розщеплення мутагенезу, тобто подія мутагенезу, що є наслідком події NHEJ, можуть бути ідентифіковані і/або відібрані способом, добре відомим у даній галузі техніки. У конкретному варіанті здійснення вказаний спосіб конструювання клітин включає щонайменше одну з наступних стадій:

(а) забезпечення Т-клітини переважно з клітинної культури або зі зразка крові;  
(b) вибір гена у вказаній Т-клітині, яка експресує мішень імуносупресорного засобу;  
(c) введення у вказану Т-клітину рідкорозщеплювальної ендонуклеази, здатної вибірково інактивувати шляхом розщеплення ДНК, переважно з дволанцюговим розривом відповідно: вказаний ген, що кодує мішень вказаного імуносупресорного засобу, і щонайменше один ген, що кодує компонент Т-клітинного рецептора (TCR);  
(d) експансію вказаних клітин, необов'язково в присутності вказаного імуносупресорного засобу.

У більш переважному варіанті вказаний спосіб включає:

(а) забезпечення Т-клітин переважно з клітинної культури або зі зразка крові;  
(b) вибір гена в вказаній Т-клітині, яка експресує мішень імуносупресорного засобу;  
(c) трансформацію вказаної Т-клітини нуклеїновою кислотою, що кодує рідкорозщеплювальну ендонуклеазу, здатну вибірково інактивувати ДНК шляхом розщеплення, переважно за допомогою дволанцюгового розриву, відповідно: вказаний ген, що кодує мішень вказаного імуносупресорного засобу, і щонайменше один ген, що кодує компонент Т-клітинного рецептора (TCR);

- (d) експресію вказаної рідкорозщеплювальної ендонуклеази у вказаних Т-клітинах;  
 (е) сортування трансформованих Т-клітин, що не експресують TCR на своїй клітинній поверхні;  
 (f) експансію вказаних клітин необов'язково в присутності вказаного імуносупресорного засобу.

У конкретному варіанті здійснення вказана рідкорозщеплювальна ендонуклеаза специфічно спрямована на один ген, вибраний із групи, яка складається з CD52, GR, TCR-альфа і TCR-бета. В іншому варіанті здійснення спосіб генетичної модифікації залежить від експресії в клітинах, пропонується для конструювання, двох рідкорозщеплювальних ендонуклеаз так, що вказана кожна з двох рідкорозщеплювальних ендонуклеаз специфічно і відповідним чином каталізує розщеплення в кожній з пар генів, вибраних із групи, яка складається з CD52 і GR, CD52 і TCR-альфа, CDR52 і TCR-бета, GR і TCR-альфа, GR і TCR-бета, TCR-альфа і TCR-бета, тим самим, ініціюючи вказані гени-мішені. В іншому варіанті здійснення більше двох рідкорозщеплювальних ендонуклеаз може експресуватися в клітинах, пропонується для конструювання, для спрямованої дії і/або інактивації більше двох генів.

В іншому варіанті здійснення вказаний ген зі стадії (b), специфічний для імуносупресорного лікування, являє собою CD52, і імуносупресорне лікування стадії (d) або (е) включає гуманізоване антитіло, спрямоване на антиген CD52.

В іншому варіанті здійснення вказаний ген зі стадії (b), специфічний для імуносупресорного лікування, являє собою глюкокортикоїдний рецептор (GR), і імуносупресорне лікування стадії (d) або (е) включає кортикостероїд, такий як дексаметазон.

В іншому варіанті здійснення вказаний ген-мішень зі стадії (b), специфічний для імуносупресорного лікування, являє собою член сімейства генів FKBP або його варіант, і імуносупресорне лікування на стадії (d) або (е) включає FK506, також відомий як такролімус або фуджиміцин. В іншому варіанті здійснення вказаний член сімейства генів FKBP являє собою FKBP12 або його варіант.

В іншому варіанті здійснення вказаний ген зі стадії (b), специфічний для імуносупресорного лікування, являє собою член сімейства генів циклофіліну або його варіант, і імуносупресорне лікування стадії (d) або (е) включає циклоспорин.

В іншому варіанті здійснення вказана рідкорозщеплювальна ендонуклеаза може являти собою мегануклеазу, нуклеазу з цинковим пальцем або TALE-нуклеазу. У переважному варіанті здійснення вказана рідкорозщеплювальна ендонуклеаза являє собою TALE-нуклеазу. Під TALE-нуклеазою мається на увазі гібридний білок, що складається з ДНК-зв'язувального домену, який походить від ефектора, подібного до активатора транскрипції (TALE), і одного каталітичного домену нуклеази, що розщеплює послідовність нуклеїнової кислоти-мішені. (Boch, Scholze et al. 2009; Moscou and Bogdanove 2009) (Deng, Yan et al. 2012; Mak, Bradley et al. 2012) (Christian, Cermak et al. 2010; Cermak, Doyle et al. 2011; Geissler, Scholze et al. 2011; Huang, Xiao et al. 2011; Li, Huang et al. 2011; Mahfouz, Li et al. 2011; Miller, Tan et al. 2011; Morbitzer, Romer et al. 2011; Mussolino, Morbitzer et al. 2011; Sander, Cade et al. 2011; Tesson, Usal et al. 2011; Weber, Gruetzner et al. 2011; Zhang, Cong et al. 2011; Li, Piatek et al. 2012; Mahfouz, Li et al. 2012). У даному винаході розроблені нові TALE-нуклеази для точно спрямованої дії на відповідні гени для стратегій адаптивної імунотерапії.

Переважні TALE-нуклеази відповідно до винаходу являють собою ендонуклеази, що розпізнають і розщеплюють послідовність-мішень, вибрану з групи, яка складається з:

- SEQ ID NO:1-6 (GR),
- SEQ ID NO:37, 57-60 (TCR-альфа),
- SEQ ID NO:38 або 39 (TCR-бета) і
- SEQ ID NO:40, 61-65 (CD52).

Вказані TALE-нуклеази переважно включають поліпептидну послідовність, вибрану з SEQ ID NO:7-SEQ ID NO:18 і SEQ ID NO:41-SEQ ID NO:48, для розщеплення відповідних послідовностей-мішеней SEQ ID NO:1-6 і SEQ ID NO:37-40.

В іншому варіанті здійснення додатковий каталітичний домен може бути додатково введений у клітину з вказаною рідкорозщеплювальною ендонуклеазою для збільшення мутагенезу з метою підвищення їхньої здатності інактивувати гени-мішені. Зокрема, вказаний додатковий каталітичний домен являє собою фермент, що діє на кінець ДНК. Необмежувальні приклади ферментів, що діють на кінець ДНК, включають 5'-3'-екзонуклеази, 3'-5'-екзонуклеази, 5'-3'-лужні екзонуклеази, 5'-флеп-ендонуклеази, гелікази, фосфатазу, гідролази і незалежні від матриці ДНК-полімерази. Необмежувальні приклади такого каталітичного домену включають домен білка або каталітично активне похідне домену білка, вибрані з групи, яка складається з hExo1 (EXO1\_HUMAN), Exo1 (EXO1\_YEAST) дріжджів, Exo1 E. coli, TREX2 людини, TREX1 миші,

TREX1 людини, TREX1 великої рогатої худоби, TREX1 щура, TdT (кінцевої дезоксирибонуклеотидилтрансферази), ДНК2 людини, ДНК2 дріжджів (DNA2\_YEAST). У переважному варіанті здійснення вказаний додатковий каталітичний домен має активність 3'-5'-екзонуклеази й у більш переважному варіанті вказаний додатковий каталітичний домен являє собою TREX, більш переважно каталітичний домен TREX2 (WO2012/058458). В іншому переважному варіанті здійснення вказаний каталітичний домен кодується одноланцюговим поліпептидом TREX. Вказаний додатковий каталітичний домен може бути з'єднаний з гібридним білком-нуклеазою або з химерним білком за винаходом необов'язково за допомогою пептидного лінкера.

Ендонуклеазні розриви, як відомо, підвищують швидкість гомологічної рекомбінації. Таким чином, в іншому варіанті здійснення стадія способу генетичної модифікації додатково включає стадію введення в клітини екзогенної нуклеїнової кислоти, що включає щонайменше послідовність, гомологічну частині послідовності нуклеїнової кислоти-мішені, так що гомологічна рекомбінація виникає між послідовністю нуклеїнової кислоти-мішені й екзогенною нуклеїновою кислотою. У конкретних варіантах здійснення вказана екзогенна нуклеїнова кислота включає першу і другу частини, які гомологічні областям 5'- і 3'-послідовності нуклеїнової кислоти-мішені, відповідно. Вказана екзогенна нуклеїнова кислота в цих варіантах здійснення також включає третю частину, розташовану між першою і другою частинами, що включає не гомологічну 5'- і 3'- областям послідовність нуклеїнової кислоти-мішені. Після розщеплення послідовності нуклеїнової кислоти-мішені подія гомологічної рекомбінації стимулюється між послідовністю нуклеїнової кислоти-мішені й екзогенною нуклеїновою кислотою. Переважно використовувати гомологічні послідовності, які становлять щонайменше 50 п.о., переважно більше 100 п.о. і більш переважно більше 200 п.о. вказаної матриці донора. Таким чином, екзогенна нуклеїнова кислота переважно становить від 200 п.о. до 6000 п.о., більш переважно від 1000 п.о. до 2000 п.о. Дійсно, близькоспоріднені гомології нуклеїнових кислот знаходяться в областях, що прилягають до сайту розриву попереду і позаду, і послідовність нуклеїнової кислоти, що підлягає введенню, повинна розташовуватися між двома плечима.

Зокрема, вказана екзогенна нуклеїнова кислота послідовно включає першу область гомології з послідовностями, розташованими вище від вказаного розщеплення, послідовність для інактивації одного гена-мішені, вибраного з групи, яка складається з CD52, GR, TCR-альфа і TCR-бета, і другу область гомології з послідовностями, розташованими нижче від розщеплення. Вказана стадія введення полінуклеотиду може здійснюватися одночасно, до або після введення або експресії вказаної рідкорозщеплювальної ендонуклеази. Залежно від локалізації послідовності нуклеїнової кислоти-мішені, у якій здійснюється подія розщеплення, така екзогенна нуклеїнова кислота може бути використана для нокауту гена, наприклад, коли екзогенна нуклеїнова кислота локалізована в межах відкритої рамки зчитування вказаного гена, або для введення нових послідовностей або генів, що представляють інтерес. Вставки послідовностей за допомогою такої екзогенної нуклеїнової кислоти можуть бути використані для модифікації існуючого гена-мішені шляхом корекції або заміни вказаного гена (як необмежувальний приклад, шляхом обміну алелями) або для позитивної або негативної регуляції експресії гена-мішені (як необмежувальний приклад, шляхом обміну промоторами), для корекції або заміни вказаного гена-мішені. У переважному варіанті здійснення інактивація генів із групи, яка складається з CD52, GR, TCR-альфа і TCR-бета, може бути виконана в точній геномній локалізації, що є мішенню специфічної TALE-нуклеази, де вказана специфічна TALE-нуклеаза каталізує розщеплення, і де вказана екзогенна нуклеїнова кислота, що послідовно включає щонайменше область гомології і послідовність для інактивації одного гена-мішені, вибраного з групи, яка складається з CD52, GR, TCR-альфа і TCR-бета, інтегрована шляхом гомологічної рекомбінації. В іншому варіанті здійснення кілька генів можуть бути послідовно або одночасно інактивовані за допомогою декількох TALE-нуклеаз, відповідно, і специфічного спрямованої дії на один визначений ген і декілька специфічних полінуклеотидів для специфічної інактивації гена.

За допомогою стадії додаткової геномної модифікації може бути запланована також інактивація іншого гена, вибраного з групи, яка складається з CD52, GR, TCR-альфа і TCR-бета. Як вказано вище, вказана стадія додаткової геномної модифікації може являти собою стадію інактивації, що включає:

(а) введення у вказані клітини щонайменше однієї рідкорозщеплювальної ендонуклеази таким чином, що вказана рідкорозщеплювальна ендонуклеаза специфічно каталізує розщеплення однієї послідовності-мішені в геномі вказаної клітини;

(б) необов'язкове введення у вказані клітини екзогенної нуклеїнової кислоти, що послідовно включає першу область гомології з послідовностями вище вказаного сайту розщеплення,



послідовність, призначену для вставки в геном вказаної клітини, і другу область гомології з послідовностями нижче вказаного сайту розщеплення,

де вказана введена екзогенна нуклеїнова кислота інактивує ген і інтегрує щонайменше одну екзогенну полінуклеотидну послідовність, що кодує щонайменше один рекомбінантний білок, який представляє інтерес. В іншому варіанті здійснення вказана екзогенна полінуклеотидна послідовність інтегрується в ген, вибраний із групи, яка складається з CD52, GR, TCR-альфа і TCR-бета.

У конкретному варіанті здійснення вказаний спосіб конструювання клітини додатково включає стадію додаткової геномної модифікації. За допомогою стадії додаткової геномної модифікації може бути заплановане введення в клітини способом генної інженерії білка, що представляє інтерес. Вказаний білок, що представляє інтерес, може являти собою, як необмежувальні приклади, рТ-альфа або його функціональний варіант, химерний рецептор антигену (CAR), мультиланцюговий CAR, біспецифічне антитіло або рідкорозщеплювальну ендонуклеазу, спрямовану на PDCD1 або CTLA-4, як описано в даному винаході.

Винахід також стосується TALE-нуклеаз. У цілому, винахід стосується TALE-нуклеази, що включає:

(а) ДНК-зв'язувальний домен ефектора, подібного до активатора транскрипції (TALE), який сконструйований так, щоб зв'язувати послідовність-мішень у межах генів, вибраних із групи, яка складається з CD52, GR, TCR-альфа і TCR-бета;

(b) розщеплювальний домен або розщеплювальний напівдомен.

Переважає TALE-нуклеази відповідно до винаходу являють собою нуклеази, що розпізнають і розщеплюють послідовність-мішень, вибрану з групи, яка складається з:

SEQ ID NO:1-6 (GR),

SEQ ID NO:37, 57-60 (TCR-альфа),

SEQ ID NO:38 або 39 (TCR-бета) і

SEQ ID NO:40, 61-65 (CD52).

Вказані TALE-нуклеази, переважно, включають поліпептидну послідовність, вибрану з SEQ ID NO:7-SEQ ID NO:18 і SEQ ID NO:41-SEQ ID NO:48, для розщеплення відповідних послідовностей-мішеней SEQ ID NO:1-6 і SEQ ID NO:37-40.

Оскільки деяка варіабельність може виникати через геномні дані, похідними яких є ці поліпептиди, а також беручи до уваги можливість заміни деяких амінокислот, які присутні у цих поліпептидах, без істотної втрати активності (функціональні варіанти), винахід охоплює поліпептидні варіанти вказаних вище поліпептидів, що мають щонайменше 70%, переважно щонайменше 80%, більш переважно щонайменше 90% і навіть більш переважно щонайменше 95% ідентичності послідовностям, приведеним у даному описі.

Даний винахід, таким чином, стосується поліпептидів, що включають послідовність поліпептиду, що щонайменше на 70%, переважно щонайменше на 80%, більш переважно щонайменше на 90%, 95% 97% або 99% ідентична амінокислотній послідовності, вибраний з групи, яка складається з SEQ ID NO:7-SEQ ID NO:18 і SEQ ID NO:41-SEQ ID NO:48.

Також в обсяг даного винаходу включені полінуклеотиди, вектори, що кодують описані вище рідкорозщеплювальні ендонуклеази відповідно до винаходу.

В обсяг даного винаходу також входять виділені клітини або клітинні лінії, що підходять для одержання вказаним способом, для конструювання клітин, зокрема Т-клітин, у яких щонайменше один ген, вибраний із групи, яка складається з CD52, GR, TCR-альфа і TCR-бета, інактивованій. Переважно інактивуються два гени, вибрані з групи, яка складається з CD52 і GR, CD52 і TCR-альфа, CDR52 і TCR-бета, GR і TCR-альфа, GR і TCR-бета, TCR-альфа і TCR-бета.

Відповідно до винаходу, ці гени переважно інактивуються за допомогою щонайменше однієї рідкорозщеплювальної ендонуклеази. Авторами показано, що використання TALE-нуклеаз особливо вигідно для досягнення подвійної інактивації в Т-клітинах. Винахід охоплює виділену Т-клітину, що включає щонайменше два полінуклеотиди, причому вказані полінуклеотиди кодують щонайменше першу і другу TALE-нуклеази, переважно першу TALE-нуклеазу, спрямовану проти гена, що кодує TCR, і другу, спрямовану проти гена, що кодує рецептор імуносупресорного засобу, такий як CD52 або GR.

В іншому варіанті здійснення вказана виділена клітина додатково включає одну додаткову геномну модифікацію. В іншому варіанті здійснення вказана додаткова геномна модифікація являє собою інтеграцію щонайменше однієї екзогенної полінуклеотидної послідовності. В іншому варіанті здійснення вказана екзогенна послідовність інтегрована в один ген, вибраний із групи, яка складається з CD52, GR, TCR-альфа і TCR-бета.

Пре-Т-альфа

В іншому аспекті даний винахід стосується способу експансії Т-клітини з дефіцитом TCR-альфа, що включає введення у вказану Т-клітину рТ-альфа (що також називається пре-TCR-альфа) або його функціонального варіанта, і експансію вказаних клітин необов'язково шляхом стимуляції комплексу CD3. У переважному варіанті здійснення спосіб включає:

- а) трансформацію вказаних клітин нуклеїнової кислотою, що кодує щонайменше фрагмент рТ-альфа для підтримки експресії CD3 на поверхні,
- б) експресію вказаного рТ-альфа в вказаних клітинах,
- с) експансію вказаних клітин необов'язково за допомогою стимуляції комплексу CD3.

Винахід також стосується способу одержання Т-клітин для імунотерапії, що включає стадії способу експансії Т-клітин.

У конкретному варіанті здійснення полінуклеотидна послідовність рТ-альфа може бути уведена випадковим чином або також за допомогою гомологічної рекомбінації, зокрема, введення може бути пов'язане з інактивацією гена TCR-альфа.

Відповідно до винаходу, використовуються різні функціональні варіанти рТ-альфа. «Функціональний варіант» пептиду стосується молекули, по суті подібної або до повного пептиду, або до його фрагменту. «Фрагмент» рТ-альфа або його функціональний варіант за даним винаходом стосується будь-якої підгрупи молекул, що включає більш короткий пептид. Переважний рТ-альфа або його функціональні варіанти можуть являти собою повнорозмірний рТ-альфа або С-кінцевий укорочений варіант рТ-альфа. У С-кінцевого укороченого рТ-альфа на С-кінці не вистачає одного або більше залишків. Як необмежувальні приклади, С-кінцевий укорочений варіант рТ-альфа не має 18, 48, 62, 78, 92, 110 або 114 залишків з С-кінця білка (SEQ ID NO:107-SEQ ID NO:114). Крім того, варіанти амінокислотної послідовності пептиду можуть бути отримані шляхом мутацій ДНК, що кодує пептид. Такі функціональні варіанти включають, наприклад, делеції, або вставки, або заміни залишків в амінокислотній послідовності. Будь-яка комбінація делеції, вставки і заміни також може бути здійснена для досягнення кінцевого конструкта, за умови, що кінцевий конструкт має бажану активність, зокрема, відновленням функціонального комплексу CD3. У переважному варіанті здійснення вводять щонайменше одну мутацію в різні варіанти рТ-альфа, як описано вище, щоб вплинути на димеризацію. Як необмежувальний приклад, мутантний залишок може являти собою щонайменше W46R, D22A, K24A, R102A або R117A білка рТ-альфа людини або вирівняних положень при використанні методу CLUSTALW для сімейства або гомологічного члена рТ-альфа. Переважно рТ-альфа або його варіант, як описано вище, включає мутантний залишок W46R (SEQ ID NO:123) або мутантні залишки D22A, K24A, R102A і R117A (SEQ ID NO:124). У конкретному варіанті здійснення вказаний рТ-альфа або його варіанти з'єднують також з доменом трансдукції сигналу, таким як, як необмежувальні приклади, CD28, OX40, ICOS, CD27, CD137 (4-1BB) і CD8 (SEQ ID NO:115-SEQ ID NO:120). Позаклітинний домен рТ-альфа або його варіантів, як описано вище, може бути з'єднаний із фрагментом білка TCR-альфа, зокрема з трансмембранним і внутрішньоклітинним доменом TCR-альфа (SEQ ID NO:122). Варіанти рТ-альфа також можуть бути з'єднані з внутрішньоклітинним доменом TCR-альфа (SEQ ID NO:121).

В іншому варіанті здійснення вказані варіанти рТ-альфа з'єднують з позаклітинним лігандзв'язувальним доменом, і більш переважно, рТ-альфа або його функціональний варіант з'єднують з однокланцевим фрагментом антитіла (scFv), що містить варіабельний фрагмент легкого ( $V_L$ ) і важкого ( $V_H$ ) ланцюгів моноклонального антитіла, специфічного для антигену-мішені, з'єднаних гнучким лінкером. Як необмежувальний приклад, амінокислотну послідовність рТ-альфа або його функціонального варіанта вибирають із групи, яка складається з SEQ ID NO:107-SEQ ID NO:124.

Оскільки деяка варіабельність може виникати через геномні дані, похідними яких є ці поліпептиди, а також беручи до уваги можливість заміни деяких амінокислот, які присутні у цих поліпептидах, без істотної втрати активності (функціональні варіанти), винахід охоплює поліпептидні варіанти вказаних вище поліпептидів, що мають щонайменше 70%, переважно щонайменше 80%, більш переважно щонайменше 90% і навіть більш переважно щонайменше 95% ідентичність послідовностям, приведеним у даному описі.

Даний винахід, таким чином, стосується поліпептидів, що включають послідовність поліпептиду, що щонайменше на 70%, переважно щонайменше на 80%, більш переважно щонайменше на 90%, 95% 97% або 99% ідентична амінокислотній послідовності, вибраній з групи, яка складається з SEQ ID NO:107-SEQ ID NO:124.

Під Т-клітиною, дефіцитною по TCR-альфа, мається на увазі виділена Т-клітина, у якій відсутня експресія функціонуючого ланцюга TCR-альфа. Це може бути досягнуто за допомогою різних способів, як необмежувальні приклади, шляхом конструювання Т-клітини так, що вона не

експресує який-небудь функціонуючий TCR-альфа на своїй клітинній поверхні, або шляхом конструювання Т-клітини так, що вона продукує дуже мало функціонуючого ланцюга TCR-альфа на своїй поверхні, або шляхом конструювання Т-клітини для експресії мутантної або укороченої форми ланцюга TCR-альфа.

- 5 Клітини, дефіцитні по TCR-альфа, не можуть більше здійснювати експансію за рахунок комплексу CD3. Таким чином, щоб вирішити цю проблему і дати можливість проліферувати клітинам, дефіцитним по TCR-альфа, у вказані клітини вводять рТ-альфа або його функціональний варіант, у результаті цього відновлюючи функціонуючий комплекс CD3. У переважному варіанті здійснення спосіб додатково включає введення у вказані Т-клітини рідкорозщеплювальних ендонуклеаз, здатних селективно інактивувати шляхом розщеплення ДНК один ген, що кодує один компонент Т-клітинного рецептора (TCR). У конкретному варіанті здійснення вказана рідкорозщеплювальна ендонуклеаза являє собою TALE-нуклеазу. Як
- 10 необхідні приклади, TALE-нуклеаза спрямована проти однієї з послідовностей-мішеней гена TCR-альфа, вибраних із групи, яка складається з SEQ ID NO:37 і SEQ ID NO:57-60. Переважно, TALE-нуклеази вибрані з групи, яка складається з SEQ ID NO:41 і SEQ ID NO:42.

- У конкретному варіанті здійснення вказаний спосіб експансії Т-клітин, дефіцитних по TCR-альфа, включає стадію додаткової геномної модифікації. Під стадією додаткової геномної модифікації може матися на увазі введення в клітини для конструювання одного білка, що представляє інтерес. Вказаний білок, що представляє інтерес, може являти собою химерний
- 20 рецептор антигену (CAR), зокрема, CAR, що включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO:73, мультиланцюговий CAR, особливо мультиланцюговий CAR, що включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO:125, біспецифічне антитіло, мішені рідкорозщеплювальних ендонуклеаз PDCD1 або CTLA-4, особливо послідовність нуклеїнової кислоти-мішені SEQ ID NO:74-SEQ ID NO:78, або мішені рідкорозщеплювальних ендонуклеаз, спрямованих на імуносупресорний засіб, як описано в даному винаході.

- Даний винахід охоплює також поліпептиди, що кодують рТ-альфа, зокрема функціональні варіанти, описані вище. У переважному варіанті здійснення винахід стосується рТ-альфа або його функціонального варіанту, з'єданого з доменом трансдукції сигналу, таким як CD28, OX40, ICOS, CD137 і CD8. Більш конкретно, даний винахід стосується функціонального варіанта рТ-альфа, що включає амінокислотну послідовність, вибрану з групи, яка складається з SEQ ID NO:107-SEQ ID NO:124. Даний винахід охоплює також поліпептиди, вектори, що кодують рТ-альфа або його функціональні варіанти, описані вище.

- В обсяг даного винаходу також входять виділені клітини або клітинні лінії, які можуть бути отримані вказаним способом. Зокрема, вказані виділені клітини або клітинні лінії одержують шляхом введення у вказані клітини рТ-альфа або його функціонального варіанта, щоб підтримувати експресію CD3 на поверхні. У переважному варіанті здійснення вказані виділені клітини або клітинні лінії додатково генетично модифікуються шляхом інактивації гена TCR-альфа. Цей ген переважно інактивується щонайменше однією рідкорозщеплювальною ендонуклеазою. У переважному варіанті здійснення вказана рідкорозщеплювальна
- 40 ендонуклеаза являє собою TALE-нуклеазу.

Мультиланцюговий химерний рецептор антигену (CAR)

В іншому варіанті здійснення винахід стосується мультиланцюгового химерного рецептора антигену (CAR), що особливо підходить для одержання й експансії конструктів Т-клітин за даним винаходом. Мультиланцюговий CAR включає щонайменше два наступні компоненти:

- 45 а) один поліпептид, що включає трансмембранний домен альфа-ланцюга FcεRI і позаклітинний лігандзв'язувальний домен,
- б) один поліпептид, що включає частину N- і C-кінцевого цитоплазматичного хвоста і трансмембранний домен бета-ланцюга FcεRI, і/або
- с) два поліпептиди, що включають кожен частину внутрішньоцитоплазматичного хвоста і трансмембранний домен гамма-ланцюга FcεRI, у результаті чого різні поліпептиди мимовільно мультимеризуються один з одним з утворенням димерного, тримерного або тетрамерного CAR.

- Один із прикладів тетрамерного CAR показаний на фіг. 3. Різні варіанти мультиланцюгового CAR представлені на фіг. 4. Один із прикладів мультиланцюгового CAR включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO:125. Термін «частина», використовуваний у даному описі, стосується
- 55 будь-якого підкласу молекул, що представляє собою більш короткий пептид. Альтернативно, амінокислотна послідовність функціональних варіантів поліпептиду може бути отримана шляхом мутацій ДНК, що кодує поліпептид. Такі функціональні варіанти включають, наприклад, делеції або вставки, або заміни залишків в амінокислотній послідовності. Будь-яка комбінація делеції, вставки і заміни може бути виконана для досягнення кінцевого конструкта, за умови, що

кінцевий конструктор має бажану активність, зокрема виявляє специфічну клітинну імунну активність проти мішені.

У переважному варіанті здійснення вказаний позаклітинний лігандзв'язувальний домен являє собою scFv. Для попередньо визначеної мішені лімфоцитів також може бути використаний зв'язувальний домен, відмінний від scFv, такий як фрагменти однодоменного антитіла верблюда або ліганди рецептора, такі як поліпептидний фактор росту судинного ендотелію, пептид, що зв'язує інтегрин, херегулін або мутеїн IL-13, зв'язувальні домени антитіл, гіперваріабельні петлі антитіл або CDR, як необмежувальні приклади.

У переважному варіанті здійснення вказаний поліпептид а) додатково включає область стебла між вказаним позаклітинним лігандзв'язувальним доменом і вказаним трансмембранним доменом. Термін «область стебла» використовується в даному описі в цілому для позначення будь-якого оліго- або поліпептиду, що функціонує як сполучна ланка між трансмембранним доменом і позаклітинним лігандзв'язувальним доменом. Зокрема, область стебла використовується для забезпечення більшої гнучкості і приступності позаклітинного лігандзв'язувального домену. Область стебла може включати до 300 амінокислот, переважно 10-100 амінокислот і найбільш переважно 25-50 амінокислот. Область стебла може походити від усієї природної молекули або її частини, наприклад, від усієї частини або позаклітинної області CD8, CD4 або CD28, або від усієї частини або константної області антитіла. Альтернативно, область стебла може являти собою синтетичну послідовність, що відповідає природній послідовності стебла, або може являти собою повністю синтетичну послідовність стебла.

У переважному варіанті здійснення вказаний поліпептид а), b) і/або c) додатково містить щонайменше один домен трансдукції сигналу. У найбільш переважному варіанті здійснення вказаний домен трансдукції сигналу вибраний із групи, яка складається з CD28, OX40, ICOS, CD137 і CD8.

У переважному варіанті здійснення вказаний C-кінцевий цитоплазматичний хвіст фрагмента альфа-, бета- і/або гамма-ланцюга FcεRI додатково містить зв'язувальні мотиви TNFR-асоційованого фактора 2 (TRAF2). У найбільш переважному варіанті здійснення вказаний C-кінцевий цитоплазматичний хвіст альфа-, бета- і/або гамма-ланцюга FcεRI замінений на внутрішньоцитоплазматичний хвіст члена сімейства костимулюючих TNFR. Цитоплазматичний хвіст члена сімейства костимуляторних TNFR містить зв'язувальні мотиви TRAF2, що складаються з головного консервативного мотиву (P/S/A)X(Q/E)E або міnorного мотиву (PXQXXD), де X позначає будь-яку амінокислоту. Білки TRAF рекрутуються до внутрішньоклітинних хвостів багатьох TNFR у відповідь на тримеризацію рецептора.

В іншому переважному варіанті здійснення вказаний внутрішньоцитоплазматичний домен альфа-, бета- і/або гамма-ланцюга FcεRI замінений внутрішньоцитоплазматичною областю дзета-ланцюга TCR (що також називається CD3-дзета). В іншому переважному варіанті здійснення вказаний внутрішньоцитоплазматичний домен альфа-, бета- і/або гамма-ланцюга FcεRI включає щонайменше один додатковий мотив активації імунорецептора на основі тирозину (ITAM). ITAM являють собою добре визначувані сигнальні мотиви, знайдені у внутрішньоцитоплазматичному хвості різноманітних рецепторів, які служать як сайти зв'язування для класу тирозинкіназ syk/zap70. Приклади ITAM, використовуваних у винаході, включають отримані з TCR-дзета, FCR-гама, FCR-бета, CD3-гама, CD3-дельта, CD3-епсилон, CD5, CD22, CD79a, CD79b і CD66d.

Як необмежувальний приклад, різні варіанти мультиланцюгового CAR показані на фіг. 4.

У переважному варіанті здійснення мультиланцюговий CAR включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO:125. Даний винахід стосується поліпептидів, що включають поліпептидну послідовність, яка щонайменше на 70%, переважно щонайменше на 80%, більш переважно щонайменше на 90%, 95%, 97% або 99% ідентична амінокислотній послідовності, вибраний з групи, яка складається з SEQ ID NO:125.

В обсяг даного винаходу включені також полінуклеотиди, вектори, що кодують описаний вище мультиланцюговий CAR відповідно до винаходу.

У конкретному охоплюваному варіанті здійснення даний винахід стосується способу одержання Т-клітин для імунотерапії, що включає введення у вказані Т-клітини різних поліпептидів, що включають вказаний мультиланцюговий CAR, і експансію вказаних клітин.

В іншому варіанті здійснення вказаний спосіб додатково включає стадію генетичної модифікації вказаних клітин шляхом інактивації щонайменше одного гена, який експресує один компонент TCR, і/або мішені для імуносупресорного засобу. У переважному варіанті здійснення вказаний ген вибраний із групи, яка складається з TCR-альфа, TCR-бета, CD52 і GR. У переважному варіанті здійснення вказаний спосіб додатково включає введення у вказані Т-

клітини рідкорозщеплювальної ендонуклеази, здатної селективно інактивувати вказані гени шляхом розщеплення ДНК. У більш переважному варіанті здійснення вказана рідкорозщеплювальна ендонуклеаза являє собою TALE-нуклеазу. Переважні TALE-нуклеази відповідно до винаходу являють собою нуклеази, що розпізнають і розщеплюють послідовність-мішень, вибрану з групи, яка складається з: SEQ ID NO:1-6 (GR), SEQ ID NO:37, 57-60 (TCR-альфа), SEQ ID NO:38 або 39 (TCR-бета) і SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:61-SEQ ID NO:65 (CD52).

У конкретному варіанті здійснення вказаний спосіб додатково включає стадію додаткової геномної модифікації. Під стадією додаткової геномної модифікації може матися на увазі введення в клітини, що підлягають конструюванню, одного білка, що представляє інтерес. Вказаний білок, що представляє інтерес, може являти собою, як необмежувальні приклади, біспецифічне антитіло, мішень рідкорозщеплювальної ендонуклеази PDCD1 або CTLA-4, рТ-альфа або його функціональний варіант, як описано в даному описі.

Даний винахід також стосується виділених клітин або клітинних ліній, що підходять для одержання вказаним способом конструктів клітин. Зокрема вказана виділена клітина включає екзогенні поліпептидні послідовності, що кодують поліпептиди, які включають вказаний мультиланцюговий CAR.

Т-клітини з інактивованим PDCD1 або CTLA4

Одним іншим з підходів до активації терапевтичного протипухлинного імунітету є блокада ключових точок регуляції імунної системи. Імунна відповідь регулюється в результаті урівноважування стимулюючого і інгібуючого сигналів. Експресія білків ключових точок регуляції імунної системи може бути порушена під дією пухлин і може являти собою важливий механізм імунорезистентності. Негативні регулятори функцій Т-клітин включають такі молекули, як CTLA-4, ключову молекулу негативної регуляції, що негативно регулює шляхи активації Т-клітин, і білок-1 програмованої смерті (PD1), також відомий як PDCD1, трансмембранний рецептор, позитивно регульований на активованих Т-клітинах, що при зв'язуванні з його лігандом (лігандом-1 програмованої смерті, PD-L1) приводить до зниження продукції цитокінів і проліферації Т-клітин (Pardoll 2012). Таким чином, антагоністи інгібаторного сигналу приводять до ампліфікації специфічної для антигену Т-клітинної відповіді.

Таким чином, даний винахід стосується способу конструювання Т-клітин, особливо для імунотерапії, що включає генетично модифіковані Т-клітини в результаті інактивації щонайменше одного білка, залученого до ключових точок регуляції імунної системи, зокрема PDCD1 і/або CTLA-4.

У конкретному варіанті здійснення спосіб включає одну з наступних стадій:

(а) забезпечення Т-клітини,

(б) введення в вказану Т-клітину рідкорозщеплювальної ендонуклеази, здатної вибірково інактивувати за допомогою розщеплення ДНК ген PDCD1 або ген CTLA-4; і

(с) експансія вказаних клітин.

У переважному варіанті здійснення вказана рідкорозщеплювальна ендонуклеаза являє собою TALE-нуклеазу. У даному винаході розроблені нові TALE-нуклеази для точної спрямованості на відповідні гени для стратегій адаптивної імунотерапії. Переважні TALE-нуклеази відповідно до винаходу являють собою нуклеази, що розпізнають і розщеплюють послідовність-мішень, вибрану з групи, яка складається з SEQ ID NO:77 і SEQ ID NO:78 (PDCD-1), SEQ ID NO:74-SEQ ID NO:76 (CTLA-4). Даний винахід також стосується поліпептидних TALE-нуклеаз, що включають амінокислотну послідовність, вибрану з групи, яка складається з SEQ ID NO:79-SEQ ID NO:88.

Даний винахід також стосується поліпептидів, що включають амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 70%, переважно щонайменше на 80%, більш переважно щонайменше на 90%, 95% 97% або 99% ідентична амінокислотній послідовності, вибраній з групи, яка складається з SEQ ID NO:79-SEQ ID NO:88. В обсяг даного винаходу також включені поліпептиди, вектори, що кодують описані вище рідкорозщеплювальні ендонуклеази відповідно до винаходу. Цей метод може поєднуватися з яким-небудь з різних методів, описаних у даному описі.

Біспецифічні антитіла

Відповідно до ще одного варіанта здійснення сконструйовані Т-клітини, отримані різними способами, як описано вище, можуть додатково експонуватися з біспецифічними антитілами. Вказані Т-клітини можуть експонуватися з біспецифічними антитілами ex vivo перед введенням пацієнту або in vivo після введення пацієнту. Вказані біспецифічні антитіла включають дві варіабельні області з різними антигенними властивостями, що дозволяє доставити конструкти клітин у безпосередню близькість до антигена-мішені. Як необмежувальний приклад, вказане біспецифічне антитіло спрямоване проти пухлинного маркера й антигена лімфоцитів, такого як

CD3, і має потенціал для переспрямування й активації будь-яких циркулюючих Т-клітин проти пухлин.

#### Способи доставки

Різні способи, описані вище, включають введення в клітину рТ-альфа або його функціональних варіантів, рідкорозщеплювальних ендонуклеаз, TALE-нуклеази, CAR або мультиланцюгового CAR необов'язково з ферментом процесингу кінця ДНК або екзогенною нуклеїновою кислотою.

Як необмежувальний приклад, вказаний рТ-альфа або його функціональний варіант, рідкорозщеплювальні ендонуклеази, TALE-нуклеази, CAR або мультиланцюговий CAR необов'язково з ферментом процесингу кінця ДНК або екзогенною нуклеїновою кислотою можуть бути введені як трансгени, які кодуються одним або різними плазмідними векторами. Різні трансгени можуть бути включені в один вектор, що включає послідовність нуклеїнової кислоти, яка кодує послідовність рибосомного стрибка, таку як послідовність, що кодує пептид 2A. Пептиди 2A, які ідентифіковані в підгрупі Aphthovirus пікорнавірусів, викликають рибосомний «стрибок» від одного кодона до наступного без утворення пептидного зв'язку між двома амінокислотами, кодованими кодонами (див. Donnelly et al., J. of General Virology 82: 1013-1025 (2001); Donnelly et al., J. of Gen. Virology 78: 13-21 (1997); Doronina et al., Mol. And. Cell. Biology 28(13): 4227-4239 (2008); Atkins et al., RNA 13: 803-810 (2007)). Під «кодоном» мають на увазі три нуклеотиди в мРНК (або в смислового ланцюгу молекули ДНК), що транскрибуються рибосомами в один амінокислотний залишок. Таким чином, два поліпептиди можуть синтезуватися з однієї прилягаючої відкритої рамки зчитування в межах мРНК, коли поліпептиди розділені олігопептидною послідовністю 2A, що існує в рамці. Такі механізми стрибків рибосом добре відомі в даній галузі техніки і, як відомо, використовуються в декількох векторах для експресії декількох білків, які кодуються однією інформаційною РНК. Як необмежувальний приклад, у даному винаході пептиди 2A використані для експресії в клітині рідкорозщеплювальної ендонуклеази і ферменту процесингу кінця ДНК або різних поліпептидів мультиланцюгового CAR.

Вказаний плазмідний вектор може містити маркер селекції, що забезпечує ідентифікацію і/або селекцію клітин, у які включений вказаний вектор.

Поліпептиди можуть бути синтезовані в клітині *in situ* шляхом введення в клітину полінуклеотидів, які кодують вказані поліпептиди. Альтернативно, вказані поліпептиди можуть бути отримані поза клітиною і потім введені в неї. Способи введення полінуклеотидного конструкта в клітини тварин відомі в даній галузі техніки і включають як необмежувальні приклади методи стійкої трансформації, коли полінуклеотидний конструкт інтегрують у геном клітини, методи часової трансформації, коли полінуклеотидний конструкт не інтегрують у геном клітини, і методи, опосередковані вірусами. Вказані полінуклеотиди можуть бути введені в клітину, наприклад, за допомогою рекомбінантних вірусних векторів (наприклад, ретровірусних, аденовірусних), ліпосом і подібного. Наприклад, методи часової трансформації включають, наприклад, мікроін'єкцію, електропорацію або бомбардування частинками. Вказані полінуклеотиди можуть бути включені у вектори, більш конкретно в плазмідні або вірусні вектори, з урахуванням того, що вони будуть експресуватися в клітинах.

#### Електропорація

У більш переважному варіанті здійснення винаходу полінуклеотиди, що кодують поліпептиди за даним винаходом, можуть являти собою мРНК, що вводять безпосередньо в клітини, наприклад, шляхом електропорації. Автори визначили оптимальні умови для електропорації мРНК у Т-клітину.

Автори використовували метод cytoPulse, який дозволяє шляхом використання імпульсних електричних полів тимчасово збільшити проникність живих клітин для доставки матеріалу в клітини. Метод, оснований на використанні електропорації PulseAgile (власність Cellectis) у формі коливальних імпульсів, характеризується точним контролем тривалості імпульсу, інтенсивності, а також інтервалу між імпульсами (патент США 6010613 і міжнародна заявка РСТ WO2004083379). Усі ці параметри можуть бути модифіковані, щоб досягти найкращих умов для високої ефективності трансфекції з мінімальною загибеллю. Звичайно перші високі імпульси електричного поля створюють можливість утворення пор, тоді як наступні більш низькі імпульси електричного поля дозволяють полінуклеотиду переміщуватися в клітину. В одному аспекті даного винаходу автори описують стадії, що привели до досягнення >95% ефективності трансфекції мРНК у Т-клітини, а також використання протоколу електропорації для тимчасової експресії різних типів білків у Т-клітинах. Зокрема, винахід стосується способу трансформації Т-клітин, що включає контакт вказаної Т-клітини з РНК і нанесення на Т-клітини швидкої послідовності імпульсів, що складається з:

(а) одного електричного імпульсу з діапазоном напруги від 2250 до 3000 вольтів на сантиметр, тривалістю імпульсу 0,1 мсек і інтервалом імпульсів від 0,2 до 10 мсек між електричними імпульсами стадії (а) і (b);

5 (b) одного електричного імпульсу з діапазоном напруги від 2250 до 3000 вольтів із шириною імпульсу 100 мсек і інтервалом імпульсів 100 мсек між електричним імпульсом на стадії (b) і першим електричним імпульсом на стадії (c); і

(c) 4 електричних імпульсів з напругою 325 вольтів із шириною імпульсу 0,2 мсек і інтервалом імпульсів 2 мсек між кожним з 4 електричних імпульсів.

10 У конкретному варіанті здійснення способу трансформації Т-клітини включає контакт вказаної Т-клітини з РНК і нанесення на Т-клітину швидкої послідовності імпульсів, що складається з:

(а) одного електричного імпульсу з напругою 2250, 2300, 2350, 2400, 2450, 2500, 2550, 2400, 2450, 2500, 2600, 2700, 2800, 2900 або 3000 вольт на сантиметр, шириною імпульсу 0,1 мсек і імпульсним інтервалом 0,2, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 або 10 мсек між електричними імпульсами стадії (а) і (b);

15 (b) одного електричного імпульсу з напругою в діапазоні від 2250, 2250, 2300, 2350, 2400, 2450, 2500, 2550, 2400, 2450, 2500, 2600, 2700, 2800, 2900 або 3000 вольт із тривалістю 100 мсек і інтервалом імпульсів 100 мсек між електричним імпульсом на стадії (b) і першим електричним імпульсом на стадії (c); і

20 (c) 4 електричних імпульсів з напругою 325 вольтів із шириною імпульсу 0,2 мсек і інтервалом імпульсів 2 мсек між кожним з 4 електричних імпульсів.

Усі величини, включені в діапазон величин, описаний вище, описані в даному описі. Середовище електропорації може являти собою будь-яке придатне середовище, відоме в даній галузі техніки. Переважно, середовище електропорації має провідність у діапазоні, що охоплює 0,01-1,0 міліСіменс.

25 У конкретних варіантах здійснення, як необмежувальні приклади, вказана РНК кодує рідкорозщеплювальну ендонуклеазу, один мономер рідкорозщеплювальної ендонуклеази, такий як напів-TALE-нуклеаза, химерний рецептор антигену, щонайменше один компонент мультиланцюгового химерного рецептора антигену, рТ-альфа або його функціональний варіант, екзогенну нуклеїнову кислоту, один додатковий каталітичний домен.

30 Активація й експансія Т-клітин

Чи узяті Т-клітини перед генетичною модифікацією або після неї, Т-клітини можуть бути активовані і їхня експансія стимульована звичайно за допомогою методів, описаних, наприклад, у патентах США 6352694; 6534055; 6905680; 6692964; 5858358; 6887466; 6905681; 7144575; 7067318; 7172869; 7232566; 7175843; 5883223; 6905874; 6797514; 6867041; і патентній заявці 35 США № 20060121005. Експансія Т-клітин може бути стимульована *in vitro* або *in vivo*.

Звичайно Т-клітини за винаходом здійснюють експансію за рахунок контакту з поверхнею, що має приєднаний до неї агент, який стимулює сигнал, асоційований з комплексом CD3-TCR, що стимулює коstimуючу молекулу на поверхні Т-клітин.

40 Зокрема, популяції Т-клітин можуть стимулюватися *in vitro*, наприклад, шляхом контакту з антитілом проти CD3 або його антигензв'язувальним фрагментом, або з антитілом проти CD2, іммобілізованим на поверхні, або шляхом контакту з активатором протеїнкінази С (наприклад, бріостатином) у сполученні з кальцієвим іонофором. Для коstimуляції допоміжної молекули на поверхні Т-клітин використовується ліганд, що зв'язується з допоміжною молекулою. Наприклад, популяція Т-клітин може бути введена в контакт з антитілом проти CD3 і антитілом 45 проти CD28 в умовах, що підходять для стимуляції проліферації Т-клітин, щоб стимулювати проліферацію або CD4<sup>+</sup> Т-клітин, або CD8<sup>+</sup> Т-клітин, антитілом проти CD3 і антитілом проти CD28. Наприклад, агенти, що забезпечують кожен сигнал, можуть знаходитися в розчині або бути зв'язаними з поверхнею. Як можуть легко зрозуміти фахівці в даній галузі техніки, відношення частинок до клітин може залежати від розміру частинок відносно клітини-мішені. В 50 інших варіантах здійснення даного винаходу клітини, такі як Т-клітини, об'єднують з кульками, покритими засобами, кульки і клітини потім розділяють, і потім клітини культивують. В альтернативному варіанті здійснення перед культивуванням кульки, покриті засобами, і клітини не розділяють, а культивують разом. Білки клітинної поверхні можуть бути ліговані в результаті можливості контакту парамагнітних кульок, до яких приєднані антитіла проти CD3 і проти CD28 55 (3×28 кульок), з Т-клітинами. В одному варіанті здійснення клітини (наприклад, 4-10 Т-клітин) і кульки (наприклад, парамагнітні кульки DYNABEADS® M-450 CD3/CD28-T у відношенні 1:1) змішують у буфері, переважно в PBS (без двовалентних катіонів, таких як, кальцій і магній). Фахівці в даній галузі техніки можуть легко оцінити, яка концентрація клітин може бути знову використана. Суміш можна культивувати протягом від декількох годин (приблизно 3 години) до 60 приблизно 14 днів або протягом будь-якого цілого значення годин між ними. В іншому варіанті

здійснення суміш можна культивувати протягом 21 дня. Умови, що підходять для Т-клітинної культури, включають придатні середовища (наприклад, мінімальні необхідні середовища або середовища RPMI 1640 або X-vivo 5 (Lonza)), що можуть містити фактори, необхідні для проліферації і життєздатності, включаючи сироватку (наприклад, фетальну сироватку телят або сироватку людини), інтерлейкін-2 (IL-2), інсулін, IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-7, GM-CSF, -10, -2, IL-15, TGF $\beta$  і TNF- або будь-які інші добавки для росту клітин, відомі фахівцю в даній галузі техніки. Інші добавки для росту клітин включають, але не обмежуються ними, поверхнево-активні речовини, плазманат і відновлювальні агенти, такі як N-ацетилцистеїн і 2-меркаптоетанол. Середовища можуть включати RPMI 1640, A1M-V, DMEM, MEM, A-MEM, F-12, X-Vivo 1 і X-Vivo 20, Optimizer, з додаванням амінокислот, пірувату натрію і вітамінів, або без сироватки або з додаванням відповідної кількості сироватки (або плазми) або певного набору гормонів і/або кількості цитокіну(ів), достатньої для росту й експансії Т-клітин. Антибіотики, наприклад, пеніцилін і стрептоміцин, включають тільки в експериментальні культури, але не в культури клітин, що призначені для інфузії індивідууму. Клітини-мішені підтримують в умовах, необхідних для підтримки росту, наприклад, при придатній температурі (наприклад, 37°C) і атмосфері (наприклад, повітря плюс 5% CO<sub>2</sub>). Т-клітини, що експонувалися при різному часі стимуляції, можуть мати різні характеристики.

В іншому конкретному варіанті здійснення вказані клітини можуть здійснювати експансію шляхом спільного культивування з тканиною або клітинами. Експансію вказаних клітин можна також здійснювати *in vivo*, наприклад, у крові індивідуумів після введення вказаної клітини індивідууму.

#### Модифіковані Т-клітини

В обсяг даного винаходу також входить виділена Т-клітина, отримана відповідно до будь-якого зі способів, описаних вище. Вказана Т-клітина згідно із даним винаходом може походити від стовбурової клітини. Стовбурові клітини можуть являти собою стовбурові клітини дорослих особин, ембріональні стовбурові клітини, більш конкретно, стовбурові клітини не від людини, стовбурові клітини пуповинної крові, прогеніторні клітини, стовбурові клітини кісткового мозку, індуковані плюрипотентні стовбурові клітини, тотипотентні стовбурові клітини або гемопоетичні стовбурові клітини. Прикладом клітин людини є клітини CD34+. Вказана виділена клітина також може являти собою дендритну клітину, НК-клітину, В-клітину або Т-клітину, вибрану з групи, яка складається з запальних Т-лімфоцитів, цитотоксичних Т-лімфоцитів, регуляторних Т-лімфоцитів або хелперних Т-лімфоцитів. В іншому варіанті здійснення вказана клітина може походити з групи, яка складається з CD4+ Т-лімфоцитів і CD8+ Т-лімфоцитів. Перед експансією і генетичною модифікацією клітин за даним винаходом, джерело клітин може бути отримане від індивідуума за допомогою різних необмежувальних методів. Т-клітини можуть бути отримані з ряду необмежувальних джерел, включаючи мононуклеарні клітини периферичної крові, кістковий мозок, тканину лімфатичних вузлів, пуповинну кров, тканину виличкової залози, тканину з ділянки інфекції, асцит, плевральний випіт, тканину селезінки, а також пухлини. У деяких варіантах здійснення даного винаходу може бути використана будь-яка кількість Т-клітинних ліній, доступних і відомих фахівцям у даній галузі техніки. В іншому варіанті здійснення вказана клітина може походити від здорового донора, від пацієнта з діагнозом раку або від пацієнта з діагнозом інфекції. В іншому варіанті здійснення вказана клітина є частиною змішаної популяції клітин, що має різні фенотипові характеристики. В обсяг даного винаходу також входить клітинна лінія, отримана від трансформованої Т-клітини відповідно до способу, описаному вище. Модифіковані клітини, стійкі до імуносупресорної терапії і придатні для одержання за допомогою представленого вище методу, входять в обсяг даного винаходу.

В іншому варіанті здійснення вказана виділена клітина згідно із даним винаходом включає один інактивованний ген, вибраний із групи, яка складається з CD52, GR, TCR-альфа і TCR-бета і/або експресує CAR, мультиланцюговий CAR і/або трансген рТ-альфа. В іншому варіанті здійснення вказана виділена клітина за даним винаходом включає два інактивовані гени, вибрані із групи, яка складається з CD52 і GR, CD52 і TCR-альфа, CDR52 і TCR-бета, GR і TCR-альфа, GR і TCR-бета, TCR-альфа і TCR-бета і/або експресує CAR, мультиланцюговий CAR і/або трансген рТ-альфа.

В іншому варіанті здійснення пропонується TCR, що не функціонує в клітинах відповідно до винаходу в результаті інактивації гена TCR-альфа і/або гена(ів) TCR-бета. Приведені вище стратегії використовуються більш конкретно для того, щоб уникнути GvHD. У конкретному аспекті даного винаходу пропонується спосіб одержання модифікованих клітин, які походять від індивідуума, де вказані клітини можуть проліферувати незалежно від сигнального шляху головного комплексу гістосумісності. Вказаний спосіб включає наступні стадії:

(а) забезпечення клітин від вказаного індивідуума;



(b) генетична модифікація вказаних клітин *ex vivo* шляхом інактивації генів TCR-альфа або TCR-бета;

(c) культивування генетично модифікованих Т-клітин *in vitro* у відповідних умовах для ампліфікації вказаних клітин.

5 Модифіковані клітини, що можуть проліферувати незалежно від сигнального шляху головного комплексу гістосумісності, що підходять для одержання цим способом, входять в обсяг даного винаходу. Вказані модифіковані клітини можуть бути використані в конкретному аспекті винаходу для лікування потребуючих цього пацієнтів, діючи проти реакції хазяїн проти трансплантата (HvG) і захворювання трансплантат проти хазяїна (GvHD); отже, в об'єм даного  
10 винаходу входить спосіб лікування пацієнтів, які потребують цього, з реакцією хазяїн проти трансплантата (HvG) і захворювання трансплантат проти хазяїна (GvHD), що включає лікування вказаного пацієнта шляхом уведення вказаному пацієнту ефективної кількості модифікованих клітин, які містять інактивовані гени TCR-альфа і/або TCR-бета.

Терапевтичне застосування

15 В іншому з варіантів здійснення виділена клітина, отримана за допомогою різних способів, або клітинна лінія, яка походить від вказаної виділеної клітини, як описано вище, може бути використана як лікарський засіб. В іншому варіанті здійснення вказаний лікарський засіб може бути використаний для лікування раку або інфекції в пацієнта, який потребує цього. В іншому варіанті здійснення вказана виділена клітина відповідно до винаходу або клітинна лінія, яка  
20 походить від вказаної виділеної клітини, може бути використана для одержання лікарського засобу для лікування раку або вірусної інфекції в пацієнта, який потребує цього.

В іншому аспекті даний винахід стосується способів лікування потребуючих цього пацієнтів, що включають щонайменше одну з наступних стадій:

(a) забезпечення Т-клітини, отриманої за будь-яким зі способів, описаних вище;

25 (b) уведення вказаних трансформованих Т-клітин вказаному пацієнту.

В одному варіанті здійснення вказані Т-клітини за даним винаходом можуть піддаватися стійкій Т-клітинній експансії *in vivo* і можуть зберігатися протягом тривалого періоду часу.

Вказане лікування може являти собою полегшуюче, лікуюче або профілактичне лікування. Воно може бути або частиною аутологічної імунотерапії, або частиною алогенного імунотерапевтичного лікування. Під аутологічною імунотерапією мається на увазі, що клітини, клітинна лінія або популяція клітин, використовуваних для лікування пацієнтів, отримані від вказаного пацієнта або від сумісної по антигену лейкоцитів людини (HLA) донора. Під алогенною імунотерапією мається на увазі, що клітини або популяція клітин, використовуваних для лікування пацієнтів, не отримані від вказаного пацієнта, а отримані від донора.  
30

35 Винахід особливо підходить для алогенної імунотерапії, оскільки це дає можливість трансформації звичайно одержуваних від донорів Т-клітин у клітини, що не є алореактивними. Це може бути здійснене за допомогою стандартних протоколів і відтворено стільки разів, скільки буде потрібно. Отримані модифіковані Т-клітини можуть бути об'єднані і введені одному або декільком пацієнтам, будучи доступними у вигляді терапевтичного «готового до використання»  
40 продукту.

Клітини, що можуть бути використані зі способами, що розкриваються, описані в попередньому розділі. Вказане лікування може бути використане для лікування пацієнтів з діагнозом раку, вірусної інфекції, аутоімунних захворювань або захворювання трансплантат проти хазяїна (GvHD). Ракові захворювання, які можна лікувати, включають пухлини, які не васкуляризовані або ще по суті не васкуляризовані, а також васкуляризовані пухлини. Ракові захворювання можуть включати несолідні пухлини (наприклад, гематологічні пухлини, наприклад, лейкози і лімфоми) або можуть включати солідні пухлини. Типи раку, що підлягають лікуванню CAR за винаходом, включають, але не обмежуються ними, карциному, бластоми і саркому, і певні лейкози або лімфоїдні злоякісні новоутворення, доброякісні і злоякісні пухлини, і  
45 злоякісні пухлини, наприклад, саркоми, карциноми і меланоми. Включаються також пухлини/злоякісні новоутворення дорослих і пухлини/злоякісні новоутворення дітей.

Лікування може застосовуватися в комбінації з одним або більше протираковими терапевтичними засобами, вибраними з групи терапії за допомогою антитіл, хіміотерапії, терапії цитокінами, терапії дендритними клітинами, генної терапії, гормональної терапії, терапії за допомогою лазерного світла і променевої терапії.  
50

Відповідно до переважного варіанта здійснення даного винаходу вказане лікування може здійснюватися в пацієнтів, що проходять курс імуносупресорної терапії. Дійсно, даний винахід краще спирається на клітини або популяцію клітин, які сконструйовані як стійкі щонайменше до одного імуносупресорного засобу за рахунок інактивації гена, що кодує рецептор такого  
55

імуносупресорного засобу. У цьому аспекті імуносупресорне лікування повинне допомогти відбору й експансії Т-клітин відповідно до винаходу в пацієнта.

Уведення клітин або популяції клітин згідно із даним винаходом може здійснюватися будь-як зручним способом, включаючи аерозольну інгаляцію, ін'єкцію, проковтування, переливання, імплантацію або трансплантацію. Композиції, описані в даному описі, можна вводити пацієнту підшкірно, внутрішньошкірно, усередину пухлини, усередину вузла, інтрамедулярно, внутрішньом'язово, за допомогою внутрішньовенної або внутрішньолімфатичної ін'єкції або внутрішньоочеревинно. В одному варіанті здійснення композиції клітин за даним винаходом переважно вводять шляхом внутрішньовенної ін'єкції.

Уведення клітин або популяції клітин може складатися з введення  $10^4$ - $10^9$  клітин на кг маси тіла, переважно від  $10^5$  до  $10^6$  клітин/кг маси тіла, включаючи всі цілі значення числа клітин у межах цих діапазонів. Клітини або популяції клітин можна вводити у вигляді однієї або більше доз. В іншому варіанті здійснення вказану ефективну кількість клітин вводять у вигляді однократної дози. В іншому варіанті здійснення вказану ефективну кількість клітин вводять у вигляді більше однієї дози протягом періоду часу. Терміни введення знаходяться в компетенції лікуючого лікаря і залежать від клінічного стану пацієнта. Клітини або популяція клітин може бути отримана з будь-якого джерела, такого як банк крові або донор. Незважаючи на те, що індивідуальні потреби відрізняються, оптимальні інтервали ефективних кількостей даного типу клітин для конкретного захворювання або стану визначаються фахівцями в даній галузі техніки. Ефективна кількість означає кількість, яка забезпечує терапевтичний або профілактичний ефект. Дозування, що вводиться, повинне залежати від віку, стану здоров'я і маси реципієнта, виду супутнього лікування, якщо воно проводиться, частоти лікування і природи бажаного ефекту.

В іншому варіанті здійснення вказана ефективна кількість клітин або композиції, що містить ці клітини, вводиться парентерально. Вказане введення може являти собою внутрішньовенне введення. Вказане введення може бути виконане безпосередньо шляхом ін'єкції в пухлину.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу клітини вводять пацієнту в сполученні (наприклад, до, одночасно або після) з будь-яким набором придатних методів лікування, включаючи, але, не обмежуючись ними, такі засоби, як засоби противірусної терапії, цидофовір і інтерлейкін-2, цитарабін (також відомий як ARA-C) або наталізумаб для лікування пацієнтів з MS, або ефалізумаб для лікування пацієнтів із псоріазом, або інші засоби для лікування пацієнтів з PML. В інших варіантах здійснення Т-клітини за даним винаходом можуть бути використані в поєднанні з хіміотерапією, опроміненням, імуносупресорними засобами, такими як циклоспорин, азатіоприн, метотрексат, мікофенолат і FK506, антитіла або інші імуносупресорні засоби, такі як CAM PATH, антитіла проти CD3 або інші терапевтичні антитіла, цитоксин, флударибін, циклоспорин, FK506, рапаміцин, мікоплінолева кислота, стероїди, FR901228, цитокіни, і в поєднанні з опроміненням. Ці лікарські засоби або інгібують кальційзалежну фосфатазу - кальциневрин (циклоспорин і FK506), або інгібують кіназу p70S6, яка важлива для індукованої фактором росту передачі сигналу (рапаміцин) (Liu et al., Cell 66:807-815, 11; Henderson et al., Immun. 73:316-321, 1991; Bierer et al., Citr. Opin. mm n. 5:763-773, 93). У додатковому варіанті здійснення композиції клітин за даним винаходом вводять пацієнту в поєднанні (наприклад, до, одночасно або після) із трансплантацією кісткового мозку, Т-клітинною абляційною терапією з використанням або хіміотерапевтичних засобів, таких як флударабін, променевою терапією зовнішнім пучком (XRT), циклофосфамідом, або антитілами, такими як OKT3 або CAMPATH. В іншому варіанті здійснення композиції клітин за даним винаходом вводять після В-клітинної абляційної терапії, наприклад, засобами, що взаємодіють з CD20, наприклад, ритуксаном. Наприклад, в одному варіанті здійснення індивідууми можуть одержувати стандартне лікування високою дозою хіміотерапії з наступною трансплантацією стовбурових клітин периферичної крові. У деяких варіантах здійснення після трансплантації індивідууми одержують інфузію розмножених імунних клітин за даним винаходом. У додатковому варіанті здійснення розмножені клітини вводять до або після хірургічного втручання. Вказані модифіковані клітини, отримані за допомогою будь-якого зі способів, описаних у даному описі, можуть бути використані в конкретному аспекті винаходу для лікування пацієнтів, які потребують лікування реакції хазяїн проти трансплантата (HvG) і захворювання трансплантат проти хазяїна (GVHD); отже, в об'єм даного винаходу входить спосіб лікування пацієнтів, які потребують лікування реакції хазяїн проти трансплантата (HvG) і захворювання трансплантат проти хазяїна (GVHD), що включає лікування вказаного пацієнта шляхом введення вказаному пацієнту ефективної кількості модифікованих клітин, що включають інактивовані гени TCR-альфа і/або TCR-бета.

Приклад способу конструювання алогенних клітин людини для імунотерапії

Для кращого розуміння винаходу один приклад способу конструювання алогенних клітин людини для імунотерапії показаний на фіг. 5. Спосіб включає комбінацію однієї або декількох з наступних стадій:

1. Забезпечення Т-клітин із клітинної культури або зі зразка крові від одного конкретного або пацієнта з банку крові й активації вказаних Т-клітин з використанням активаторних кульок анти-CD3/CD28. Кульки забезпечують як первинними, так і костимулюючими сигналами, необхідними для активації й експансії Т-клітин;

2. а) Трансдукція вказаних клітин рТ-альфа або функціональним варіантом трансгена для підтримки експресії CD3 на поверхні і забезпечення експансії клітин шляхом стимуляції комплексу CD3. Руйнування TCR, як очікується, приводить до знищення комплексу TCR і знімає алореактивність (GvHD), але може змінити алогенну експансію клітин через втрату компонента передачі сигналу CD3. Трансдуковані клітини, як очікується, експресують ланцюг рТ-альфа або його функціональний варіант. Цей ланцюг рТ-альфа утворює пару з ланцюгом TCR-бета і компонентами передачі сигналу CD3 з утворенням комплексу пре-TCR і, таким чином, відновлює функціональний комплекс CD3 і підтримує активацію або стимуляцію клітин з інактивованим TCR-альфа. Трансдукція Т-клітин лентивірусним вектором рТ-альфа може бути реалізована до або після інактивації TCR-альфа;

б) трансдукція вказаних клітин мультиланцюговим CAR дозволяє перенаправляти Т-клітини проти антигенів, які експресуються на поверхні клітин-мішеней з різних зл�оїсних пухлин, включаючи лімфоми і солідні пухлини. Для поліпшення функції костимуляторного домену автори розробили мультиланцюговий CAR, який походить від FcεRI, як описано вище. Трансдукція може бути реалізована до або після інактивації генів TCR-альфа і CD52.

3. Конструювання неалореактивних і стійких до імуносупресії Т-клітин:

а) існує можливість інактивації TCR-альфа у вказаних клітинах для видалення TCR з поверхні клітини і запобігання розпізнаванню тканини хазяїна як чужорідної за допомогою TCR алогенних клітин і, таким чином, уникнення GvHD;

б) існує можливість також інактивації одного гена, що кодує імуносупресорний засіб, для додавання вказаним клітинам стійкості до імуносупресорного лікування, щоб запобігти відторгненню трансплантата, не торкаючись пересаджених Т-клітин. У цьому прикладі мішенню імуносупресорних агентів є CD52, і імуносупресорний засіб являє собою гуманізоване моноклональне антитіло проти CD52.

Авторами показано, що використання TALE-нуклеази в результаті можливості більш високої швидкості подій DSB усередині Т-клітин особливо вигідно для досягнення вказаної вище подвійної інактивації Т-клітин. Переважно, гени TCR-альфа і CD52 інактивують електропорацією Т-клітин мРНК, що кодує TALE-нуклеазу, спрямовану на вказані гени. Авторами даного винаходу виявлено, що використання мРНК, що приводить до високої швидкості трансформації, було менш шкідливо для Т-клітин, і таким чином, має вирішальне значення для процесу конструювання Т-клітин. Потім інактивовані Т-клітини сортуються з використанням магнітних кульок. Наприклад, Т-клітини, які експресують CD52, видаляються шляхом фіксації на твердій поверхні, а інактивовані клітини не піддаються впливу стресу, проходячи через колонку. Цей щадний метод підвищує концентрацію відповідним чином сконструйованих Т-клітин.

4. Експансія *in vitro* сконструйованих Т-клітин перед введенням пацієнту або *in vivo* після введення пацієнту шляхом стимуляції комплексу CD3. Перед стадією введення пацієнти одержують лікування імуносупресорними засобами, такими як CAMPATH-1H, гуманізоване моноклональне антитіло проти CD52.

5. Необов'язково вказані клітини експонуються з біспецифічними антитілами *ex vivo* перед введенням пацієнту або *in vivo* після введення пацієнту, щоб привести сконструйовані клітини в безпосередню близькість до антигена-мішені.

Інші визначення

Амінокислотні залишки в поліпептидній послідовності позначені в даному описі відповідно до однобуквенного коду, у якому, наприклад, Q означає Gln або залишок глутаміну, R означає Arg або залишок аргініну, і D означає Asp або залишок аспарагінової кислоти.

Амінокислотні заміни означають заміну одного амінокислотного залишку іншим, наприклад, заміна залишку аргініну залишком глутаміну в пептидній послідовності являє собою амінокислотну заміну.

Нуклеотиди позначаються в такий спосіб: однобуквенний код використовується для позначення основи нуклеозиду: а являє собою аденін, т являє собою тимін, с являє собою цитозин, і г являє собою гуанін. Для вироджених нуклеотидів, г являє собою g або a (пуринові нуклеотиди), к являє собою g або t, s являє собою g або c, w являє собою a або t, m являє собою a або c, у являє собою t або з (піримідинові нуклеотиди), d являє собою g, a або c, v

являє собою g, a або c, b являє собою g, t або c, h являє собою a, t або c, i n являє собою g, a, t або c.

При застосуванні в даному описі «нуклеїнова кислота» або «полінуклеотиди» стосуються нуклеотидів і/або полінуклеотидів, таких як дезоксирибонуклеїнова кислота (ДНК) або 5 рибонуклеїнова кислота (РНК), олігонуклеотидів, фрагментів, отриманих при полімеразній ланцюговій реакції (ПЛР), і фрагментів, створених будь-якими з лігування, розщеплення, дії ендонуклеази і дії екзонуклеази. Молекули нуклеїнової кислоти можуть бути складені з мономерів, що являють собою природні нуклеотиди (наприклад, ДНК і РНК) або аналоги природних нуклеотидів (наприклад, енантімерні форми природних нуклеотидів), або 10 комбінацію обох. Модифіковані нуклеотиди можуть мати зміни в частинах цукрів і/або в частинах піримідинових або пуринових основ. Модифікації цукрів включають, наприклад, заміну однієї або більше гідроксильних груп галогенами, алкільними групами, амінами й азидогрупами, або цукри можуть бути функціоналізовані у вигляді простих ефірів або складних ефірів. Крім того, повна частина цукру може бути замінена стерично й електронно-подібними структурами, 15 такими як аза-цукри і карбоциклічні аналоги цукрів. Приклади модифікацій у частині основи включають алкиловані пурини і піримідини, ациловані пурини або піримідини або інші добре відомі гетероциклічні замісники. Мономери нуклеїнових кислот можуть бути зв'язані фосфодіефірними зв'язками або аналогами таких зв'язків. Нуклеїнові кислоти можуть бути або одностанцюговими або двостанцюговими.

20 Під «полінуклеотидом, що послідовно включає першу область гомології з послідовностями, що лежать вище вказаного двостанцюгового розриву, послідовність, призначену для вставки в геном вказаної клітини, і другу область гомології з послідовностями, що лежать нижче вказаного двостанцюгового розриву» розуміється конструкт ДНК або матриця, що включає першу і другу частини, які гомологічні 5'- і 3'-областям ДНК-мішені in situ. Конструкт ДНК також включає третю 25 частину, розташовану між першою і другою частиною, що має деяку гомологію з відповідною послідовністю ДНК in situ або, альтернативно, не має гомології з 5'- і 3'-областями ДНК-мішені in situ. Після розщеплення ДНК-мішені стимулюється подія гомологічної рекомбінації між геномом, що містить ген-мішень, включений в локус, що представляє інтерес, і цією матрицею, у якій геномна послідовність, що містить ДНК-мішень, замінена третьою частиною матриці і 30 варіабельною ділянкою першої і другої частин вказаної матриці.

Під «ДНК-мішенню», «послідовністю ДНК-мішені», «послідовністю мішені-ДНК», «послідовністю нуклеїнової кислоти-мішені», «послідовністю-мішенню» або «сайтом процесингу» мається на увазі полінуклеотидна послідовність, що може являти собою мішень і 35 піддаватися процесингу рідкорозщеплювальною ендонуклеазою згідно із даним винаходом. Ці терміни стосуються специфічної локалізації ДНК, переважно геномної локалізації в клітині, а також частини генетичного матеріалу, що може існувати незалежно від основної частини генетичного матеріалу, такої як плазмід, епісоми, вірус, транспозони, або локалізації в органелах, таких як мітохондрії, як необмежувальний приклад. Як необмежувальні приклади мішеней TALE-нуклеази, геномні послідовності-мішені звичайно складаються з двох 40 послідовностей 17 п.о. у довжину (які називаються напівмішенями), розділених спейсером у 15 п.о. Кожна напівмішень розпізнається повторами TALE-нуклеаз, перерахованими в таблицях 1, 5, 6 і 10, як необмежувальні приклади, кодованих в плазмідах під контролем промотору EF1-альфа або промотору T7. Послідовність-мішень нуклеїнової кислоти визначається від 5'- до 3'-кінця послідовністю одного ланцюга вказаної мішені, як вказано в таблицях 1, 5, 6 і 10.

45 Під химерним рецептором антигену (CAR) маються на увазі молекули, що сполучають у собі зв'язувальний домен проти компонента, який присутній на клітині-мішені, наприклад, специфічний домен антитіла проти бажаного антигену (наприклад, антигену пухлини) із внутрішньоклітинним доменом, що активує Т-клітинний рецептор, для створення химерного білка, що виявляє специфічну клітинну імунну активність проти мішені. Звичайно CAR 50 складається з позаклітинного домену одностанцюгового антитіла (scFvFc), з'єднаного з внутрішньоклітинним сигнальним доменом дзета-ланцюга Т-клітинного рецепторного комплексу для антигену (scFvFc:ζ), і має здатність при експресії в Т-клітинах перенаправляти розпізнавання антигену відповідно до специфічності моноклонального антитіла. Одним із прикладів CAR, використовуваного в даному винаході, є CAR, спрямований проти антигену CD- 55 19, і він може включати як необмежувальний приклад амінокислотну послідовність SEQ ID NO:73.

Термін «вектор для доставки» або «вектори для доставки» має на увазі будь-який вектор для доставки, що може використовуватися в даному винаході, щоб увести клітину в контакт (тобто «для контактування») або доставити усередину клітини або в субклітинні компартменти 60 (тобто «для введення») агентів/хімічних речовин і молекул (білків або нуклеїнових кислот),

необхідних для даного винаходу. Він включає, але, не обмежуючись ними, ліпосомальні вектори для доставки, вірусні вектори для доставки, вектори для доставки лікарських засобів, хімічні носії, полімерні носії, ліпоплекси, поліплекси, дендримери, мікропухирці (ультразвукові контрастуючі агенти), наночастинки, емульсії або інші придатні вектори для доставки. Ці вектори для доставки дають можливість доставляти молекули, хімічні речовини, макромолекули (гени, білки) або інші вектори, такі як плазмід, пептиди, розроблені Diatos. У цих випадках, вектори для доставки є молекулярними носіями. Під «вектором для доставки» або «векторами для доставки» маються на увазі також методи доставки для здійснення трансфекції.

Терміни «вектор» або «вектори» стосуються молекули нуклеїнової кислоти, здатної транспортувати іншу нуклеїнову кислоту, з яким вона зв'язана. «Вектор» у даному винаході включає, але не обмежується ними, вірусний вектор, плазмід, вектор РНК або лінійну або кільцеву молекулу ДНК або РНК, яка може складатися з хромосомної, нехромосомної, напівсинтетичної або синтетичної нуклеїнової кислоти. Переважні вектори являють собою вектори, здатні до автономної реплікації (епісомний вектор) і/або до експресії нуклеїнових кислот, з якими вони зв'язані (експресійні вектори). Велика кількість придатних векторів відомі фахівцям у даній галузі техніки і комерційно доступні.

Вірусні вектори включають ретровірусні, аденовірусні, парвовірусні (наприклад, на основі аденоасоційованих вірусів), коронавірусні, на основі РНК-вірусів з негативним ланцюгом, таких як ортоміксовірус (наприклад, вірус грипу), на основі вірусу сказу (наприклад, вірусу сказу і вірусу везикулярного стоматиту), параміксовірусні (наприклад, на основі вірусів кору і Сендай), на основі РНК-вірусів з позитивним ланцюгом, таких як пікорнавірус і альфавірус, на основі вірусів з дволанцюговою ДНК, включаючи аденовірус, вірус герпеса (наприклад, вірус простого герпеса типів 1 і 2, вірус Епштейна-Барра, цитомегаловірус), і поксвірусні (наприклад, на основі вірусів коров'ячої віспи, пташиної віспи і віспи канарок). Інші віруси включають, наприклад, вірус Норфолк, тогавірус, флавівірус, реовіруси, паповавірус, гепаднавірус і вірус гепатиту. Приклади ретровірусів включають: вірус пташиного лейкозу-саркоми, віруси ссавців типу С, типу В, віруси типу D, групи HTLV-BLV, лентивірус, спумавірус (Coffin, J. M., *Retroviridae: The viruses and their replication*, In *Fundamental Virology*, Third Edition, B. N. Fields, et al., Eds., Lippincott- Raven Publishers, Philadelphia, 1996).

Під «лентивірусним вектором» маються на увазі лентивірусні вектори на основі ВІЛ, що є дуже перспективними для доставки генів через їхню відносно високу здатність до упакування, знижену імуногенність і їхню здатність до стабільної трансдукції з високою ефективністю широкого спектра різних типів клітин. Лентивірусні вектори звичайно створюються для часової трансфекції трьох (упаковувальної, оболонкової і трансферної) або більше плазмід у клітини-продуценти. Як і вектори на основі ВІЛ, лентивірусні вектори вводяться в клітину-мішень шляхом взаємодії глікопротеїдів вірусної поверхні з рецепторами на поверхні клітин. При вході вірусна РНК піддається зворотній транскрипції, яка опосередковується комплексом зворотної транскриптази вірусу. Продукт зворотної транскрипції являє собою дволанцюгову лінійну вірусну ДНК, яка є субстратом для вірусної інтеграції в ДНК інфікованих клітин. Під «інтегрованими лентивірусними векторами (або LV)», маються на увазі такі вектори, що, як необмежувальний приклад, здатні інтегруватися в геном клітини-мішені. На противагу цьому, «неінтегрованими лентивірусними векторами (або NILV)» позначають вектори для ефективної доставки генів, що не інтегруються в геном клітини-мішені під дією інтегрази вірусу.

Вектори для доставки і вектори можуть бути зв'язані або об'єднані будь-якими способами клітинної перміабілізації, такими як створення пор ультразвуком або електропорацією або похідними цих методів.

Під клітиною або клітинами маються на увазі будь-які еукаріотні живі клітини, первинні клітини і клітинні лінії, отримані з цих організмів для культивування *in vitro*.

Під «первинною клітиною» або «первинними клітинами» маються на увазі клітини, узяті безпосередньо з живої тканини (тобто біопсійного матеріалу) і призначені для росту *in vitro*, які пройшли дуже мало подвоєнь популяції, і, отже, є більш репрезентативними відносно головних функціональних компонентів і характеристик тканин, з яких вони походять, у порівнянні з тривалими онкогенними або штучно іморталізованими клітинними лініями.

Як необмежувальні приклади, клітинні лінії можуть бути вибрані з групи, яка складається з клітин CHO-K1; клітин HEK293; клітин Caco2; клітин U2-OS; клітин NIH 3T3; клітин NSO; клітин SP2; клітин CHO-S; клітин DG44; клітин K-562, клітин U-937; клітин MRC5; клітин IMR90; клітин Jurkat; клітин HepG2; клітин HeLa; клітин HT-1080; клітин HCT-116; клітин Hu-h7; клітин Huvес; клітин Molt 4.

Усі ці клітинні лінії можуть бути модифіковані за допомогою способу за даним винаходом для забезпечення моделей клітинних ліній для одержання, експресії, кількісної оцінки,

виявлення, вивчення гена або білка, яка представляє інтерес; ці моделі можуть бути також використані для скринінгу біологічно активних молекул, що інтерес представляють, у дослідженнях і при їхньому одержанні і використанні в різних галузях, таких як в галузі хімії, біопалива, терапії й агрономії, як необмежувальні приклади.

Під «мутацією» мається на увазі заміна, делеція, вставка до одного, двох, трьох, чотирьох, п'яти, шести, семи, восьми, дев'яти, десяти, одинадцяти, дванадцяти, тринадцяти, чотирнадцяти, п'ятнадцяти, двадцяти, двадцяти п'яти, тридцяти, сорока, п'ятдесяти або більше нуклеотидів/амінокислот у полінуклеотиді (кДНК, гені), або в послідовності поліпептиду. Мутація може вплинути на кодуючу послідовність гена або його регуляторну послідовність. Вона також може впливати на структуру геномної послідовності або структуру/стабільність кодованої мРНК.

Під «варіантом(ами)» мається на увазі варіант повторів, варіант, варіант, що зв'язує ДНК, варіант TALE-нуклеази, варіант поліпептиду, отриманого в результаті мутації або заміни щонайменше одного залишку в амінокислотній послідовності батьківської молекули.

Під «функціональним варіантом» мається на увазі каталітично активний мутант білка або домену білка; такий мутант може мати таку ж активність, як і його батьківський білок або домен білка, або додаткові властивості, або більш високу або більш низьку активність.

Під «геном» мається на увазі основна одиниця спадковості, яка складається із сегмента ДНК, розташованого лінійно уздовж хромосоми, що кодує специфічний білок або сегмента білка. Ген звичайно включає промотор, 5'-нетрансльовану область, одну або більше кодуючих послідовностей (екзонів), необов'язково інтрони, 3'-нетрансльовану область. Ген може додатково містити термінатор, ехансери і/або сайленсери.

При використанні в даному описі термін «локус» являє собою специфічну фізичну локалізацію послідовності ДНК (наприклад, гена) у хромосомі. Термін «локус» може стосуватися специфічної фізичної локалізації послідовності-мішені рідкорозщеплювальної ендонуклеази в хромосомі. Такий локус може включати послідовність-мішень, що розпізнається і/або розщеплюється рідкорозщеплювальною ендонуклеазою відповідно до винаходу. Зрозуміло, що локус, що представляє інтерес, за даним винаходом може визначати не тільки послідовність нуклеїнової кислоти, що існує в основній масі генетичного матеріалу (тобто в хромосомі) клітини, але також і частину генетичного матеріалу, що може існувати незалежно від вказаної основної маси генетичного матеріалу, таку як плазміди, епісоми, вірус, транспозони, або знаходиться в органелах, таких як мітохондрії, як необмежувальні приклади.

Термін «ендонуклеаза» стосується будь-якого ферменту дикого типу або варіанту ферменту, здатного каталізувати гідроліз (розщеплення) зв'язків між нуклеїновими кислотами в молекулі ДНК або РНК, переважно в молекулі ДНК. Ендонуклеази не розщеплюють молекулу ДНК або РНК незалежно від її послідовності, а розпізнають і розщеплюють молекулу ДНК або РНК у специфічних полінуклеотидних послідовностях, які надалі називаються «послідовностями-мішенями» або «сайтами-мішенями». Ендонуклеази можуть класифікуватися як рідкорозщеплювальні ендонуклеази, коли звичайно мають сайт розпізнавання полінуклеотидів, довший ніж 12 пар основ (п.о.) у довжину, більш переважно 14-55 п.о. Рідкорозщеплювальні ендонуклеази значно збільшують HR, викликаючи розриви дволанцюгової ДНК (DSB) у визначеному локусі (Rouet, Smih et al. 1994; Chouluka, Perrin et al. 1995; Pingoud and Silva 2007). Рідкорозщеплювальні ендонуклеази можуть, наприклад, являти собою хомінг-ендонуклеазу (Paques and Duchateau 2007), химерну нуклеазу з цинковими пальцями (ZFN), одержувану в результаті з'єднання сконструйованих областей цинкових пальців з каталітичним доменом ферменту рестрикції, такого як FokI (Porteus and Carroll 2005), або хімічну ендонуклеазу (Eisenschmidt, Lanio et al. 2005; Arimondo, Thomas et al. 2006). У хімічних ендонуклеазах хімічний або розщеплювальний пептидний фрагмент кон'югують або з полімером нуклеїнових кислот, або з іншою розпізнавальною ДНК специфічною послідовністю-мішенню, направляючи в такий спосіб розщеплювальну активність на специфічну послідовність. Хімічні ендонуклеази також охоплюють синтетичні нуклеази, такі як кон'югати ортофенантроліну, що розщеплюють молекули ДНК, і триплексутворювальні олігонуклеотиди (TFO), відомі як такі, що зв'язуються зі специфічними послідовностями ДНК (Kalish and Glazer 2005). Такі хімічні ендонуклеази включаються в термін «ендонуклеази» згідно із даним винаходом.

Рідкорозщеплювальні ендонуклеази також можуть являти собою, наприклад, TALE-нуклеази, новий клас химерних нуклеаз, що використовують каталітичний домен FokI і ДНК-зв'язувальний домен, який походить з ефектора, подібного до активатора транскрипції (TALE), сімейства білків, використовуваних у процесі інфікування рослинними патогенами роду *Xanthomonas* (Boch, Scholze et al. 2009; Moscou and Bogdanove 2009; Christian, Cermak et al. 2010; Li, Huang et al.). Функціональне розташування TALE-нуклеази на основі FokI (TALE-

нуклеази) по суті таке ж, як і ZFN, причому ДНК-зв'язувальний домен з цинковими пальцями замінюється доменом TALE. Таким чином, для розщеплення ДНК TALE-нуклеазою потрібні дві області розпізнавання ДНК, що прилягають до неспецифічної центральної області. Рідкорозщеплювальні ендонуклеази, охоплювані даним винаходом, можуть також походити від TALE-нуклеаз.

Рідкорозщеплювальна ендонуклеаза може являти собою хомінг-ендонуклеазу, також відому за назвою мегануклеаза. Такі хомінг-ендонуклеази добре відомі в даній галузі техніки (Stoddard 2005). Хомінг-ендонуклеази розпізнають послідовність ДНК-мішені і викликають розрив одного або двох ланцюгів. Хомінг-ендонуклеази є високоспецифічними, що розпізнають сайти ДНК-мішені в діапазоні від 12 до 45 пар основ (п.о.) у довжину, звичайно від 14 до 40 п.о. у довжину. Хомінг-ендонуклеази відповідно до винаходу можуть, наприклад, відповідати ендонуклеазі LAGLIDADG, ендонуклеазі HNH або ендонуклеазі GIY-YIG. Переважні хомінг-ендонуклеази згідно із даним винаходом можуть являти собою варіант I-CreI.

Під «TALE-нуклеазою» (TALEN) мається на увазі гібридний білок, що складається зі зв'язувального домену нуклеїнової кислоти, що звичайно походить з ефектора, подібно до активатора транскрипції (TALE), і одного каталітичного домену нуклеази для розщеплення послідовності нуклеїнової кислоти-мішені. Каталітичний домен переважно являє собою домен нуклеази і більш переважно домен, який має ендонуклеазну активність, такий як, наприклад, I-TevI, CoIE7, NucA і Fok-I. У конкретному варіанті здійснення домен TALE може бути з'єднаний з мегануклеазою, такий як, наприклад, I-CreI і I-OnuI або її функціональний варіант. У більш переважному варіанті здійснення вказана нуклеаза являє собою мономерну TALE-нуклеазу. Мономерна TALE-нуклеаза являє собою TALE-нуклеазу, що не вимагає димеризації для специфічного розпізнавання і розщеплення, наприклад, при з'єднанні сконструйованих повторів TAL з каталітичним доменом I-TevI, описаним у WO2012138927. Ефектори, подібні до активатора транскрипції (TALE), являють собою білки зі штамів бактерій *Xanthomonas*, що включають множину повторюваних послідовностей, причому кожен повтор включає подвійні залишки в положенні 12 і 13 (RVD), які є специфічними для кожної нуклеотидної основи послідовності-мішені нуклеїнової кислоти. Зв'язувальні домени зі схожими модульними основа-на-основу зв'язувальними властивостями нуклеїнової кислоти (MBBBD) також можуть бути отримані з нових модульних білків, нещодавно виявлених авторами в інших штамів бактерій. Нові модульні білки мають перевагу, виявляючи більш високу варіабельність послідовності, ніж повтори TALE. Переважно, RVDS, зв'язані з розпізнаванням різних нуклеотидів, являють собою HD для розпізнавання C, NG для розпізнавання T, NI для розпізнавання A, NN для розпізнавання G або A, NS для розпізнавання A, C, G або T, HG для розпізнавання T, IG для розпізнавання T, NK для розпізнавання G, HA для розпізнавання C, ND для розпізнавання C, HI для розпізнавання C, HN для розпізнавання G, NA для розпізнавання G, SN для розпізнавання G або A, і YG для розпізнавання T, TL для розпізнавання A, VT для розпізнавання A або G, і SW для розпізнавання A. В іншому варіанті здійснення критичні амінокислоти 12 і 13 можуть бути мutowані відносно інших амінокислотних залишків, щоб модулювати їхню специфічність відносно нуклеотидів A, T, C і G, і, зокрема, щоб підсилити цю специфічність. TALE-нуклеаза вже описана і використана для стимуляції спрямованої дії на ген і для генної модифікації (Boch, Scholze et al. 2009; Moscou and Bogdanove 2009; Christian, Cermak et al. 2010; Li, Huang et al.). Сконструйовані TALE-нуклеази комерційно доступні під торговою маркою TALEN™ (Collectis, 8 rue de la Croix Jarry, 75013 Paris, France).

Термін «розщеплення» стосується розриву ковалентного кістяка полінуклеотида. Розщеплення може бути ініційовано різними способами, включаючи, але, не обмежуючись ними, ферментативний або хімічний гідроліз фосфодієфірного зв'язку. Можливо як одностанцюгове розщеплення, так і двостанцюгове розщеплення, і двостанцюгове розщеплення може відбуватися в результаті двох різних подій одностанцюгового розщеплення. Розщеплення двостанцюгової ДНК, РНК або гібрида ДНК/РНК може привести до одержання або тупих кінців, або східчастих кінців.

Під «гібридним білком» мається на увазі результат добре відомого процесу в даній галузі техніки, який полягає в з'єднанні двох або більше генів, які спочатку кодують окремі білки або їхні частини, трансляції вказаного «гібридного гена», що приводить у результаті до єдиного поліпептиду з функціональними властивостями, які походять від кожного з вихідних білків.

«Ідентичність» стосується ідентичності послідовностей двох молекул нуклеїнової кислоти або двох поліпептидів. Ідентичність може бути визначена шляхом порівняння положення в кожній послідовності, які можуть бути вирівняні з метою порівняння. Коли положення в порівнюваній послідовності займає ту ж саму основу, то молекули є ідентичними по даному положенню. Ступінь подібності або ідентичності між послідовностями нуклеїнових кислот або

амінокислот є функцією кількості ідентичних або парних нуклеотидів у положеннях, спільних для послідовностей нуклеїнових кислот. Різні алгоритми і/або програми вирівнювання можуть бути використані для розрахунку ідентичності двох послідовностей, включаючи FASTA або BLAST, які доступні як частина пакета аналізу послідовностей GCG (University of Wisconsin, Madison, Wis.), і їх можна використовувати, наприклад, з параметрами по умовчання. Наприклад, охоплюються поліпептиди, що мають щонайменше 70%, 85%, 90%, 95%, 98% або 99% ідентичність конкретним поліпептидам, описаним у даному описі, і переважно виявляють по суті ті ж функції, а також полінуклеотид, що кодує такі поліпептиди.

«Подібність» описує взаємовідносини між амінокислотними послідовностями двох або більше поліпептидів. Програма BLASTP також може бути використана для того, щоб ідентифікувати амінокислотну послідовність, що має щонайменше 70%, 75%, 80%, 85%, 87,5%, 90%, 92,5%, 95%, 97,5%, 98%, 99% подібність послідовності з референсною амінокислотною послідовністю з використанням матриці подібності, наприклад, BLOSUM45, BLOSUM62 або BLOSUM80. Якщо не вказане інше, підрахунок подібності буде ґрунтуватися на використанні BLOSUM62. Коли використовується BLASTP, відсоток подібності оснований на позитивних очках BLASTP, і відсоток ідентичності послідовностей оснований на підрахунку очок ідентичності BLASTP. BLASTP «ідентичність» показує кількість і частку від усіх залишків при максимальному підрахунку очок пар послідовностей, які є ідентичними; і BLASTP «позитивна» показує кількість і частку залишків, для яких очки вирівнювання мають позитивні значення і які подібні одне до одного. Амінокислотні послідовності, що мають ці ступені ідентичності або подібності або який-небудь проміжний ступінь ідентичності або подібності з амінокислотними послідовностями, розкритими в даному описі, розглядаються й охоплюються даним описом. Полінуклеотидні послідовності подібних поліпептидів виводяться з використанням генетичного коду і можуть бути отримані за допомогою звичайних способів. Наприклад, функціональний варіант рТ-альфа може мати 70%, 75%, 80%, 85%, 87,5%, 90%, 92,5%, 95%, 97,5%, 98%, 99% подібність послідовності з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO:107. Полінуклеотид, що кодує такий функціональний варіант, може бути отриманий шляхом зворотної транскрипції його амінокислотної послідовності з використанням генетичного коду.

«Домен трансдукції сигналу» або «костимуляторний ліганд» стосується молекули на антигенпрезентуючій клітині, яка специфічно зв'язується з розпізнаваною костимуляторною молекулою на Т-клітині, тим самим забезпечуючи сигнал, що, на додаток до первинного сигналу, наданому, наприклад, у результаті зв'язування комплексу TCR/CD3 з молекулою МНС, навантаженою пептидом, опосередковує відповідь Т-клітини, включаючи, але, не обмежуючись ними, активацію проліферації, диференціювання тощо. Костимуляторний ліганд може включати, але, не обмежуючись ними, CD7, CD80 (B7-1), CD86 (B7-2), PD-L1, PD-L2, 4-1BBL, OX40L, індукований костимуляторний ліганд (ICOS-L), молекулу міжклітинної адгезії (ICAM, CD30L, CD40, CD70, CD83, HLA-G, MICA, M1CB, HVEM, рецептор лімфотоксина-бета, 3/TR6, ILT3, ILT4, агоніст або антитіло, що зв'язується з лігандом Toll-рецептора, і ліганд, що специфічно зв'язується з B7-H3. Костимуляторний ліганд охоплює також серед іншого антитіло, що специфічно зв'язується з костимуляторною молекулою, яка присутня на Т-клітині, такою як, але, не обмежуючись ними, CD27, CD28, 4-1BB, OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, антиген-1, зв'язаний з функцією лімфоцитів (LFA-1), CD2, CD7, LTGHT, NKG2C, У7-H3, ліганд, що специфічно зв'язується з CD83.

«Костимуляторна молекула» стосується розпізнаваного партнера зв'язування на Т-клітині, що специфічно зв'язується з костимуляторним лігандом, таким чином, будучи посередником костимуляторної відповіді клітини, такої як, але без обмеження, проліферація. Костимуляторні молекули включають, але не обмежуються ними, молекулу класу I МНС, BTLA і ліганд Toll-рецептора.

«Костимуляторний сигнал» при використанні в даному описі стосується сигналу, що у комбінації з первинним сигналом, таким як зв'язування TCR/CD3, приводить до проліферації Т-клітин і/або позитивної регуляції або негативної регуляції ключових молекул.

«Біспецифічне антитіло» стосується антитіла, що має сайти зв'язування для двох різних антигенів у межах однієї молекули антитіла. Фахівцям у даній галузі техніки буде зрозуміло, що інші молекули на додаток до структури канонічного антитіла можуть бути сконструйовані з двома типами специфічності зв'язування. Додатково варто розуміти, що зв'язування антигену за допомогою біспецифічних антитіл може бути одночасним або послідовним. Біспецифічні антитіла можуть бути отримані за допомогою хімічних методів (див., наприклад, Kranz et al. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 5807), за допомогою методів «полідому» (див. патент США 4474893) або за допомогою методів рекомбінантної ДНК, усі вони самі по собі відомі. Як необмежувальний приклад, кожен зв'язувальний домен включає щонайменше одну варіабельну



область від важкого ланцюга антитіла («область VH або H»), де область VH першого зв'язувального домену специфічно зв'язується з маркером лімфоцитів, таким як CD3, і область VH другого зв'язувального домену специфічно зв'язується з антигеном пухлини.

Термін «позаклітинний лігандзв'язувальний домен», використовуваний у даному описі, визначається як оліго- або поліпептид, який здатний зв'язуватися з лігандом. Переважно домен повинен мати здатність до взаємодії з молекулою клітинної поверхні. Наприклад, позаклітинний лігандзв'язувальний домен може бути вибраний для розпізнавання ліганду, що служить як маркер клітинної поверхні на клітинах-мішенях, зв'язаних з конкретним патологічним станом. Таким чином, приклади маркерів клітинної поверхні, що можуть діяти як ліганди, включають маркери, що зв'язані з вірусними, бактеріальними і паразитарними інфекціями, аутоімунним захворюванням і раковими клітинами.

Термін «індивідуум» або «пацієнт», використовуваний у даному описі, включає всіх членів тваринного світу, включаючи нелюдиноподібних приматів і людину.

У представленому вище описі винаходу пропонується спосіб і методика його здійснення і застосування, так що будь-який фахівець у даній галузі техніки має можливість його здійснити і використовувати, причому це здійснення пропонується зокрема у вигляді пунктів прикладеної формули винаходу, яка становить частину оригінального опису.

У тому випадку, коли в даному описі встановлюється кількісне обмеження або діапазон, кінцеві точки включаються. Крім того, усі значення і піддіапазони в межах кількісного обмеження або діапазону спеціально включаються, якщо це описано однозначно.

Приведений вище опис представлений, щоб дати можливість фахівцю в даній галузі техніки здійснити і використовувати винахід, і пропонується в контексті конкретного застосування і його вимог. Різні модифікації переважних варіантів здійснення будуть легко очевидні фахівцям у даній галузі техніки, і загальні принципи, визначені в даному описі, можуть бути застосовані до інших варіантів здійснення і застосування без відступу від суті й обсягу даного винаходу. Таким чином, даний винахід не призначений для обмеження представленими варіантами здійснення, але повинен відповідати найширшому обсягу, сумісному з принципами й ознаками, розкритими в даному описі.

Після загального опису даного винаходу додаткове розуміння може бути досягнуте з посиланням на визначені конкретні приклади, які приведені в даному описі з метою ілюстрації і не призначені для обмеження, якщо не вказане інше.

Приклади

Приклад 1: TALE-нуклеази, що розщеплюють ген GR людини

Сконструйовано й отримано 6 гетеродимерних TALE-нуклеаз, спрямованих на екзони гена GR людини. У таблиці 1 нижче показані послідовності-мішені, що розщеплюються кожною TALE-нуклеазою. TALE-нуклеаза GR складається з двох незалежних частин (так званих половин TALE-нуклеази), причому кожна містить послідовність повторів, сконструйовану для зв'язування і розщеплення послідовностей-мішеней GR, що складаються з двох послідовностей 17 п.о. у довжину (так званих половин мішеней), розділених спейсером з 15 п.о.

Таблиця 1

Опис TALE-нуклеаз GR і послідовностей сайтів-мішеней TALE-нуклеаз в гені GR людини

Назва мішені	Послідовність мішені	Послідовність повтору	Послідовність половини TALE-нуклеази
GRex2	TATTCACCTGATGGACTC caaagaatcattaac TCCTGGTAGAGAAGAAA (SEQ ID NO:1)	Повтор GRex2-LPT9-L1 (SEQ ID NO:7)	GRex2-L TALEN (SEQ ID NO:19)
		Повтор -GRex2-LPT9-R1 (SEQ ID NO:8)	GRex2-R TALEN (SEQ ID NO:20)
GRex3T2	TGCCTGGTGTGCTCTGA tgaagcttcaggatg TCATTATGGAGTCTTAA (SEQ ID NO:2)	Повтор -GRex3T2-L1 (SEQ ID NO:9)	GRex3T2-L TALEN (SEQ ID NO:21)
		Повтор -GRex3T2-R1 (SEQ ID NO:10)	GRex3T2-R TALEN (SEQ ID NO:22)
GRex3T4	TGCTCTGATGAAGCTTC aggatgtcattatgg AGTCTTAACCTGTGGAA (SEQ ID NO:3)	Повтор -GRex3T4-L1 (SEQ ID NO:11)	GRex3T4-L TALEN (SEQ ID NO:23)
		Повтор -GRex3T4-R1 (SEQ ID NO:12)	GRex3T4-R TALEN (SEQ ID NO:24)

Назва мішені	Послідовність мішені	Послідовність повтору	Послідовність половини TALE-нуклеази
GRex5T1	TGGTGTCACTGTTGGAG gttattgaacctgaa GTGTTATATGCAGGATA (SEQ ID NO:4)	Повтор -GRex5T1-LPT8-L1 (SEQ ID NO:13)	GRex5T1-L TALEN (SEQ ID NO:25)
		Повтор -GRex5T1-LPT8-R1 (SEQ ID NO:14)	GRex5T1-R TALEN (SEQ ID NO:26)
GRex5T2	TATGATAGCTCTGTTCC agactcaacttgag GATCATGACTACGCTCA (SEQ ID NO:5)	Повтор -GRex5T2-L1 (SEQ ID NO:15)	GRex5T2-L TALEN (SEQ ID NO:27)
		Повтор -GRex5T2-R1 (SEQ ID NO:16)	GRex5T2-R TALEN (SEQ ID NO:28)
GRex5T3	TTATATGCAGGATATGA tagctctgttccaga CTCAACTTGGAGGATCA (SEQ ID NO:6)	Повтор -GRex5T3-L1 (SEQ ID NO:17)	GRex5T3-L TALEN (SEQ ID NO:29)
		Повтор -GRex5T3-R1 (SEQ ID NO:18)	GRex5T3-R TALEN (SEQ ID NO:30)

Амінокислотні послідовності N-кінцевого, C-кінцевого доменів і повтору основані на AvrBs3 TALE (Ref: GenBank: X16130.1). C-кінцевий і N-кінцевий домени розділені двома сайтами рестрикції BsmBI. Масив повторів (SEQ ID NO:7-18), спрямованих на бажані послідовності (SEQ ID NO:1-6), синтезували з використанням методу твердої підкладки, що складається з послідовних стадій рестрикції/лігування/промивання (міжнародна заявка PCT WO2013/017950). Коротко, перший блок (кодує дуповтор) іммобілізували на твердому носії за допомогою взаємодії біотин/стрептавідин, другий блок (три-повтор) потім лігували з першим, і після гідролізу SfaNI третього блока (три-повтору) з'єднували. Процес повторювали з використанням блоків три- або дуповторів до одержання бажаного масиву повторів. Потім продукт клонували в класичній клонуєчій плазміді pAPG10 для ампліфікації в *E. coli* і секвенували. Отриманий у такий спосіб масив повторюваних послідовностей субклонували в експресійному векторі TALE дріжджів, використовуючи ферменти рестрикції типу IIS BsmBI для приймаючої плазміді і BbvI і SfaNI для послідовності повторів, що вставляється. ДНК, що кодує половину TALE-нуклеази, що містить зв'язувальний ДНК домен, який походить від TALE, з'єднаний з каталітичним доменом ферменту рестрикції FokI, ампліфікували в *E. coli*, одержували за допомогою стандартних мініпрепаративних методів і секвенували для оцінки інтегрованості вставки.

Активність TALE-нуклеаз GR у дріжджах

Нуклеазну активність шести GR-TALE-нуклеаз тестували при 37°C за допомогою розробленого авторами аналізу SSA у дріжджах, описаного раніше (міжнародні публікації PCT WO 2004/067736 і (Epinat, Arnould et al. 2003; Chames, Epinat et al. 2005; Arnould, Chames et al. 2006; Smith, Grizot et al. 2006), на мішенях, що містять дві послідовності-мішені TALE, розташовані одна напроти одної на ланцюгу ДНК, розділені спейсером з 15 п.о. з одержанням SEQ ID NO:1-6. Усі репортерні плазміді для дріжджів-мішеней, що містять послідовності ДНК-мішені TALE-нуклеази, сконструйовані, як описано раніше (міжнародні публікації PCT WO 2004/067736 і (Epinat, Arnould et al. 2003; Chames, Epinat et al. 2005; Arnould, Chames et al. 2006; Smith, Grizot et al. 2006). Рівні розщеплювальної активності TALE-нуклеази в дріжджах для індивідуальних клонів відносно мішеней представлені в таблиці 2.

Таблиця 2

Розщеплювальна активність TALE-нуклеаз GR в дріжджах

Мішень	Трансфікована половина TALE-нуклеази	Gal дріжджів 37°C	Gal дріжджів 30°C
GRex2	GRex2-L TALEN	1	1
	GRex20-R TALEN		
GRex3T2	GRex3T2-L TALEN	0,92	0,87
	GRex3T2-R TALEN		
GRex3T4	GRex3T4-L TALEN	0,94	0,87
	GRex3T4-R TALEN		
GRex5T1	GRex5T1-L TALEN	0,48	0,36
	GRex5T1-R TALEN		
GRex5T2	GRex5T2-L TALEN	0,97	0,91
	GRex5T2-R TALEN		

Мішень	Трансфікована половина TALE-нуклеази	Gal дріжджів 37°C	Gal дріжджів 30°C
GRex5T3	GRex5T3-L TALEN	1	0,98
	GRex5T3-R TALEN		

Включено значення від 0 до 1. Максимальне значення дорівнює 1.

Активність TALE-нуклеаз GR у HEK293

5 Кожен конструкт TALE-нуклеази субклонували з використанням гідролізу ферментами рестрикції в експресійному векторі ссавців під контролем довгого промотору рEF1-альфа.

Один мільйон клітин HEK293 висівали за день до трансфекції. Клітини котрансфікували 2,5 мкг кожної з двох плазмід, що кодують ліву і праву половину TALE-нуклеази GRex2, GRex3T2, GRex3T4, GRex5T1, GRex5T2 або GRex5T3, які розпізнають дві половини геномних послідовностей-мішеней, що представляють інтерес, у гені GR під контролем промотору EF1-альфа, використовуючи 25 мкл ліпофектаміну (Invitrogen), відповідно до інструкцій виробника. Як контроль клітини котрансфікували 2,5 мкг кожної з двох плазмід, що кодують ліву і праву половину TALE-нуклеаз, спрямованих на сайт-мішень (TRAC\_T01) константної області альфа-ланцюга рецептора T-клітин (TRAC\_T01-L і -R TALE-нуклеази (SEQ ID NO:41 і SEQ ID NO:42, сайт-мішень TRAC\_T01 (SEQ ID NO:37)) під контролем промотору EF1-альфа. Розрив індукує негомологічне приєднання кінця (NHEJ), що являє собою механізм, який припускає помилки. Активність TALE-нуклеаз вимірювали по частоті вставок або делецій у геномному локусі-мішені.

Через 2 або 7 днів після трансфекції клітини збирали і проводили специфічні для локусу ПЛР на геномній ДНК, виділеній з використанням наступних праймерів: 5'-CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG-3' (пряма адаптерна послідовність) - 10N (TAG)-локус специфічної прямої послідовності екзона 2 GR: 5'-GGTTCATTTAACAAGCTGCC-3' (SEQ ID NO:31), екзона 3 GR: 5'-GCATTCTGACTATGAAGTGA-3' (SEQ ID NO:32) і екзона 5 GR: 5'-TCAGCAGGCCACTACAGGAGTCTCACAAG-3' (SEQ ID NO:33), і зворотний праймер 5'-CCATCCCTGTGTGCCTTGGCAGTCTCAG-3' (зворотна адаптерна послідовність) - локус специфічної зворотної послідовності екзона 2 GR: 5'-AGCCAGTGAGGGTGAAGACG-3' (SEQ ID NO:34), екзона 3 GR: 5'-GGGCTTTGCATATAATGGAA-3' (SEQ ID NO:35) і екзона 5 GR: 5'-CTGACTCTCCCTTCATAGTCCCCAGAAC-3' (SEQ ID NO:36).

30 Продукти ПЛР секвенували за допомогою системи 454 секвенування (454 Life Sciences). Одержували приблизно 10000 послідовностей на продукт PCR і потім аналізували на присутність сайт-специфічних подій вставок або делецій. У таблиці 3 показаний відсоток послідовностей, що демонструють вставки або делеції в сайті-мішені TALE-нуклеази серед загального числа послідовностей у зразку. У таблиці 3 приведені результати репрезентативного експерименту для GRex2, GRex3T2 і GRex3T4.

35 В усіх протестованих випадках % мутагенезу був подібний на 7-й день у порівнянні з одним зі зразків на 2 день після трансфекції. Аналізували також природу подій мутагенезу з виявленням у всіх випадках переваги делецій у порівнянні з вставками.

Таблиця 3

Процент направлено мутагенезу в ендогенних сайтах-мішенях TALE-нуклеази в клітинах HEK293

Мішень	% вставок/делецій на 2 день при трансфекції TALE-нуклеази GR	% вставок/делецій на 7 день при трансфекції TALE-нуклеази GR	% вставок/делецій на 2 день при контрольній трансфекції TALE-нуклеази TRAC_T01
GRex2	20,3	24,9	0,5
GRex3T2	9,3	9,8	0
GRex3T4	19	18,3	0,0
GRex5T1	11,2	на	0,7
GRex5T2	3,4	на	0
GRex5T3	8,3	на	0

на - не аналізували

Активність TALE-нуклеаз GR у первинних Т-лімфоцитах

Кожен конструкт TALE-нуклеази субклонували з використанням гідролізу ферментами рестрикції в експресійний вектор під контролем промотору T7.

мРНК, яка кодує TALE-нуклеази, що розщеплюють геномні послідовності GR, синтезували з кожної плазмиди, що несе кодуєчі послідовності нижче промотору T7. Т-лімфоцити, виділені з периферичної крові, активували протягом 5 днів з використанням активаторних кульок проти CD3/CD28 (Life Technologies), і 5 мільйонів клітин трансфікували шляхом електропорації 10 мкг кожної з 2 мРНК, що кодують обидві половини TALE-нуклеаз, з використанням приладу CytoLVT-P (прилад BTK-Harvard). Як контроль використовували Т-клітини, трансфіковані 10 мкг кожної з 2 мРНК, що кодують обидві половини TALE-нуклеаз, спрямованих на ген CD52 (CD52\_T02-L і -R TALEN (SEQ ID NO:55 і 56), послідовність-мішень CD52\_T02 SEQ ID NO:40).

Через 3 і 7 днів після трансфекції геномну ДНК виділяли з трансфікованих клітин і проводили ПЛР для специфічних локусів з використанням праймерів, описаних вище. Продукти ПЛР секвенували за допомогою системи секвенування 454 (454 Life Sciences). Одержували приблизно 10000 послідовностей на продукт ПЛР і потім аналізували на наявність подій сайт-специфічної вставки або делеції; результати наведені в таблиці 4.

Таблиця 4

Процент направлено мутагенезу в ендогенних сайтах-мішенях TALE-нуклеази в первинних Т-лімфоцитах

Мішень	% вставок/делецій на 3 день при трансфекції TALE-нуклеази GR	% вставок/делецій на 7 день при трансфекції TALE-нуклеази GR	% вставок/делецій на 3 день при контрольній трансфекції TALE-нуклеази CD52
GRex2	26,2	30,7	0,7
GRex3T2	1,09	0,86	0,02
GRex3T4	6,3	6,93	0
GRex5T1	0,04	0,035	0,05
GRex5T2	1,3	1,0	0,22
GRex5T3	17,4	на	0,41

Приклад 2: TALE-нуклеази, що розщеплюють ген CD52 людини, константний ланцюг Т-клітинного рецептор-альфа людини (TRAC) і константні ланцюги 1 і 2 Т-клітинного рецептор-бета людини (TRBC)

Як описано в прикладі 1, розроблені й отримані гетеродимерні TALE-нуклеази, спрямовані, відповідно, на гени CD52, TRAC і TRBC. Геномні послідовності-мішені складаються з двох послідовностей з 17 п.о. у довжину (які називаються половинами мішеней), розділених спейсером з 11 або 15 п.о. Кожна половина мішені розпізнається за допомогою повторів половин TALE-нуклеаз, перерахованих у таблиці 5. Геном людини містить два бета-ланцюги функціонального Т-клітинного рецептора (TRBC1 і TRBC2). У ході розробки альфа/бета Т-лімфоцитів у кожній клітині вибирають один з цих двох константних ланцюгів для здійснення сплайсингу з варіабельною областю TCR-бета й утворення функціонального повнорозмірного бета-ланцюга. У консервативних послідовностях вибрані 2 мішені TRBC між TRBC1 і TRBC2, так що відповідна TALE-нуклеаза зможе розщеплювати як TRBC1, так і TRBC2 у той же самий час.

Таблиця 5

Опис TALE-нуклеаз CD52, TRAC і TRBC і послідовностей сайтів-мішеней TALE-нуклеаз у відповідних генах людини

Мішень	Послідовність мішені	Послідовність повтору	Половина TALE-нуклеази
TRAC_T01	TTGTCCCACAGATATCC Agaaccctgaccctg CCGTGTACCAGCTGAGA (SEQ ID NO:37)	Повтор TRAC_T01-L (SEQ ID NO:41)	TRAC-T01-L TALEN (SEQ ID NO:49)
		Повтор TRAC_T01-R (SEQ ID NO:42)	TRAC-T01-R TALEN (SEQ ID NO:50)

Мішень	Послідовність мішені	Послідовність повтору	Половина TALE-нуклеази
TRBC_T01	TGTGTTTGAGCCATCAG aagcagagatctccc ACACCCAAAAGGCCACA (SEQ ID NO:38)	Повтор TRBC_T01-L (SEQ ID NO:43)	TRBC-T01-L TALEN (SEQ ID NO:51)
		Повтор TRBC_T01-R (SEQ ID NO:44)	TRBC-T01-R TALEN (SEQ ID NO:52)
TRBC_T02	TTCCACCCGAGGTCGC Tgtgttgagccatca GAAGCAGAGATCTCCCA (SEQ ID NO:39)	Повтор TRBC_T02-L (SEQ ID NO:45)	TRBC-T02-L TALEN (SEQ ID NO:53)
		Повтор TRBC-T02-R (SEQ ID NO:46)	TRBC-T02-R TALEN (SEQ ID NO:54)
CD52T02	TTCCTCCTACTCACCAT Cagcctcctggttat GGTACAGGTAAGAGCAA (SEQ ID NO:40)	Повтор CD52-T02-L (SEQ ID NO:47)	CD52-T02-L TALEN (SEQ ID NO:55)
		Повтор CD52-T02-R (SEQ ID NO:48)	CD52-T02-R TALEN (SEQ ID NO:56)

Створені інші послідовності-мішені в генах TRAC і CD52, які відбиті в таблиці 6.

Таблиця 6

## Додаткові послідовності-мішені для TALE-нуклеаз TRAC і CD52

Мішень	Послідовність-мішень
TRAC_T02	TTTAGAAAGTTCCTGTG atgtcaagctggtcg AGAAAAGCTTTGAAACA (SEQ ID NO:57)
TRAC_T03	TCCAGTGACAAGTCTGT Ctgctattcaccga TTTTGATTCTCAAACAA (SEQ ID NO:58)
TRAC_T04	TATATCACAGACAAAAC Tgtgctagacatgag GTCTATGGACTTCAAGA (SEQ ID NO:59)
TRAC_T05	TGAGGTCTATGGACTTC Aagagcaacagtgtg GTGGCCTGGAGCAACAA (SEQ ID NO:60)
CD52_T01	TTCCTCTTCCTCCTAC Caccatcagcctcct TTACCTGTACCATAAC (SEQ ID NO:61)
CD52T04	TTCCTCCTACTCACCA Cagcctcctgg TCTTACCTGTACCATA (SEQ ID NO:62)
CD52T05	TCCTACTCACCATCAG Ctcctggttat TTGCTCTTACCTGTAC (SEQ ID NO:63)
CD52_T06	TTATCCCACTTCTCCT Ctacagatacaaact TTTTGTCCTGAGAGTC (SEQ ID NO:64)

Мішень	Послідовність-мішень
CD52_T07	TGGACTCTCAGGACAA acgacaccagccaaa TGCTGAGGGGCTGCTG (SEQ ID NO:65)

Активність CD52-TALE-нуклеази, TRAC-TALE-нуклеази і TRBC-TALE-нуклеази в клітинах HEK293

5 Кожен конструкт TALE-нуклеази субклонували з використанням гідролізу ферментами рестрикції в експресійний вектор ссавців під контролем довгого промотору рEF1-альфа. Один мільйон клітин HEK293 висівали за один день до трансфекції. Клітини котрансфікували 2,5 мкг кожної з двох плазмід, що кодують TALE-нуклеази, які розпізнають дві половини мішеней у

10 геномній послідовності, що представляє інтерес, у гені CD52, константній області альфа-ланцюга Т-клітинного рецептора (TRAC) або константній області бета-ланцюга Т-клітинного рецептора (TRBC), під контролем промотору EF1-альфа, або 5 мкг контрольного вектора рUC (рCLS0003) з використанням 25 мкл ліпофектаміну (Invitrogen) відповідно до інструкцій виробника. Дволанцюговий розрив, який викликається TALE-нуклеазами в кодуючих

15 послідовностях CD52 або TRAC, репарується в живих клітинах негомологічним з'єднанням кінців (NHEJ), що є механізмом створення помилок. Активність TALE-нуклеаз у живих клітинах вимірюють по частоті вставок або делецій у геномному локусі-мішені. Через 48 годин після трансфекції з трансфікованих клітин виділяли геномну ДНК, і проводили специфічні для локусу ПЛР із використанням наступних праймерів: 5'-CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG (пряма адапторна послідовність) - 10N (TAG)-локус специфічної прямої послідовності для

20 CD52:5'-CAGATCTGCAGAAAGGAAGC-3' (SEQ ID NO:66), для TRAC: 5'-ATCACTGGCATCTGGACTCCA-3' (SEQ ID NO:67), для TRBC1:5'-AGAGCCCCCTACCAGAACCAGAC-3' (SEQ ID NO:68) або для TRBC2:5'-GGACCTAGTAACATAATTGTGC-3' (SEQ ID NO:69), і зворотний праймер 5'-CCTATCCCCTGTGTGCCTTGGCAGTCTCAG (зворотна адаптерна послідовність) - ендегенний

25 локус специфічної зворотної послідовності для CD52:5'-CCTGTTGGAGTCCATCTGCTG-3' (SEQ ID NO:70), для TRAC: 5'-CCTCATGTCTAGCACAGTTT-3' (SEQ ID NO:71), для TRBC1 і TRBC2:5'-ACCAGCTCAGCTCCACGTGGT-3' (SEQ ID NO:72). ПЛР-продукти секвенували за допомогою системи секвенування 454 (454 Life Sciences). Одержували приблизно 10000 послідовностей на продукт ПЛР і потім аналізували на наявність подій сайт-специфічної вставки або делеції;

30 результати наведені в таблиці 7.

Таблиця 7

Проценти вставок/делецій для TALE-нуклеази, направленої на мішені CD52\_T02, TRAC\_T01, TRBC\_T01 і TRBC\_T02

Мішень	% вставок/делецій при трансфекції TALE-нуклеази	% вставок/делецій при трансфекції контрольної рUC
CD52_T02	28,0	0,9
TRAC_T01	41,9	0,3
TRBC_T01 в константному ланцюгу 1	3,81	0
TRBC_T01 в константному ланцюгу 2	2,59	0
TRBC_T02 в константному ланцюгу 1	14,7	0
TRBC_T02 в константному ланцюгу 2	5,99	0

Активність CD52-TALE-нуклеази, TRBC-TALE-нуклеази і TRAC-TALE-нуклеази в первинних Т-лімфоцитах

35 Кожен конструкт TALE-нуклеази субклонували з використанням гідролізу ферментами рестрикції в експресійний вектор під контролем промотору T7.

мПНК, що кодує TALE-нуклеазу, яка розщеплює геномні послідовності CD52, TRAC і TRBC, синтезували з плазміди, яка несе кодуючі послідовності нижче промотору T7. Т-лімфоцити, виділені з периферичної крові, активували протягом 5 днів з використанням активаторних

40 кульок проти CD3/CD28 (Life Technologies), і 5 мільйонів клітин трансфікували шляхом електропорації 10 мкг кожної з 2 мПНК, що кодують обидві половини TALE-нуклеази (або що

некодують РНК як контролі), з використанням приладу CytoLVT-P. Як наслідок вставок і делецій, індукованих NHEJ, кодуюча послідовність CD52 і/або TRAC буде знаходитися поза рамкою у фракції клітин, що в результаті веде до нефункціонуючих генів. Через 5 днів після електропорації клітини мітили антитілом проти CD52 або проти TCR, кон'югованим із флуорохромом, для визначення присутності CD52 або TCR на їхній клітинній поверхні за допомогою протокової цитометрії. Оскільки всі Т-лімфоцити, що здійснили експансію з периферичної крові, звичайно експресують CD52 і TCR, частка CD52-негативних або TCR-негативних клітин є прямим показником активності TALE-нуклеази. У таблиці 8 приведені результати ілюстративного експерименту. У таблиці 9 показані результати ілюстративного експерименту по тестуванню ефективності TALE-нуклеаз TRBC.

Таблиця 8

Процентний вміст CD52-негативних, TCR-негативних і CD52/TCR-подвійних негативних Т-лімфоцитів після трансфекції відповідних полінуклеотидів, які експресують TALE-нуклеази

Трансфіковані ARN	% CD52-негативних клітин	% TCR-негативних клітин	% CD52/TCR-подвійних негативних клітин
Некодуюча РНК	1,21	1,531	0,111
TALEN CD52_T02	49,2	1,6	0,78
TALEN TRAC_T01	2,16	44,8	0,97
TALEN CD52_T02+TALEN TRAC_T01	29,3	39,6	15,5

Таблиця 9

Процентний вміст TCR-негативних Т-лімфоцитів після трансфекції полінуклеотидів, які експресують TALE-нуклеази TRBC

Трансфіковані ARN	% TCR-негативних клітин
Немає РНК	1,22
TALEN TRAC_T01	6,52
TALEN CD52_T02	23,5

Функціональний аналіз Т-клітин зі спрямованою інактивацією гена CD52

Ціль інактивації гена CD52 полягає в додаванні Т-лімфоцитам стійкості до імуносупресії, опосередкованої антитілом проти CD52. Як описано в попередньому абзаці, Т-лімфоцити трансфікували мРНК, що кодує TALE-нуклеазу, що розщеплює CD52. Через 7 днів після трансфекції клітини обробляли 50 мкг/мл моноклональним антитілом проти CD52 (або IgG щура як контроль) з або без 30 % кролячого комплекменту (Cedarlane). Після 2 годин інкубації при 37°C клітини мітили антитілом проти CD52, кон'югованим із флуорохромом, разом із флуоресцентним барвником на життєздатність (eBioscience) і аналізували за допомогою протокової цитометрії для вимірювання частоти зустрічальності CD52-позитивних і CD52-негативних клітин серед живих клітин. На фіг. 6 показаний результат ілюстративного експерименту, який демонструє, що CD52-негативні клітини повністю стійкі до опосередкованої комплекментом токсичності антитіла проти CD52.

Функціональний аналіз Т-клітин зі спрямованою інактивацією гена TRAC

Ціль інактивації гена TRAC полягає в додаванні Т-лімфоцитам відсутності реакції на стимуляцію Т-клітинних рецепторів. Як описано в попередньому абзаці, Т-лімфоцити були трансфіковані мРНК, що кодує TALE-нуклеазу, що розщеплює TRAC або CD52. Через 16 днів після трансфекції клітини обробляли до 5 мкг/мл фітогеммаглютиніном (PHA, Sigma-Aldrich), Т-клітинним мітогеном, що діє через Т-клітинний рецептор. Клітини з функціонуючим Т-клітинним рецептором повинні збільшуватися в розмірах після обробки PHA. Після трьох днів інкубації клітини мітили антитілом проти CD52 або проти TCR, кон'югованим із флуорохромом, і аналізували за допомогою протокової цитометрії для порівняння розподілу розмірів клітин між TCR-позитивними і TCR-негативними клітинами, або між CD52-позитивними і CD52-негативними клітинами. На фіг. 7 показано, що TCR-позитивні клітини значно збільшені в розмірах після обробки PHA, тоді як TCR-негативні клітини мають той же розмір, що і необроблені клітини, указуючи на те, що інактивація TRAC викликає в них відсутність реакції на

сигналізацію TCR. На відміну від цього CD52-позитивні і CD52-негативні клітини збільшуються в розмірах в однаковому ступені.

Функціональний аналіз Т-клітин зі спрямованою інактивацією генів CD52 і TRAC

Для підтвердження того, що конструювання генома не впливає на здатність Т-клітин виявляти протипухлинну активність при їхньому наданні з химерним рецептором антигену (CAR), автори трансфікували Т-клітини, у яких направлено діяли CD52-TALE-нуклеаза і TRAC-TALE-нуклеаза, 10 мкг РНК, що кодує CAR проти CD19 (SEQ ID NO:73). Через 24 години Т-клітини інкубували протягом 4 годин із клітинами Daudi, які експресують CD19. Позитивну регуляцію CD107a клітинної поверхні, маркера вивільнення цитотоксичних гранул Т-лімфоцитами (що називається дегрануляцією), вимірювали аналізом за допомогою протокової цитометрії (Betts, Brenchley et al., 2003). Результати включені у фіг. 8 і показують, що CD52-негативні/TCR $\alpha\beta$ -негативні клітини і CD52-позитивні/TCR $\alpha\beta$ -позитивні клітини мають однакову здатність до дегрануляції у відповідь на PMA/іономіцин (позитивний контроль) або CD-19+ клітини Daudi. Позитивна регуляція CD-107 залежить від присутності CD19+. Ці дані свідчать про те, що конструювання генома не чинить негативного впливу на здатність Т-клітин підтримувати контрольовану протипухлинну відповідь.

Геномна безпека CD52-TALE-нуклеази і TRAC-TALE-нуклеази в первинних Т-лімфоцитах

Оскільки конструкти авторів включають субодиноці нуклеаз, важливим питанням є питання про те, чи може множинна трансфекція TALE-нуклеаз вести до генотоксичності і розщеплення поза мішенню "близькоспоріднених" послідовностей-мішеней або до неправильного спарювання половин TALE-нуклеаз. Для оцінки впливу TALE-нуклеази і CD52-TALE-нуклеази на цілісність клітинних геномів, автори склали перелік послідовностей у геномі людини, у яких потенційно можливе розщеплення поза мішенню. Щоб створити цей список, автори визначили всі послідовності в геномі зі замінами до 4 у порівнянні з вихідними половинами мішеней і потім ідентифікували пари потенційних половин мішеней при орієнтації голова до голови зі спейсером довжиною 9-30 п.о. одна від одної. Цей аналіз уключав сайти, на які потенційно спрямовані гомодимери молекул однієї половини TALE-нуклеази або гетеродимери, утворені однією половиною CD52-TALE-нуклеази й однією половиною TRAC-TALE-нуклеази. Автори підраховували бали для потенційних сторонніх мішеней на основі даних про специфічність з урахуванням вартості індивідуальних заміни і положення заміни (де помилкове спарювання краще переноситься для основ на 3'-кінці половин мішеней). Автори одержали 173 унікальні послідовності з балами, що відбивають оцінку імовірності розщеплення. Автори вибрали 15 переважних балів і проаналізували за допомогою глибокого секвенування частоту мутацій, що виявляються в цих локусах у Т-клітинах, одночасно трансфікованих CD52- і TRAC-TALE-нуклеазами й очищених за допомогою магнітного розділення на CD52-негативні і TCR $\alpha\beta$ -негативні. Результати представлені на фіг. 9. Найвища частота вставки/делеції становить  $7 \times 10^{-4}$ . Ці результати показують, що ймовірні сторонні мішені піддаються мутаціям з імовірністю щонайменше в 600 разів меншою, ніж призначені мішені. Отже, реагенти, використовувані в даному дослідженні для TALE-нуклеаз, є гранично специфічними.

Приклад 3: TALE-нуклеази, що розщеплюють ген CTLA4 людини і ген PDCD1 людини

Як описано в прикладі 1, створені й отримані гетеродимерні TALE-нуклеази, спрямовані відповідно на гени PDCD1 і CTLA4. Геномні послідовності-мішені складаються з двох послідовностей з 17 п.о. у довжину (які називаються половинами мішеней), розділених спейсером з 11 або 15 п.о. Кожна половина мішені розпізнається повторами половин TALE-нуклеаз, перерахованих у таблиці 10.



Таблиця 10

Опис TALE-нуклеаз CTLA4 і PDCD1 і послідовностей сайтів-мішеней TALE-нуклеаз відповідних генів людини

Мішень	Послідовність мішені	Послідовність повтору	Половина TALE-нуклеази
CTLA4_T01	TGGCCCTGCACTCTCCT Gtttttcttctctt CATCCCTGTCTTCTGCA (SEQ ID NO:74)	Повтор CTLA4_T01-L (SEQ ID NO:79)	CTLA4_T01-L TALEN (SEQ ID NO:89)
		Повтор CTLA4_T01-R (SEQ ID NO:80)	CTLA4_T01-R TALEN (SEQ ID NO:90)
CTLA4T_03	TTTTCCATGCTAGCAAT Gcacgtggcccagcc TGCTGTGGTACTGGCCA (SEQ ID NO:75)	Повтор CTLA4_T03-L (SEQ ID NO:81)	CTLA4_T03-L TALEN (SEQ ID NO:91)
		Повтор CTLA4_T03-R (SEQ ID NO:82)	CTLA4_T03-R TALEN (SEQ ID NO:92)
CTLA4_T04	TCCATGCTAGCAATGCA cgtggcccagcctgc TGTGGTACTGGCCAGCA (SEQ ID NO:76)	Повтор CTLA4_T04-L (SEQ ID NO:84)	CTLA4_T04-L TALEN (SEQ ID NO:93)
		Повтор CTLA4_T04-R (SEQ ID NO:85)	CTLA4_T04-R TALEN (SEQ ID NO:94)
PDCD1_T01	TTCTCCCCAGCCCTGCT Cgtggtgaccgaagg GGACAACGCCACCTTCA (SEQ ID NO:77)	Повтор PDCD1_T01-L (SEQ ID NO:86)	PDCD1_T01-L TALEN (SEQ ID NO:95)
		Повтор PDCD1_T01-R (SEQ ID NO:87)	PDCD1_T01-R TALEN (SEQ ID NO:96)
PDCD1_T03	TACCTCTGTGGGGCCAT Ctccctggcccccac GGCGCAGATCAAAGAGA (SEQ ID NO:78)	Повтор PDCD1_T03-L (SEQ ID NO:88)	PDCD1_T03-L TALEN (SEQ ID NO:97)
		Повтор PDCD1_T03-R (SEQ ID NO:89)	PDCD1_T03-R TALEN (SEQ ID NO:98)

Активність CTLA4-TALE-нуклеази і PDCD1-TALE-нуклеази в клітинах HEK293

- 5 Кожен конструкт TALE-нуклеази субклонують з використанням гідролізу ферментами рестрикції в експресійний вектор ссавців під контролем довгого промотору pEF1-альфа. Один мільйон клітин HEK293 висівають за день до трансфекції. Клітини котрансфікують 2,5 мкг кожної з двох плазмід, що кодують TALE-нуклеази, які розпізнають дві половини мішеней у геномній послідовності, що представляє інтерес, у генах PDCD1 і CTLA-4, під контролем промотору EF1-альфа або 5 мкг контрольного вектора pUC (pCLS0003) за допомогою 25 мкл ліпофектаміну (Invitrogen) відповідно до інструкцій виробника. Розрив двох ланцюгів, який створюється TALE-нуклеазами в кодуючих послідовностях PDCD1 або CTLA-4, репарується в живих клітинах шляхом негомологічного з'єднання кінців (NHEJ), що є механізмом утворення помилок.
- 10 Активність TALE-нуклеаз у живих клітин вимірюється по частоті вставок або делецій у геномному локусі-мішені. Через 48 годин після трансфекції геномну ДНК виділяли з трансфікованих клітин і проводили специфічні для локусу ПЛР із використанням наступних праймерів: 5'-CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCA (пряма адаптерна послідовність) - 10N (TAG)-специфічна для локусу пряма послідовність для CTLA4\_T01:5'-CTCTACTTCCTGAAGACCTG-3' (SEQ ID NO:99), для CTLA4\_T03/T04:5'-ACAGTTGAGAGATGGAGGGG-3' (SEQ ID NO:100), для PDCD1\_T01:5'-CCACAGAGGTAGGTGCCGC-3' (SEQ ID NO:101) або для PDCD1\_T03:5'-GACAGAGATGCCGGTCACCA-3' (SEQ ID NO:102) і зворотний праймер 5'-CCTATCCCCTGTGTGCCTTGGCAGTCTCAG (зворотна адаптерна послідовність) - специфічна для ендogenous локусу зворотна послідовність для CTLA4\_T01:5'-
- 15
- 20

TGGAATACAGAGCCAGCCAA-3' (SEQ ID NO:103), для CTLA4\_T03/T04:5'-GGTGGCCGTGCAGATGGAAT-3' (SEQ ID NO:104), для PDCD1\_T01:5'-GGCTCTGCAGTGGAGGCCAG-3' (SEQ ID NO:105) або для PDCD1\_T03:5'-GGACAACGCCACCTTCACCT-3' (SEQ ID NO:106).

- 5 ПЛР-продукти аналізували шляхом тесту за допомогою T7-ендонуклеази: коротко, після денатурації і повторного відпалу продукту ПЛР, T7-ендонуклеаза буде специфічно гідролізувати неправильно спарену ДНК, що складається з ланцюга дикого типу і мутантного ланцюга. Продукт гідролізу потім розділяли шляхом електрофорезу в поліакриламідному гелі. Присутність продукту гідролізу вказує на послідовності, мутантні в результаті активності TALE-нуклеази. Результати зображені на фіг. 10, де стрілки вказують на гідролізовані продукти ПЛР. Вони демонструють, що TALE-нуклеази PDCD1\_T1, PDCD1\_T3, CTLA4\_T1, CTLA4\_T3 і CTLA4\_T4, усі виявляють мутагенну нуклеазну активність на своїх сайтах-мішенях.

Приклад 4: рТ-альфа індукуює експресію CD3 на поверхні Т-лімфоцитів з інактивованим TCR-альфа

- 15 Опис різних варіантів пре-Т-альфа

Ген рТ-альфа людини кодує трансмембранний глікопротеїд, що включає позаклітинний Ig-подібний домен, гідрофобний трансмембранний домен і великий С-кінцевий цитоплазматичний хвіст. Створені різні варіанти, отримані з глікопротеїду рТ-альфа людини, і вони описані в таблиці 11, і представлені на фіг. 11.

20

Таблиця 11

Опис підгруп конструктів рТ-альфа

Варіанти рТ-альфа	Опис	SEQ ID NO:
рТ-альфа-FL	Повнорозмірний глікопротеїд рТ-альфа людини.	107
рТ-альфа-Δ18	Укорочений глікопротеїд рТ-альфа людини з відсутністю 18 залишків з С-кінця.	108
рТ-альфа-Δ48	Укорочений глікопротеїд рТ-альфа людини з відсутністю 48 залишків з С-кінця.	109
рТ-альфа-Δ62	Укорочений глікопротеїд рТ-альфа людини з відсутністю 62 залишків з С-кінця.	110
рТ-альфа-Δ78	Укорочений глікопротеїд рТ-альфа людини з відсутністю 78 залишків з С-кінця.	111
рТ-альфа-Δ92	Укорочений глікопротеїд рТ-альфа людини з відсутністю 92 залишків з С-кінця.	112
рТ-альфа-Δ110	Укорочений глікопротеїд рТ-альфа людини з відсутністю 110 залишків з С-кінця.	113
рТ-альфа-Δ114	Укорочений глікопротеїд рТ-альфа людини з відсутністю 114 залишків з С-кінця.	114
рТ-альфа-FL-CD28	Повнорозмірний глікопротеїд рТ-альфа людини, з'єднаний на С-кінці з активаторним доменом CD28.	115
рТ-альфа-FL-CD8	Повнорозмірний глікопротеїд рТ-альфа людини, з'єднаний на С-кінці з активаторним доменом CD8.	116
рТ-альфа-FL-4-1BB	Повнорозмірний глікопротеїд рТ-альфа людини, з'єднаний на С-кінці з активаторним доменом 4-1BB.	117
рТ-альфа-Δ48-CD28	рТ-альфа-Δ48 глікопротеїд, з'єднаний на С-кінці з активаторним доменом CD28.	118
рТ-альфа-Δ48-CD8	рТ-альфа-Δ48 глікопротеїд, з'єднаний на С-кінці з активаторним доменом CD8.	119
рТ-альфа-Δ48-CD-4-1BB	рТ-альфа-Δ48 глікопротеїд, з'єднаний на С-кінці з активаторним доменом 4-1BB.	120
рТ-альфа-Δ114/TCRα.IC	рТ-альфа-Δ114 глікопротеїд, з'єднаний на С-кінці з внутриклеточним доменом TCR-альфа.	121
рТ-альфа-EC/TCRα.TM.IC	Позаклітинний домен рТ-альфа, з'єднаний на С-кінці з трансмембранним і внутрішньоклітинним доменами TCR-альфа.	122
рТ-альфа-Δ48-1xMUT	рТ-альфа-Δ48 глікопротеїд з мутантним залишком W46R.	123

Варіанти рТ-альфа	Опис	SEQ ID NO:
рТ-альфа-Δ48-4×MUT	рТ-альфа-Δ48 глікопротеїд з мутантними залишками D22A, K24A, R102A, R117A.	124

Різні протестовані конструкти пре-Т-альфа включають:

1) мутанти рТ-альфа з делеціями: Створені різні делеції у внутрішньоклітинному цитоплазматичному хвості білка рТ-альфа людини (який включає 114 амінокислот) (SEQ ID NO:107). Протестовані конструкти включають повнорозмірний варіант білка (FL) і мутанти, у яких 18, 48, 62, 78, 92, 110 і 114 амінокислот видалені з С-кінця білка (SEQ ID NO:108-SEQ ID NO:114);

2) мутанти рТ-альфа, що містять внутрішньоклітинні активаторні домени: FL і варіанти Δ48 з'єднували на їхньому С-кінці з внутрішньоклітинними активаторними доменами CD8, CD28 або 41BB (SEQ ID NO:115-SEQ ID NO:120);

3) химерні мутанти рТ-альфа/TCRα: В одному з конструктів внутрішньоклітинний домен TCRα (IC) з'єднували з варіантом рТ-альфа, позбавленим хвоста (Δ114) (SEQ ID NO:121). Створювали також другий конструкт, у якому позаклітинний домен рТ-альфа з'єднаний із трансмембранним (TM) і IC доменами TCRα (SEQ ID NO:122);

4) мутанти рТ-альфа з дефектом димеризації: У літературі описані деякі мутації, здатні змінювати здатність комплексу пре-TCR до олігомеризації/димеризації. Ці мутанти, як передбачається, дозволяють експресуватися пре-TCR на поверхні клітини, не викликаючи конститутивної передачі сигналу (як передбачається, індукованої при олігомеризації пре-TCR). Мутації введені у варіант рТ-альфаΔ48 і являють собою:

1×MUT: W46R (SEQ ID NO:123)

4×MUT: D22A, K24A, R102A, R117A (SEQ ID NO:124)

Активність різних конструктів пре-Т-альфа в клітинах Jurkat з інактивованим TRAC

Для того щоб провести скринінг різних варіантів рТ-альфа на їхню здатність відновлювати експресію CD3 на поверхні клітин з інактивованим TCR-альфа, створена клітинна лінія, у якій порушений ген TCR-альфа за допомогою спрямованої дії TALEN на TRAC. Клітини Jurkat (лінію клітин Т-клітинного лейкозу) трансфікували плазмідами, що кодують TALEN, що розщеплює TRAC, з використанням електропорації CytoPulse, і клітини KO (TCRα,β<sup>NEG</sup>; CD3<sup>NEG</sup>) потім очищали шляхом негативної селекції за допомогою CD3-магнітних кульок. Популяцію KO (клітини JKT\_KO×3) збільшували і використовували для скринінгу різних варіантів рТ-альфа. Скринінг проводили шляхом трансфекції одного мільйона клітин JKT\_KO×3 15 мкг плазміди, що кодує різні варіанти рТ-альфа під контролем промотору EF1α, з наступним аналізом методом протокової цитометрії експресії CD3 на клітинній поверхні через 48 годин після трансфекції. На фіг. 12 представлений ілюстративний приклад ефективності трансфекції (%BFP+ клітин) і активності конструктів рТ-альфа FL, Δ18 і Δ48 у клітинах JKT\_KO×3, визначеної на основі % CD3+ клітин за допомогою протокової цитометрії. Результати по різних конструктах згруповані в таблиці 12.

Таблиця 12

Активність різних конструктів рТ-альфа в клітинах Jurkat з інактивованим TCR-альфа. Активність вимірювали аналізом за допомогою протокової цитометрії експресії CD3 на клітинах Jurkat з інактивованим TCR-альфа, трансфікованих різними конструктами пре-Т-альфа

Мутант	ID	% CD3 <sub>низьк.</sub>	SD
0	NEG	4,69	1,53
1	preTCRa-FL	31,18	4,15
2	preTCRa-Δ18	20,13	4,56
3	preTCRa-Δ48	44,86	3,90
4	preTCRa-Δ62	32,42	2,95
5	preTCRa-Δ78	24,75	3,87
6	preTCRa-Δ92	20,63	3,70
7	preTCRa-Δ110	18,18	3,49
8	preTCRa-Δ114	4,29	2,74
9	preTCRa-FL-CD8	18,16	5,30
10	preTCRa-FL-CD28	5,67	2,77

Мутант	ID	% CD3 <sub>низьк.</sub>	SD
11	preTCR $\alpha$ -FL-41BB	27,27	3,66
12	preTCR $\alpha$ - $\Delta$ 48-CD8	11,56	6,01
13	preTCR $\alpha$ - $\Delta$ 48-CD28	12,22	4,72
14	preTCR $\alpha$ - $\Delta$ 48-41BB	35,93	4,55
15	preTCR $\alpha$ - $\Delta$ 114/TCR $\alpha$ .IC	3,94	1,95
16	preTCR $\alpha$ -EC/TCR $\alpha$ .TM.IC	17,80	4,47
17	preTCR $\alpha$ - $\Delta$ 48-1 $\times$ MUT	26,88	4,37
18	preTCR $\alpha$ - $\Delta$ 48-4 $\times$ MUT	7,59	1,06

Активність рТ-альфа-FL і рТ-альфа- $\Delta$ 48 у первинних Т-лімфоцитах з інактивованим TCR-альфа

Для того щоб протестувати здатність варіантів рТ-альфа-FL і рТ-альфа- $\Delta$ 48 індукувати експресію CD3 на поверхні Т-лімфоцитів з інактивованим TCR-альфа, які кодують послідовності рТ-альфа-FL і рТ-альфа- $\Delta$ 48 клонували в лентивірусний вектор pLV-SFFV-BFP-2A-PCTRA, який самоінактивується, що кодує синій флуоресцентний білок (BFP) під промотором SFFV, з наступним саморозщепленням пептиду T2A (фіг. 13).

Т-лімфоцити, виділені з периферичної крові, активували протягом 72 годин з використанням активаторних кульок анти-CD3/CD28 (Life Technologies), і 4,5 мільйони клітин трансфікували шляхом електропорації 10 мкг мРНК, що кодує область константного ланцюга TCR-альфа (TRAC), що є мішенню TALE-нуклеази, з використанням приладу CytolVT-S (BTX-Harvard Harbour). Через два дні після електропорації Т-клітини трансдукували лентивірусними векторами або LV-SFFV-BFP-2A рТ-альфа- $\Delta$ 48, або контрольним LV-SFFV-BFP-2A. Від CD3-негативних Т-клітин і Т-клітин з низьким CD3 потім очищали з використанням магнітних кульок проти CD3 (Miltenyi Biotech). Цей експериментальний протокол представлений на фіг. 14А.

На фіг. 14В представлений аналіз за допомогою протокової цитометрії експресії на клітинній поверхні TCR-альфа/бета, CD3, і експресії BFR на Т-клітинах з інактивованим TCR-альфа (КО), трансдукованих або BFR-2A-рТ-альфа $\Delta$ 48 (КО/ $\Delta$ 48), або контрольним лентивірусним вектором BFP (КО/BFP) до і після очищення кульками проти CD3. Клітини з інактивованим TCR-альфа, трансдуковані вектором BFP-T2A-рТ-альфа- $\Delta$ 48 (BFP+ клітини) демонструють більш високі рівні CD3 у порівнянні з нетрансдукованими клітинами (BFP- клітини). Яких-небудь розходжень не спостерігається серед клітин, трансдукованих контрольним вектором BFR. Ці результати показують, що рТ-альфа опосередковує відновлення експресії CD3 на клітинній поверхні клітин з інактивованим TCR-альфа. На відміну від цього TCR-альфа/бета фарбування залишається, як і очікувалося, без змін у клітинах, трансдукованих або не трансдукованих експресійним вектором рТ-альфа- $\Delta$ 48.

Опосередковувана рТ-альфа експресія CD3 підтримує активацію TCR-дефіцитних Т-клітин

Для визначення здатності рТ-альфа брати участь у трансдукції клітинної активації сигналів експресію ранніх і пізніх маркерів активації аналізували на Т-клітинах з інактивованим TCR-альфа, трансдукованих рТ-альфа- $\Delta$ 48 і рТ-альфа- $\Delta$ 48.41BB. Т-клітини з інактивованим TCR-альфа, трансдуковані рТ-альфа- $\Delta$ 48 і рТ-альфа- $\Delta$ 48.41BB створювали з первинних Т-клітин людини, як описано в попередньому розділі, і на фіг. 14А.

Для виявлення передачі сигналу через CD3 клітини повторно активували з використанням кульок, покритих антитілами анти-CD3/CD28, через 3 дні після очищення Т-клітин з інактивованим TCR-альфа кульками анти-CD3 (фіг. 14А). Клітини забарвлювали антитілом проти CD69 (раннім маркером активації), кон'югованим із флуорохромом, і антитілом проти CD25 (пізнім маркером активації), через 24 і 48 годин після повторної активації, відповідно, і аналізували за допомогою протокової цитометрії (фіг. 15У). Як показано на фіг. 15А-В, клітини з інактивованим TCR-альфа, які експресують рТ-альфа- $\Delta$ 48 (КО/рТ $\alpha$ - $\Delta$ 48) або рТ-альфа- $\Delta$ 48.41BB (КО/рТ $\alpha$ - $\Delta$ 48.BB), демонструють позитивну регуляцію маркерів активації до рівнів, подібних до тих, які спостерігаються в клітинах, які експресують TCR-альфа/бета (NEP: клітини без електропорації).

Іншим показником активації Т-клітин є збільшення розміру клітин, що іноді називають "вибуховим". Здатність комплексів пре-TCR індукувати "вибухи" вимірювали аналізом за допомогою протокової цитометрії розміру клітин через 72 години після повторної активації з використанням кульок анти-CD3/CD28 (фіг. 15С). Стимуляція кульками анти-CD3/CD28 індукувала порівнянне збільшення розміру клітин у клітинах, які експресують комплекси TCR-альфа/бета, і клітинах, які експресують рТ-альфа- $\Delta$ 48 або рТ-альфа- $\Delta$ 48.41BB. Узяті разом, ці результати показують, що комплекси пре-TCR здатні передавати сигнали, що ефективно сполучені з механізмами, які опосередковують активацію позитивної регуляції маркерів.

Опосередковувана рТ-альфа експресія CD3 підтримує експансію TCR-дефіцитних первинних Т-клітин за допомогою стимулюючих антитіл проти CD3/CD28

Щоб оцінити здатність пре-TCR комплексів підтримувати довгострокову клітинну проліферацію, вимірювали проліферацію клітин, сконструйованих, як описано вище. Через 5 десять днів після первинної активації клітини підтримували в середовищі з IL-2 (non-Re-act) або в середовищі з IL-2 з кульками анти-CD3/CD28 (Re-act). При кожному стані клітини підраховували й аналізували за допомогою протокової цитометрії в різні часові точки для оцінки кількості BFP+ клітин. Ріст клітин з інактивованим TCR-альфа (KO), трансдукованих векторами BFR або BFR-T2A-пре-TCR $\alpha$ - $\Delta$ 48, порівнювали й оцінювали кратність індукції цих клітин відносно величини, отриманої на 2 день після реактивації. На фіг. 16 показані результати, отримані від двох незалежних донорів. В обох випадках клітини з інактивованим TCR-альфа, які експресують рТ-альфа- $\Delta$ 48, характеризуються більш високою експансією, ніж клітини з інактивованим TCR-альфа, які експресують тільки контрольний вектор BFP. У другого донора 10 включно також клітини з інактивованим TCR-альфа, які експресують рТ-альфа- $\Delta$ 48.41BB або 15 повнорозмірний рТ-альфа, які також характеризуються більш високою експансією, ніж клітини з інактивованим TCR-альфа, які експресують тільки контрольний вектор BFP.

Приклад 5: Оптимізація трансфекції мРНК у Т-клітини з використанням методу Cytopulse

Визначення оптимізованої програми cytopulse

Першу серію експериментів проводили на неактивованих PBMC, щоб визначити діапазон 20 напруги, при якій клітини можуть бути трансфіковані. Протестовано п'ять різних програм, як описано в таблиці 13.

Таблиця 13

Різні програми cytopulse, які використовуються для визначення мінімальної напруги, необхідної для електропорації в Т-клітини, які походять з PBMC

Програма cytopulse	Група 1				Група 2				Група 3			
	Ім-пульс	В	Тривалість (мсек)	Інтервал (мсек)	Ім-пульс	В	Тривалість (мсек)	Інтервал (мсек)	Ім-пульс	В	Тривалість (мсек)	Інтервал (мсек)
1	1	600	0,1	0,2	1	600	0,1	100	4	130	0,2	2
2	1	900	0,1	0,2	1	900	0,1	100	4	130	0,2	2
3	1	1200	0,1	0,2	1	1200	0,1	100	4	130	0,2	2
4	1	1200	0,1	10	1	900	0,1	100	4	130	0,2	2
5	1	900	0,1	20	1	600	0,1	100	4	130	0,2	2

3 або 6 мільйонів клітин піддавали електропорації в кюветах із щільною 0,4 см (30 або 25  $15 \times 10^6$  клітин/мл) 20 мкг плазмідями, що кодують GFP, і контрольними плазмідями рUC з використанням різних програм Cytopulse. Через 24 години після електропорації аналізували експресію GFP у електропорованих клітинах методом протокової цитометрії для визначення ефективності трансфекції. Дані, представлені на фіг. 17, показують мінімальну напругу, необхідну для електропорації плазмід у Т-клітини, які походять від PBMC. Ці результати 30 показують, що програми 3 і 4 cytopulse дозволяють здійснити ефективну трансформацію Т-клітин (EP#3 і #4).

Електропорація мРНК в активовані очищені Т-клітини

Після визначення кращої програми cytopulse, що дозволяє ефективно проводити електропорацію ДНК у Т-клітини, автори перевірили, чи буде цей метод застосовний до 35 електропорації мРНК.

$5 \times 10^6$  очищених Т-клітин, попередньо активованих 6 днів PHA/IL-2, ресуспендували в буфері Т для цитопорації (прилад BTX-Harvard) і електропорували в кюветах із щільною 0,4 см 10 мкг мРНК, що кодує GFP, або 20 мкг плазмідями, що кодують GFP або рUC, з використанням кращої програми cytopulse, як визначено в попередньому розділі (таблиця 14).

40

Таблиця 14

Програма cytopulse, яка використовується для електропорації очищених Т-клітин

Програма cytopulse	Група 1				Група 2				Група 3			
	Ім-пульс	В	Тривалість (мсек)	Інтервал (мсек)	Ім-пульс	В	Тривалість (мсек)	Інтервал (мсек)	Ім-пульс	В	Тривалість (мсек)	Інтервал (мсек)
3	1	200	0,1	0,2	1	1200	0,1	100	4	130	0,2	2

Через 48 годин після трансфекції клітини забарвлювали барвником на життєздатність (eFluor-450), і життєздатність клітин і % життєздатних GFP+ клітин визначали шляхом аналізу за допомогою протокової цитометрії (фіг. 18).

Дані, представлені на фіг. 18, указують на те, що електропорація РНК при оптимальних умовах, визначених у даному описі, є нетоксичною і дає можливість трансфікувати більше 95 % життєздатних клітин.

Сумарно весь набір даних показує, що Т-клітини можуть бути ефективно трансфіковані або ДНК, або РНК. Зокрема, трансфекція РНК не впливає на життєздатність клітин і дозволяє досягти однакових рівнів експресії трансфікованого гена, що представляє інтерес, у клітинній популяції.

Ефективна трансфекція може бути досягнута в ранній термін після активації клітин, незалежно від використовуваного способу активації, (РНА/ІЛ-2 або кульки, покриті CD3/CD28). Автори мали досягнення в трансфекції клітин через 72 годин після активації з ефективністю >95 %. Крім того, може бути також оцінена ефективність трансфекції Т-клітин після відморожування й активації з використанням того ж протоколу електропорації.

Електропорація мРНК у первинні Т-клітини людини для функціональної експресії TALE-нуклеази

Після демонстрації того, що електропорація мРНК дає можливість ефективної експресії GFP у первинних Т-клітинах людини, автори протестували, чи буде цей метод застосовний до експресії інших білків, що представляють інтерес. Нуклеази, що включають ефектор, подібний до активатора транскрипції (TALE-нуклеази), являють собою сайт-специфічні нуклеази, створені в результаті з'єднання ДНК-зв'язувального домену TAL з доменом, що розщеплює ДНК. Вони є потужними інструментами редагування генома, оскільки вони викликають дволанцюгові розриви практично будь-якої бажаної послідовності ДНК. Ці дволанцюгові розриви активують негомологічне з'єднання кінців (NHEJ), механізм репарації ДНК, що включає помилки, що потенційно приводить до інактивації будь-якого бажаного гена, що представляє інтерес. Альтернативно, якщо в той же час у клітини ввести адекватну матрицю репарації, індуковані TALE-нуклеазою розриви ДНК, можуть бути репаровані шляхом гомологічної рекомбінації, що, отже, дає можливість модифікації послідовності гена за бажанням.

Автори використовували електропорацію мРНК для експресії TALE-нуклеази, створеної для специфічного розщеплення послідовності гена людини, що кодує альфа-ланцюг Т-клітинного рецептора антигену (TRAC). Мутації, індуковані в цій послідовності, як очікується, приводять до інактивації гена і втрати комплексу TCRαβ із клітинної поверхні. РНК TALE-нуклеази TRAC або некодуючу РНК як контроль трансфікували в активовані первинні Т-лімфоцити людини з використанням методу Cytopulse. Послідовність здійснення електропорації полягала в 2 імпульсах по 1200 В з наступними чотирма імпульсами по 130 В, як описано в таблиці 14.

Аналізуючи за допомогою протокової цитометрії експресію TCR на клітинній поверхні через 7 днів після електропорації (фіг. 19, верхня панель), автори знайшли, що 44 % Т-клітин втратило експресію TCRαβ. Автори проаналізували геномну ДНК трансфікованих клітин за допомогою ПЛР-ампліфікації локусу TRAC з наступним високопродуктивним секвенуванням у системі 454. 33 % секвенованих алелів (727 з 2153) містило вставку або делецію в сайті розщеплення TALE-нуклеазою. На фіг. 19 (нижня панель) показані приклади мутантних алелів.

Ці дані вказують на те, що електропорація мРНК із використанням методу cytopulse веде до функціональної експресії TALE-нуклеази TRAC.

Електропорації Т-клітин моноцистронної мРНК, що кодує одоланцюговий химерний рецептор антигену (CAR) проти CD-19

$5 \times 10^6$  Т-клітин попередньо активували протягом декількох (3-5) днів кульками, покритими антитілами анти-CD3/CD28, і ІЛ2, і ресуспендували в буфері Т для цитопорації і піддавали

електропорації в кюветах із щільною 0,4 см без мРНК або з 10 мкг мРНК, що кодує одноланцюговий CAR (SEQ ID NO:73), використовуючи програму, описану в таблиці 14.

Через 24 години після електропорації клітини забарвлювали фіксованим барвником eFluor-780 на життєздатність клітин і F(ab')<sub>2</sub> фрагментом РЕ-кон'югованого козячого антитіла проти IgG миші, специфічним для оцінки експресії CAR на клітинній поверхні живих клітин. Дані, представлені на фіг. 20, указують на те, що більшість живих Т-клітин, електропорованих моноцистронною мРНК, описаною вище, експресують CAR на своїй поверхні. Через 24 години після електропорації Т-клітини культивували разом із клітинами Daudi (CD19<sup>+</sup>) протягом 6 годин і аналізували за допомогою протокової цитометрії для виявлення експресії маркера дегрануляції CD107a на їхній поверхні (Betts, Brenchley et al. 2003).

Дані, представлені на фіг. 20, указують на те, що в більшості клітин, електропорованих моноцистронною мРНК, описаною вище, здійснюється дегрануляція в присутності клітин-мішеней, які експресують CD19. Ці результати зрозуміло показують, що CAR, експресований на поверхні електропорованих Т-клітин, є активним.

Електропорація Т-клітин поліцистронної мРНК, що кодує мультисубодиничний химерний рецептор антигену (CAR) проти CD 19

5×10<sup>6</sup> Т-клітин попередньо активували протягом декількох (3-5) днів кульками, покритими антитілами анти-CD3/CD28, і IL2, і електропорували в буфері Т для цитопорації в кюветах із щільною 0,4 см без мРНК або з 45 мкг мРНК, що кодує мультиланцюговий CAR (SEQ ID NO:125, кодована SEQ ID NO:126, фіг. 21A і фіг. 4B (csm4)) за допомогою програми, описаної в таблиці 14.

Через 24 години після електропорації клітини забарвлювали фіксованим барвником eFluor-780 на життєздатність клітин і F(ab')<sub>2</sub> фрагментом РЕ-кон'югованого козячого антитіла проти IgG миші, специфічним для оцінки експресії CAR на клітинній поверхні живих клітин. Дані, представлені на фіг. 21, указують на те, що більшість живих Т-клітин, електропорованих моноцистронною мРНК, описаною вище, експресують CAR на своїй поверхні.

Через 24 години після електропорації Т-клітини культивували разом із клітинами Daudi (CD19<sup>+</sup>) протягом 6 годин і аналізували за допомогою протокової цитометрії для виявлення експресії маркера дегрануляції CD107a на їхній поверхні. Дані, представлені на фіг. 21, указують на те, що в більшості клітин, електропорованих моноцистронною мРНК, описаною вище, здійснюється дегрануляція в присутності клітин-мішеней, які експресують CD19. Ці результати зрозуміло показують, що CAR, експресований на поверхні електропорованих Т-клітин, є активним.

#### Список цитованих посилань

Arimondo, P. B., C. J. Thomas, et al. (2006). "Exploring the cellular activity of camptothecin-triple-helix-forming oligonucleotide conjugates." *Mol Cell Biol* 26(1): 324-33.

Arnould, S., P. Chames, et al. (2006). "Engineering of large numbers of highly specific homing endonucleases that induce recombination on novel DNA targets." *J Mol Biol* 355(3): 443-58.

Ashwell, J. D. and R. D. Klusner (1990). "Genetic and mutational analysis of the T-cell antigen receptor." *Annu Rev Immunol* 8: 139-67.

Betts, M. R., J. M. Brenchley, et al. (2003). "Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8<sup>+</sup>T cells by a flow cytometric assay for degranulation." *J Immunol Methods* 281(1-2): 65-78.

Boch, J., H. Scholze, et al. (2009). "Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors." *Science* 326(5959): 1509-12.

Boni, A., P. Muranski, et al. (2008). "Adoptive transfer of allogeneic tumor-specific T cells mediates effective regression of large tumors across major histocompatibility barriers." *Blood* 112(12): 4746-54.

Cambier, J. C. (1995). "Antigen and Fc receptor signaling. The awesome power of the immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM)." *J Immunol* 155(7): 3281-5.

Carrasco, Y. R., A. R. Ramiro, et al. (2001). "An endoplasmic reticulum retention function for the cytoplasmic tail of the human pre-T cell receptor (TCR) alpha chain: potential role in the regulation of cell surface pre-TCR expression levels." *J Exp Med* 193(9): 1045-58.

Cermak, T., E. L. Doyle, et al. (2011). "Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting." *Nucleic Acids Res* 39(12): e82.

Chames, P., J. C. Epinat, et al. (2005). "In vivo selection of engineered homing endonucleases using double-strand break induced homologous recombination." *Nucleic Acids Res* 33(20): e178.

Choulifa, A., A. Perrin, et al. (1995). "Induction of homologous recombination in mammalian chromosomes by using the I-SceI system of *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol Cell Biol* 15(4): 1968-73.

Christian, M., T. Cermak, et al. (2010). "Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases." *Genetics* 186(2): 757-61.

Coutinho, A. E. and K. E. Chapman (2011). "The anti-inflammatory and immunosuppressive effects of glucocorticoids, recent developments and mechanistic insights." *Mol Cell Endocrinol* 335(1): 2-13.

5 Critchlow, S. E. and S. P. Jackson (1998). "DNA end-joining: from yeast to man." *Trends Biochem Sci* 23(10): 394-8.

Deng, D., C. Yan, et al. (2012). "Structural basis for sequence-specific recognition of DNA by TAL effectors." *Science* 335(6069): 720-3.

Eisenschmidt, K., T. Lanio, et al. (2005). "Developing a programmed restriction endonuclease for highly specific DNA cleavage." *Nucleic Acids Res* 33(22): 7039-47.

10 Epinat, J. C, S. Arnould, et al. (2003). "A novel engineered meganuclease induces homologous recombination in yeast and mammalian cells." *Nucleic Acids Res* 31(11): 2952-62.

Geissler, R, H. Scholze, et al. (2011). "Transcriptional activators of human genes with programmable DNA-specificity." *PLoS One* 6(5): e19509.

15 Howard, F. D., H. R. Rodewald, et al. (1990). "CD3 zeta subunit can substitute for the gamma subunit of Fc epsilon receptor type I in assembly and functional expression of the high-affinity IgE receptor: evidence for interreceptor complementation." *Proc Natl Acad Sci USA* 87(18): 7015-9.

Huang, P., A. Xiao, et al. (2011). "Heritable gene targeting in zebrafish using customized TALENs." *Nat Biotechnol* 29(8): 699-700.

20 Jena, B., G. Dotti, et al. (2010). "Redirecting T-cell specificity by introducing a tumor-specific chimeric antigen receptor." *Blood* 116(7): 1035-44.

Kalish, J. M. and P. M. Glazer (2005). "Targeted genome modification via triple helix formation." *Ann N Y Acad Sci* 1058: 151-61.

Li, L., M. J. Piatek, et al. (2012). "Rapid and highly efficient construction of TALE-based transcriptional regulators and nucleases for genome modification." *Plant Mol Biol* 78(4-5): 407-16.

25 Li, T., S. Huang, et al. (2011). "TAL nucleases (TALNs): hybrid proteins composed of TAL effectors and FokI DNA-cleavage domain." *Nucleic Acids Res* 39(1): 359-72.

Li, T., S. Huang, et al. (2011). "Modularly assembled designer TAL effector nucleases for targeted gene knockout and gene replacement in eukaryotes." *Nucleic Acids Res* 39(14): 6315-25.

30 Ma, J. L., E. M. Kim, et al. (2003). "Yeast Mre11 and Rad51 proteins define a Ku-independent mechanism to repair double-strand breaks lacking overlapping end sequences." *Mol Cell Biol* 23(23): 8820-8.

Mahfouz, M. M., L. Li, et al. (2012). "Targeted transcriptional repression using a chimeric TALE-SRDX repressor protein." *Plant Mol Biol* 78(3): 311-21.

35 Mahfouz, M. M., L. Li, et al. (2011). "De novo-engineered transcription activator-like effector (TALE) hybrid nuclease with novel DNA binding specificity creates double-strand breaks." *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(6): 2623-8.

Mak, A. N., P. Bradley, et al. (2012). "The crystal structure of TAL effector PthXol bound to its DNA target." *Science* 335(6069): 716-9.

40 Metzger, H., G. Alcaraz, et al. (1986). "The receptor with high affinity for immunoglobulin E." *Annu Rev Immunol* 4: 419-70.

Miller, J. C, S. Tan, et al. (2011). "A TALE nuclease architecture for efficient genome editing." *Nat Biotechnol* 29(2): 143-8.

45 Morbitzer, R., P. Romer, et al. (2011). "Regulation of selected genome loci using de novo-engineered transcription activator-like effector (TALE)-type transcription factors." *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(50): 21617-22.

Moscou, M. J. and A. J. Bogdanove (2009). "A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors." *Science* 326(5959): 1501.

Mussolino, C, R. Morbitzer, et al. (2011). "A novel TALE nuclease scaffold enables high genome editing activity in combination with low toxicity." *Nucleic Acids Res* 39(21): 9283-93.

50 Pang, S. S., R. Berry, et al. (2010). "The structural basis for autonomous dimerization of the pre-T-cell antigen receptor." *Nature* 467(7317): 844-8.

Paques, F. and P. Duchateau (2007). "Meganucleases and DNA double-strand break-induced recombination: perspectives for gene therapy." *Curr Gene Ther* 7(1): 49-66.

55 Pardoll, D. M. (2012). "Immunology beats cancer: a blueprint for successful translation." *Nat Immunol* 13(12): 1129-32.

Park, T. S., S. A. Rosenberg, et al. (2011). "Treating cancer with genetically engineered T cells." *Trends Biotechnol* 29(11): 550-7.

Pingoud, A. and G. H. Silva (2007). "Precision genome surgery." *Nat Biotechnol* 25(7): 743-4.

60 Porteus, M. H. and D. Carroll (2005). "Gene targeting using zinc finger nucleases." *Nat Biotechnol* 23(8): 967-73.



- Rouet, P., F. Smih, et al. (1994). "Introduction of double-strand breaks into the genome of mouse cells by expression of a rare-cutting endonuclease." *Mol Cell Biol* 14(12): 8096-106.
- Saint-Ruf, C, O. Lechner, et al. (1998). "Genomic structure of the human pre-T cell receptor alpha chain and expression of two mRNA isoforms." *Eur J Immunol* 28(11): 3824-31.
- 5 Sander, J. D., L. Cade, et al. (2011). "Targeted gene disruption in somatic zebrafish cells using engineered TALENs." *Nat Biotechnol* 29(8): 697-8.
- Smith, J., S. Grizot, et al. (2006). "A combinatorial approach to create artificial homing endonucleases cleaving chosen sequences." *Nucleic Acids Res* 34(22): e149.
- 10 Stoddard, B. L. (2005). "Homing endonuclease structure and function." *Q Rev Biophys* 38(1): 49-95.
- Tesson, L., C. Usal, et al. (2011). "Knockout rats generated by embryo microinjection of TALENs." *Nat Biotechnol* 29(8): 695-6.
- von Boehmer, H. (2005). "Unique features of the pre-T-cell receptor alpha-chain: not just a surrogate." *Nat Rev Immunol* 5(7): 571-7.
- 15 Waldmann, H. and G. Hale (2005). "CAMPATH: from concept to clinic." *Philos Trans R Soc LondBBiol Sci* 360(1461): 1707-11.
- Weber, E., R. Gruetzner, et al. (2011). "Assembly of designer TAL effectors by Golden Gate cloning." *PLoS One* 6(5): e19722.
- 20 Yamasaki, S., E. Ishikawa, et al. (2006). "Mechanistic basis of pre-T cell receptor-mediated autonomous signaling critical for thymocyte development." *Nat Immunol* 7(1): 67-75.
- Zhang, F., L. Cong, et al. (2011). "Efficient construction of sequence-specific TAL effectors for modulating mammalian transcription." *Nat Biotechnol* 29(2): 149-53.

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> GALETTO ROMAN  
GROSSE STEPHANIE  
GOUBLE AGNES  
MANNIOUI CECILE  
POIROT LAURENT  
SMITH JULIANNE  
SCHARENBERG ANDREW

<120> Способи конструювання неалореактивної і стійкої до  
імуносупресії Т-клітини для імунотерапії

<130> 416200WO

<160> 126

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 49

<212> ДНК

<213> штучна послідовність

<220>

<223> GRex2

<400> 1

tattcactga tggactccaa agaatcatta actcctggta gagaagaaa

49

<210> 2

<211> 49

<212> ДНК

<213> штучна послідовність

<220>

<223> GRex3T2

<400> 2

tgctctgggtg gctctgatga agcttcagga tgctcattatg gaggctttaa

49

<210> 3

<211> 49

<212> ДНК

<213> штучна послідовність

<220>

<223> GRex3T4

<400> 3

tgctctgatg aagcttcagg atgtcattat ggagctttaa cttgtggaa

49

```

<210> 4
<211> 49
<212> ДНК
<213> штучна послідовність

<220>
<223> GRex5T1

<400> 4
tggtgtcact gttggagggtt attgaacctg aagtgttata tgcaggata 49

<210> 5
<211> 49
<212> ДНК
<213> штучна послідовність

<220>
<223> GRex5T2

<400> 5
tatgatagct ctgttcaga ctcaacttgg aggatcatga ctacgtca 49

<210> 6
<211> 49
<212> ДНК
<213> штучна послідовність

<220>
<223> GRex5T3

<400> 6
ttatatgcag gatatgatag ctctgttcca gactcaactt ggaggatca 49

<210> 7
<211> 530
<212> PRT
<213> штучна послідовність

<220>
<223> Повтор-GRex2-LPT9-L1

<400> 7
Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys
1          5          10          15

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala
20          25          30

```

His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly  
35 40 45

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys  
50 55 60

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn  
65 70 75 80

Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val  
85 90 95

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala  
100 105 110

Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu  
115 120 125

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala  
130 135 140

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

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val  
165 170 175

Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val  
180 185 190

Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln  
195 200 205

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu  
210 215 220

Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr  
225 230 235 240

Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala  
245 250 255

Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly

260	265	270
Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys		
275	280	285
Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala		
290	295	300
His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly		
305	310	315
Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys		
325	330	335
Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn		
340	345	350
Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val		
355	360	365
Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala		
370	375	380
Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu		
385	390	395
Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala		
405	410	415
Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala		
420	425	430
Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val		
435	440	445
Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val		
450	455	460
Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln		
465	470	475
Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu		
485	490	495

```

Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
500                               505                               510

Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Arg Pro Ala
515                               520                               525

Leu Glu
530

<210> 8

<211> 530
<212> PRT
<213> штучна послідовність

<220>
<223> Повтор-GRex2-LPT9-R1

<400> 8
Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys
1                               5                               10                               15

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala
20                               25                               30

His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly
35                               40                               45

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
50                               55                               60

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His
65                               70                               75                               80

Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val
85                               90                               95

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala
100                              105                              110

Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu
115                              120                              125

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala
130                              135                              140

```

```

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

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val
                      165                      170                      175

Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val
                      180                      185                      190

Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln
                      195                      200                      205

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
210                      215                      220

Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
225                      230                      235                      240

Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala
245                      250                      255

Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly
260                      265                      270

Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys
275                      280                      285

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala
290                      295                      300

His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly
305                      310                      315                      320

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys
325                      330                      335

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His
340                      345                      350

Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val
355                      360                      365

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala

```

```

370          375          380
Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu
385          390          395          400

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala
          405          410          415

Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala
          420          425          430

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val
          435          440          445

Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val
          450          455          460

Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln
465          470          475          480

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
          485          490          495

Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
          500          505          510

Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Arg Pro Ala
          515          520          525

Leu Glu
530

<210> 9
<211> 530
<212> PRT
<213> штучна послідовність

<220>
<223> Повтор-GRex3T2-L1

<400> 9
Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys
1          5          10          15

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala

```



20										25										30										
His	Gly	Leu	Thr	Pro	Glu	Gln	Val	Val	Ala	Ile	Ala	Ser	His	Asp	Gly															
	35						40					45																		
Gly	Lys	Gln	Ala	Leu	Glu	Thr	Val	Gln	Arg	Leu	Leu	Pro	Val	Leu	Cys															
	50					55					60																			
Gln	Ala	His	Gly	Leu	Thr	Pro	Glu	Gln	Val	Val	Ala	Ile	Ala	Ser	His															
65					70					75					80															
Asp	Gly	Gly	Lys	Gln	Ala	Leu	Glu	Thr	Val	Gln	Arg	Leu	Leu	Pro	Val															
			85						90					95																
Leu	Cys	Gln	Ala	His	Gly	Leu	Thr	Pro	Gln	Gln	Val	Val	Ala	Ile	Ala															
		100						105					110																	
Ser	Asn	Gly	Gly	Gly	Lys	Gln	Ala	Leu	Glu	Thr	Val	Gln	Arg	Leu	Leu															
	115					120						125																		
Pro	Val	Leu	Cys	Gln	Ala	His	Gly	Leu	Thr	Pro	Gln	Gln	Val	Val	Ala															
	130					135					140																			
Ile	Ala	Ser	Asn	Asn	Gly	Gly	Lys	Gln	Ala	Leu	Glu	Thr	Val	Gln	Arg															
145				150						155				160																
Leu	Leu	Pro	Val	Leu	Cys	Gln	Ala	His	Gly	Leu	Thr	Pro	Gln	Gln	Val															
				165					170					175																
Val	Ala	Ile	Ala	Ser	Asn	Asn	Gly	Gly	Lys	Gln	Ala	Leu	Glu	Thr	Val															
		180					185						190																	
Gln	Arg	Leu	Leu	Pro	Val	Leu	Cys	Gln	Ala	His	Gly	Leu	Thr	Pro	Gln															
	195						200					205																		
Gln	Val	Val	Ala	Ile	Ala	Ser	Asn	Gly	Gly	Gly	Lys	Gln	Ala	Leu	Glu															
	210					215					220																			
Thr	Val	Gln	Arg	Leu	Leu	Pro	Val	Leu	Cys	Gln	Ala	His	Gly	Leu	Thr															
225					230					235					240															

Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly  
 260 265 270  
 Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys  
 275 280 285  
 Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala  
 290 295 300  
 His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly  
 305 310 315 320  
 Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys  
 325 330 335  
 Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His  
 340 345 350  
 Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val  
 355 360 365  
 Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala  
 370 375 380  
 Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu  
 385 390 395 400  
 Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala  
 405 410 415  
 Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg  
 420 425 430  
 Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val  
 435 440 445  
 Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val  
 450 455 460  
 Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln  
 465 470 475 480  
 Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu

```

                                485                                490                                495

Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
                                500                                505                                510

Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Arg Pro Ala
                                515                                520                                525

Leu Glu
    530

<210>  10
<211>  530
<212>  PRT
<213>  штучна послідовність

<220>
<223>  Повтор-GRex3T2-R1

<400>  10
Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys
1      5      10      15

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala
      20      25      30

His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly
      35      40      45

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys
      50      55      60

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn
65      70      75      80

Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val
      85      90      95

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala
      100     105     110

Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu
      115     120     125

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala

```

130	135	140
Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala		
145	150	155 160
Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val		
	165	170 175
Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val		
	180	185 190
Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln		
	195	200 205
Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu		
	210	215 220
Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr		
	225	230 235 240
Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala		
	245	250 255
Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly		
	260	265 270
Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys		
	275	280 285
Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala		
	290	295 300
His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly		
	305	310 315 320
Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys		
	325	330 335
Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn		
	340	345 350
Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val		
	355	360 365

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala  
 370 375 380  
 Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu  
 385 390 395 400  
 Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala  
 405 410 415  
 Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala  
 420 425 430  
 Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val  
 435 440 445  
 Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val  
 450 455 460  
 Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln  
 465 470 475 480  
 Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu  
 485 490 495  
 Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr  
 500 505 510  
 Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Arg Pro Ala  
 515 520 525  
 Leu Glu  
 530  
 <210> 11  
 <211> 530  
 <212> PRT  
 <213> штучна послідовність  
 <220>  
 <223> Повтор-GRex3T4-L1  
 <400> 11  
 Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys  
 1 5 10 15

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala  
20 25 30

His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly  
35 40 45

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys  
50 55 60

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn  
65 70 75 80

Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val  
85 90 95

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala  
100 105 110

Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu  
115 120 125

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala  
130 135 140

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

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val  
165 170 175

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

Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu  
195 200 205

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu  
210 215 220

Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr  
225 230 235 240

Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala

245										250										255									
Leu	Glu	Thr	Val	Gln	Arg	Leu	Leu	Pro	Val	Leu	Cys	Gln	Ala	His	Gly														
			260					265						270															
Leu	Thr	Pro	Gln	Gln	Val	Val	Ala	Ile	Ala	Ser	Asn	Asn	Gly	Gly	Lys														
		275					280					285																	
Gln	Ala	Leu	Glu	Thr	Val	Gln	Arg	Leu	Leu	Pro	Val	Leu	Cys	Gln	Ala														
	290					295					300																		
His	Gly	Leu	Thr	Pro	Glu	Gln	Val	Val	Ala	Ile	Ala	Ser	Asn	Ile	Gly														
305					310				315					320															
Gly	Lys	Gln	Ala	Leu	Glu	Thr	Val	Gln	Ala	Leu	Leu	Pro	Val	Leu	Cys														
			325					330					335																
Gln	Ala	His	Gly	Leu	Thr	Pro	Glu	Gln	Val	Val	Ala	Ile	Ala	Ser	Asn														
		340					345					350																	
Ile	Gly	Gly	Lys	Gln	Ala	Leu	Glu	Thr	Val	Gln	Ala	Leu	Leu	Pro	Val														
	355					360						365																	
Leu	Cys	Gln	Ala	His	Gly	Leu	Thr	Pro	Gln	Gln	Val	Val	Ala	Ile	Ala														
	370					375					380																		
Ser	Asn	Asn	Gly	Gly	Lys	Gln	Ala	Leu	Glu	Thr	Val	Gln	Arg	Leu	Leu														
385				390					395					400															
Pro	Val	Leu	Cys	Gln	Ala	His	Gly	Leu	Thr	Pro	Glu	Gln	Val	Val	Ala														
			405					410					415																
Ile	Ala	Ser	His	Asp	Gly	Gly	Lys	Gln	Ala	Leu	Glu	Thr	Val	Gln	Arg														
		420					425						430																
Leu	Leu	Pro	Val	Leu	Cys	Gln	Ala	His	Gly	Leu	Thr	Pro	Gln	Gln	Val														
	435					440						445																	
Val	Ala	Ile	Ala	Ser	Asn	Gly	Gly	Gly	Lys	Gln	Ala	Leu	Glu	Thr	Val														
	450				455				460																				
Gln	Arg	Leu	Leu	Pro	Val	Leu	Cys	Gln	Ala	His	Gly	Leu	Thr	Pro	Gln														
465				470				475					480																

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu  
485 490 495

Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr  
500 505 510

Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Arg Pro Ala  
515 520 525

Leu Glu  
530

<210> 12  
<211> 530  
<212> PRT  
<213> штучна послідовність

<220>  
<223> Повтор-GRex3T4-R1

<400> 12  
Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys  
1 5 10 15

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala  
20 25 30

His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly  
35 40 45

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys  
50 55 60

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His  
65 70 75 80

Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val  
85 90 95

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala  
100 105 110

Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu  
115 120 125



```

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala
130                      135                      140

Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg
145                      150                      155                      160

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val
165                      170                      175

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

Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu
195                      200                      205

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
210                      215                      220

Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
225                      230                      235                      240

Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala
245                      250                      255

Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly
260                      265                      270

Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys
275                      280                      285

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala
290                      295                      300

His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly
305                      310                      315                      320

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
325                      330                      335

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn
340                      345                      350

Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val

```

```

355              360              365
Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala
370              375              380

Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu
385              390              395              400

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala
405              410              415

Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg
420              425              430

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val
435              440              445

Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val
450              455              460

Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu
465              470              475              480

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
485              490              495

Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
500              505              510

Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Arg Pro Ala
515              520              525

Leu Glu
530

<210> 13
<211> 530
<212> PRT
<213> штучна послідовність

<220>
<223> Повтор-GRex5T1-LPT8-L1

<400> 13
Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys

```

1	5	10	15
Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg	Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala		
20	25	30	
His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly			
35	40	45	
Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys			
50	55	60	
Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn			
65	70	75	80
Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val			
85	90	95	
Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala			
100	105	110	
Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu			
115	120	125	
Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala			
130	135	140	
Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg			
145	150	155	160
Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val			
165	170	175	
Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val			
180	185	190	
Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu			
195	200	205	
Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu			
210	215	220	
Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr			
225	230	235	240

Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala  
245 250 255

Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly  
260 265 270

Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys  
275 280 285

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala  
290 295 300

His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly  
305 310 315 320

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys  
325 330 335

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn  
340 345 350

Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val  
355 360 365

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala  
370 375 380

Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu  
385 390 395 400

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala  
405 410 415

Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg  
420 425 430

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val  
435 440 445

Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val  
450 455 460

Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu

```

465                               470                               475                               480

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
      485                               490                               495

Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
      500                               505                               510

Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Arg Pro Ala
      515                               520                               525

Leu Glu
      530

<210>  14

<211>  530
<212>  PRT
<213>  штучна послідовність

<220>
<223>  Повтор-GReX5T1-LPT8-R1

<400>  14
Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys
1      5      10      15

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala
      20      25      30

His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly
      35      40      45

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
      50      55      60

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His
      65      70      75      80

Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val
      85      90      95

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala
      100      105      110

Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu

```

115	120	125
Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala 130 135 140		
Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg 145 150 155 160		
Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val 165 170 175		
Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val 180 185 190		
Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu 195 200 205		
Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu 210 215 220		
Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr 225 230 235 240		
Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala 245 250 255		
Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly 260 265 270		
Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys 275 280 285		
Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala 290 295 300		
His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly 305 310 315 320		
Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys 325 330 335		
Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn 340 345 350		

Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val  
 355 360 365  
 Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala  
 370 375 380  
 Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu  
 385 390 395 400  
 Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala  
 405 410 415  
 Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala  
 420 425 430  
 Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val  
 435 440 445  
 Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val  
 450 455 460  
 Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu  
 465 470 475 480  
 Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu  
 485 490 495  
 Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr  
 500 505 510  
 Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Arg Pro Ala  
 515 520 525  
 Leu Glu  
 530  
 <210> 15  
 <211> 530  
 <212> PRT  
 <213> штучна послідовність  
 <220>  
 <223> Повтор-GRex5T2-L1

```

<400> 15
Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys
1      5      10      15

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala
20      25      30

His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly
35      40      45

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
50      55      60

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn
65      70      75      80

Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val
85      90      95

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala
100     105     110

Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu
115     120     125

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala
130     135     140

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

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val
165     170     175

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

Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln
195     200     205

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
210     215     220

Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr

```



225	230	235	240
Pro Glu Gln Val	Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala		
	245	250	255
Leu Glu Thr Val	Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly		
	260	265	270
Leu Thr Pro Gln Gln Val	Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys		
	275	280	285
Gln Ala Leu Glu Thr	Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala		
	290	295	300
His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val	Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly		
305	310	315	320
Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr	Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys		
	325	330	335
Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val	Val Ala Ile Ala Ser Asn		
	340	345	350
Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr	Val Gln Arg Leu Leu Pro Val		
	355	360	365
Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val	Val Ala Ile Ala		
	370	375	380
Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr	Val Gln Arg Leu Leu		
385	390	395	400
Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val	Val Ala		
	405	410	415
Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr	Val Gln Arg		
	420	425	430
Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val			
	435	440	445
Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr	Val		
	450	455	460

Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu  
465 470 475 480

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu  
485 490 495

Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr  
500 505 510

Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Arg Pro Ala  
515 520 525

Leu Glu  
530

<210> 16

<211> 530  
<212> PRT  
<213> штучна послідовність

<220>  
<223> Повтор-GRex5T2-R1

<400> 16  
Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys  
1 5 10 15

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala  
20 25 30

His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly  
35 40 45

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys  
50 55 60

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn  
65 70 75 80

Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val  
85 90 95

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala  
100 105 110

```

Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu
    115                      120                      125

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala
    130                      135                      140

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

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val
    165                      170                      175

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

Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu
    195                      200                      205

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
    210                      215                      220

Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
    225                      230                      235                      240

Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala
    245                      250                      255

Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly
    260                      265                      270

Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys
    275                      280                      285

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala
    290                      295                      300

His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly
    305                      310                      315                      320

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
    325                      330                      335

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn

```

```

340              345              350
Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val
355              360              365
Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala
370              375              380
Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu
385              390              395              400
Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala
405              410              415
Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg
420              425              430
Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val
435              440              445
Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val
450              455              460
Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln
465              470              475              480
Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
485              490              495
Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
500              505              510
Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Arg Pro Ala
515              520              525
Leu Glu
530

```

```

<210> 17
<211> 530
<212> PRT
<213> штучна послідовність
<220>

```

<223> Novtop-GRex5T3-L1

<400> 17

Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys  
1 5 10 15

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala  
20 25 30

His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly  
35 40 45

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys  
50 55 60

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn  
65 70 75 80

Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val  
85 90 95

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala  
100 105 110

Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu  
115 120 125

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala  
130 135 140

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

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val  
165 170 175

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

Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu  
195 200 205

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu  
210 215 220

```

Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
225                               230                235                240

Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala
                               245                250                255

Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly
                               260                265                270

Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys
                               275                280                285

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala
                               290                295                300

His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly
305                               310                315                320

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
                               325                330                335

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn
                               340                345                350

Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val
                               355                360                365

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala
                               370                375                380

Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu
385                               390                395                400

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala
                               405                410                415

Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala
                               420                425                430

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val
                               435                440                445

Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val

```

```

450              455              460

Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln
465              470              475              480

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
485              490              495

Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
500              505              510

Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Arg Pro Ala
515              520              525

Leu Glu
530

<210>  18
<211>  530
<212>  PRT
<213>  штучна послідовність

<220>
<223>  Повтор-GRex5T3-R1

<400>  18
Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys
1              5              10              15

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala
20              25              30

His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly
35              40              45

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys
50              55              60

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn
65              70              75              80

Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val
85              90              95

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala

```

100	105	110
Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu		
115	120	125
Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala		
130	135	140
Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg		
145	150	155
Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val		
165	170	175
Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val		
180	185	190
Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu		
195	200	205
Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu		
210	215	220
Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr		
225	230	235
Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala		
245	250	255
Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly		
260	265	270
Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys		
275	280	285
Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala		
290	295	300
His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly		
305	310	315
Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys		
325	330	335



Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn  
340 345 350

Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val  
355 360 365

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala  
370 375 380

Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu  
385 390 395 400

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala  
405 410 415

Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg  
420 425 430

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val  
435 440 445

Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val  
450 455 460

Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu  
465 470 475 480

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu  
485 490 495

Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr  
500 505 510

Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Arg Pro Ala  
515 520 525

Leu Glu  
530

<210> 19

<211> 2814

<212> ДНК

&lt;213&gt; штучна послідовність

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; GRex2-L TALEN

&lt;400&gt; 19

atgggcgatc	ctaaaaagaa	acgtaaggtc	atcgattacc	catacgatgt	tccagattac	60
gctatcgata	tcgccgatct	acgcacgctc	gggtacagcc	agcagcaaca	ggagaagatc	120
aaaccgaagg	ttcgttcgac	agtggcgag	caccacgagg	cactggtcgg	ccacgggttt	180
acacacgcgc	acatcggtgc	gttaagccaa	cacccggcag	cgtaggggac	cgtcgctgtc	240
aagtatcagg	acatgatcgc	agcgttgcca	gaggcgacac	acgaagcgat	cgttggcgctc	300
ggcaaacagt	ggtcgggcgc	acgcgctctg	gaggccttgc	tcacgggtgc	gggagagttg	360
agaggtccac	cgttacagtt	ggacacaggc	caacttctca	agattgcaaa	acgtggcggc	420
gtgaccgcag	tggaggcagt	gcatgcatgg	cgcaatgcac	tgacgggtgc	cccgcctaac	480
ttgaccccg	agcagggtgt	ggccatcgcc	agcaatattg	gtggcaagca	ggcgctggag	540
acgggtgcagg	cgctgttgcc	gggtgctgtg	caggccacg	gcttgacccc	ccagcaggtg	600
gtggccatcg	ccagcaatgg	cggtggcaag	caggcgctgg	agacgggtcca	gcggctgttg	660
ccgggtgctgt	gccaggccca	cggcttgacc	ccccagcagg	tgggtggccat	cgccagcaat	720
ggcgggtggca	agcaggcgct	ggagacggtc	cagcggctgt	tgccgggtgt	gtgccaggcc	780
cacggcttga	ccccggagca	gggtgtggcc	atcgccagcc	acgatggcgg	caagcaggcg	840
ctggagacgg	tccagcggct	gttgccgggtg	ctgtgccagg	cccacggcctt	gaccccgga	900
cagggtggtgg	ccatcgccag	caatattggt	ggcaagcagg	cgtcggagac	ggtgcaggcg	960
ctgttgccgg	tgctgtgcca	ggcccacggc	ttgaccccg	agcagggtgt	ggccatcgcc	1020
agccacgatg	gcggcaagca	ggcgctggag	acgggtccagc	ggctgttgcc	ggtgctgtgc	1080
caggccacg	gcttgacccc	ccagcagggtg	gtggccatcg	ccagcaatgg	cggtggcaag	1140
caggcgctgg	agacgggtcca	gcggctgttg	ccgggtgctgt	gccaggccca	cggcttgacc	1200
ccccagcagg	tggtggccat	cgccagcaat	aatgggtggca	agcaggcgct	ggagacggtc	1260
cagcggtgtg	tgccgggtgt	gtgcaggcc	cacggcttga	ccccggagca	ggtggtggcc	1320
atcgccagca	atattggtgg	caagcaggcg	ctggagacgg	tgacggcgct	gttgccgggtg	1380
ctgtgccagg	cccacggctt	gacccccag	cagggtggtgg	ccatcgccag	caatggcggt	1440
ggcaagcagg	cgctggagac	ggtccagcgg	ctgttgccgg	tgctgtgcca	ggcccacggc	1500
ttgaccccc	agcagggtgt	ggccatcgcc	agcaataatg	gtggcaagca	ggcgctggag	1560
acgggtccagc	ggctgttgcc	gggtgctgtg	caggccacg	gcttgacccc	ccagcaggtg	1620
gtggccatcg	ccagcaataa	tggtggcaag	caggcgctgg	agacgggtcca	gcggctgttg	1680
ccgggtgctgt	gccaggccca	cggcttgacc	ccggagcagg	tggtggccat	cgccagcaat	1740
attggtggca	agcaggcgct	ggagacgggtg	caggcgctgt	tgccgggtgt	gtgccaggcc	1800
cacggcttga	ccccggagca	gggtgtggcc	atcgccagcc	acgatggcgg	caagcaggcg	1860
ctggagacgg	tccagcggct	gttgccgggtg	ctgtgccagg	cccacggctt	gacccccag	1920
cagggtggtgg	ccatcgccag	caatggcggt	ggcaagcagg	cgtcggagac	ggtccagcgg	1980
ctggtgccgg	tgctgtgcca	ggcccacggc	ttgacccctc	agcagggtgt	ggccatcgcc	2040
agcaatggcg	gcggcaggcc	ggcgctggag	agcattgttg	cccagttatc	tcgccctgat	2100
ccggcggtgg	ccgcgttgac	caacgaccac	ctcgtgcct	tgccctgcct	cggcgggcg	2160
cctgcgctgg	atgcagtgaa	aaagggtatg	ggggatccta	tcagccgttc	ccagctgggtg	2220
aagtccgagc	tggaggagaa	gaaatccgag	ttgaggcaca	agctgaagta	cgtgccccac	2280
gagtacatcg	agctgatcga	gatcgcccg	aacagcacc	aggaccgat	cctggagatg	2340
aagggtgatgg	agttcttcat	gaagggtgtac	ggctacaggg	gcaagcacct	gggcggctcc	2400
aggaagcccg	acggcgccat	ctacaccggtg	ggctccccca	tcgactacgg	cgtgatcgtg	2460
gacaccaagg	cctactccgg	cggctacaac	ctgcccacg	gccaggccga	cgaaatgcag	2520
aggtacgtgg	aggagaacca	gaccaggaac	aagcacatca	accccacga	gtggtggaag	2580
gtgtacccct	ccagcgtgac	cgagttcaag	ttcctgttcg	tgtccggcca	cttcaagggc	2640
aactacaagg	cccagctgac	caggctgaac	cacatcacca	actgcaacgg	cgccgtgctg	2700
tccgtggagg	agctcctgat	cggcgccgag	atgatcaagg	ccggcacccct	gaccctggag	2760
gagggtgagga	ggaagtccaa	caacggcgag	atcaacttcg	cggccgactg	ataa	2814

&lt;210&gt; 20

&lt;211&gt; 2832

<212> ДНК  
 <213> штучна послідовність

<220>  
 <223> GRex2-R TALEN

```

<400> 20
atgggcgatc ctaaaaagaa acgtaaggtc atcgataagg agaccggcgc tgccaagttc 60
gagagacagc acatggacag catcgatata gccgatctac gcacgctcgg ctacagccag 120
cagcaacagg agaagatcaa accgaagggt cgttcgacag tggcgacgca ccacgaggca 180
ctggtcggcc acgggtttac acacgcgcac atcgttgcgt taagccaaca cccggcagcg 240
ttagggaccg tcgctgtcaa gtatcaggac atgatcgagc cgttgccaga ggcgacacac 300
gaagcgatcg ttggcgtcgg caaacagtgg tccggcgcac gcgctctgga ggcttgcctc 360
acggtggcgg gagagttgag aggtccaccg ttacagttgg acacaggcca acttctcaag 420
attgcaaaac gtggcgcggt gacgcagtg gaggcagtg atgcatggcg caatgcactg 480
acgggtgccc cgctcaactt gacccccag caggtggtgg ccatcgccag caatggcgtg 540
ggcaagcagg cgctggagac ggtccacggc ctgttgccgg tgcgtgtcca gggccacggc 600
ttgaccccc agcaggtggt ggccatcgcc agcaatggcg gtggcaagca ggcgctggag 660
acgggtccagc ggtggtgtgc ggtgctgtgc caggcccacg gcttgacccc ggagcagggtg 720
gtggccatcg ccagccacga tggcggaag caggcgctgg agacgggtcca ggcgctgttg 780
ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc cccagcagg tgggtggccat cggccagcaat 840
ggcggtggca agcaggcgct ggagacggtc cagcggtgtg tgcgggtgct gtgccaggcc 900
cacggcttga cccccagca ggtggtggcc atcgccagca atggcggtgg caagcaggcg 960
ctggagacgg tccagcggtc gttgccggtg ctgtgccagg cccacggctt gacccggag 1020
caggtggtgg ccatcgccag ccacgatggc ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg 1080
ctgttgccgg tgcgtgtcca gggccacggc ttgaccccc agcaggtggt ggccatcgcc 1140
agcaatggcg gtggcaagca ggcgctggag acggtccagc ggctgttgc ggtgctgtgc 1200
caggcccacg gcttgacccc ggagcagtg gtggccatcg ccagccacga tggcggaag 1260
caggcgctgg agacgggtcca gcggtgttg cgggtgctgt gccaggccca cggcttgacc 1320
ccccagcagg tgggtggccat cgccagcaat ggcggtggca agcaggcgct ggagacggtc 1380
cagcggtgtg tgcgggtgct gtgccaggcc cagggcttga ccccggaagca ggtggtggcc 1440
atcgccagca atattggtgg caagcaggcg ctggagacgg tgcaggcgct gttgccgggtg 1500
ctgtgccagg cccacggctt gaccccgagg caggtggtgg ccatcgccag ccacgatggc 1560
ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg ctgttgccgg tgcgtgtcca gggccacggc 1620
ttgaccccc agcaggtggt ggccatcgcc agccacgatg gcggcaagca ggcgctggag 1680
acgggtccagc ggtggttgc ggtgctgtgc caggcccacg gcttgacccc ggagcagggtg 1740
gtggccatcg ccagcaatat tgggtggcaag caggcgctgg agacgggtgca ggcgctgttg 1800
ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc cccagcagg tgggtggccat cggcagcaat 1860
aatggtggca agcaggcgct ggagacggtc cagcggtgtg tgcgggtgct gtgccaggcc 1920
cacggcttga cccccagca ggtggtggcc atcgccagca ataattggtgg caagcaggcg 1980
ctggagacgg tccagcggtc gttgccggtg ctgtgccagg cccacggctt gacccctcag 2040
cagggtggtgg ccatcgccag caatggcggc ggcaaggccg cgctggagag cattgttgcc 2100
cagttatctc gccctgaccc ggcggtggcc gcgttgacca acgaccacct cgtgccttg 2160
gcctgcctcg gcggcgctcc tgcgctggat gcagtgaaaa agggattggg ggatcctatc 2220
agccgttccc agctggtgaa gtccgagctg gaggagaaga aatccgagtt gaggcacaag 2280
ctgaagtacg tgcgccacga gtacatcgag ctgacgaga tcgcccggaa cagcaccacg 2340
gaccgtatcc tggagatgaa ggtgatggag ttcttcatga aggtgtacgg ctacaggggc 2400
aagcacctgg gcgggtccag gaagcccagc ggcgccatct acaccgtggg ctccccatc 2460
gactacggcg tgatcgtgga caccaaggcc tactccggcg gctacaacct gcccatcggc 2520
caggccgacg aaatgcagag gtacgtggag gagaaccaga ccaggaacaa gcacatcaac 2580
cccaacaggt ggtggaaggt gtacccctcc agcgtgaccg agttcaagtt cctgttcgtg 2640
tcgggccact tcaagggcaa ctacaaggcc cagctgacca ggtgaacca catcaccac 2700
tgcaacggcg ccgtgctgtc cgtggaggag ctctgatcg gcggcgagat gatcaaggcc 2760
ggcaccctga ccttgaggga ggtgaggagg aagttcaaca acggcgagat caacttcgcg 2820
gccgactgat aa 2832

```

<210> 21

```

<211> 2814
<212> ДНК
<213> штучна послідовність

<220>
<223> Grex3T2-L TALEN

<400> 21
atgggcgatc ctaaaaagaa acgtaaggtc atcgattacc catacgaatg tccagattac 60
gctatcgata tcgccgatct acgcacgctc ggctacagcc agcagcaaca ggagaagatc 120
aaaccgaagg ttctgttcgac agtggcgagc caccacgagg cactgggtcgg ccacgggttt 180
acacacgcgc acatcggttc gtttaagccaa caccgcgagc cgttagggac cgtcgctgtc 240
aagtatcagg acatgatcgc agcgttgcca gaggcgacac acgaagcgat cgttggcgctc 300
ggcaaacagt ggtccggcgc acgcgctctg gaggccttgc tcacgggtggc gggagagttg 360
agaggtccac cgttacagtt ggacacaggc caacttctca agattgcaaa acgtggcggc 420
gtgaccgcag tggaggcagt gcatgcattg cgcaatgcac tgacgggtgc cccgctcaac 480
ttgaccccc agcaggtggt ggccatcgcc agcaataatg gtggcaagca ggcgctggag 540
acgggtccagc ggtgtgtgcc ggtgctgtgc caggccacag gcttgacccc ggagcaggtg 600
gtggccatcg ccagccacga tggcggcaag caggcgctgg agacgggtcca gcggtgttg 660
ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc ccggagcagg tgggtggcat cggcagccac 720
gatggcgcca agcaggcgct ggagacggtc caggcgctgt tgccgggtgt gtgccaggcc 780
cacggcttga cccccagca ggtggtggcc atcgccagca atggcggtgg caagcaggcg 840
ctggagacgg tccagcggtc gttgcccgtg ctgtgccagg cccacggctt gacccccag 900
caggtggttg ccatcgccag caataatggt ggcaagcagg cgtggagac ggtccagcgg 960
ctgttgccgg tgctgtgcca gggccacggc ttgaccccc agcaggtggt ggccatcgcc 1020
agcaataatg gtggcaagca ggcgctggag acggtccagc ggtgtgtgcc ggtgctgtgc 1080
caggccacag gcttgacccc ccagcaggtg gtggccatcg ccagcaatgg cgttggcagg 1140
caggcgctgg agacgggtcca cggctgttg ccgggtgctgt gccaggccca cggcttgacc 1200
ccccagcagg tgggtggcat cgccagcaat aatggtggca agcaggcgct ggagacggtc 1260
cagcggtgtg tgccgggtgt gtcgccagcc cagggttga cccccagca ggtggtggcc 1320
atcgccagca atggcggtg caagcaggcg ctggagacgg tccagcggtc gttgccgggtg 1380
ctgtgccagg cccacggctt gacccccag caggtggttg ccatcgccag caataatggt 1440
ggcaagcagg cgtggagac ggtccagcgg ctgttgccgg tgctgtgcca gggccacggc 1500
ttgaccccc agcaggtggt ggccatcgcc agccacgatg gcggcaagca ggcgtggtg 1560
acgggtccagc ggtgtgtgcc ggtgctgtgc caggccacag gcttgacccc ccagcaggtg 1620
gtggccatcg ccagcaatgg cgttggcagg caggcgctgg agacgggtcca cggctgtgtg 1680
ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc ccggagcagg tgggtggcat cggcagccac 1740
gatggcgcca agcaggcgct ggagacggtc caggcgctgt tgccgggtgt gtgccaggcc 1800
cacggcttga cccccagca ggtggtggcc atcgccagca atggcggtgg caagcaggcg 1860
ctggagacgg tccagcggtc gttgccgggt ctgtgccagg cccacggctt gacccccag 1920
caggtggttg ccatcgccag caataatggt ggcaagcagg cgtggagac ggtccagcgg 1980
ctgttgccgg tgctgtgcca gggccacggc ttgacccctc agcaggtggt ggccatcgcc 2040
agcaatggcg gcggcaggcc ggcgctggag agcattgttg cccagttatc tcgccctgat 2100
ccggcggttg ccgcttgac caacgaccac ctgctgcctc tggcctgcct cggcggcggt 2160
cctgcgctgg atcgagtgaa aaagggattg ggggatccta tcagccgttc ccagctggtg 2220
aagtcaggagc tggaggagaa gaaatccgag ttgaggcaca agctgaagta cgtgccccac 2280
gagtagatcg agctgatcga gatcgccggg aacagcacc aggacggtat cctggagatg 2340
aagggtgatg agttcttcat gaaggtgtac ggctacaggg gcaagcacc gggcggtctc 2400
aggaagcccg acggcgccat ctacaccgtg ggtccccca tcgactacgg cgtgatcgtg 2460
gacaccaagg cctactccgg cggctacaac ctgccccatg gccaggccga cgaatgcag 2520
aggtacgtgg aggagaacca gaccaggaac aagcacatca accccaacga gtggtggaag 2580
gtgtacccct ccagcgtgac cgagttcaag ttctgttctg tgcgggcca cttcaagggc 2640
aactacaagg cccagctgac caggctgaac cacatcacca actgcaacgg cgcgctgctg 2700
tccgtggagg agctcctgat cggcggcgag atgatcaagg ccggcacctt gaccctggag 2760
gaggtgagga ggaagtcaaa caacggcgag atcaacttcg cggccgactg ataa 2814

```



```

<210> 22
<211> 2832
<212> ДНК
<213> штучна послідовність

<220>
<223> GRex3T2-R TALEN

<400> 22
atgggcgatc ctaaaaagaa acgtaaggtc atcgataagg agaccgcgcg tgccaagttc 60
gagagacagc acatggacag catcgatata gccgatctac gcacgctcgg ctacagccag 120
cagcaacagg agaagatcaa accgaagggt cgttcgacag tggcgacgca ccacgaggca 180
ctgggtcgcc acgggtttac acacgcgcac atcgttgctg taagccaaca cccggcagcg 240
ttagggaccg tcgctgtcaa gtatcaggac atgatcgagc cgttgccaga ggcgacacac 300
gaagcgatcg ttggcgtcgg caaacagtgg tccggcgcac gcgctctgga ggcttgctc 360
acggtggcgg gagagttgag aggtccaccg ttacagtggg acacaggcca acttctcaag 420
attgcaaaac gtggcggcgt gaccgcagtg gaggcagtgc atgcatggcg caatgcactg 480
acgggtgccc cgctcaactt gacccccagc caggtgggtg ccatcgccag caatggcggg 540
ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg ctgttgccgg tctgtgcca ggcacggcg 600
ttgaccccg agcagggtgt ggccatcgcc agcaatattg gtggcaagca ggcgctggag 660
acggtgcagg cgctgttgcc ggtgctgtgc caggccacg ccttgacccc ggagcaggtg 720
gtggccatcg ccagcaatat tgggtggcaag caggcgctgg agacgggtga ggcgctgtt 780
ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc cccagcagg tgggtggcat cgcagcaat 840
aatggtggca agcaggcgct ggagacggtc cagcggctgt tgcgggtgct gtgccaggcc 900
cacggcttga cccggagca ggtggtggcc atcgccagca atattggtgg caagcaggcg 960
ctggagacgg tgcaggcgct gttgccggtg ctgtgccagg cccacggctt gaccccgag 1020
caggtggttg ccatcgccag ccacgatggc ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg 1080
ctgttgccgg tctgtgcca ggcacggcg ttagccccc agcagggtgt ggccatcgcc 1140
agcaatggcg gtggcaagca ggcgctggag acggtccagc ggctgttgcc ggtgctgtgc 1200
caggccacg ccttgacccc ggagcaggtg gtggccatcg ccagccacga tggcggaag 1260
caggcgctgg agacgggtca gcggctgtg cgggtgctgt gccaggccca cggcttgacc 1320
ccggagcagg tgggtggcat cgcagccac gatggcgga agcaggcgct ggagcaggtc 1380
cagcggtgtg tgcgggtgct gtgccaggcc cacggctga ccccgagca ggtggtggcc 1440
atcgccagca atattggtgg caagcaggcg ctggagacgg tgcaggcgct gttgccggtg 1500
ctgtgccagg cccacggctt gacccccag caggtggttg ccatcgccag caatggcggg 1560
ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg ctgttgccgg tctgtgcca ggcacggcg 1620
ttgaccccg agcagggtgt ggccatcgcc agcaatattg gtggcaagca ggcgctggag 1680
acggtgcagg cgctgttgcc ggtgctgtgc caggccacg ccttgacccc ggagcaggtg 1740
gtggccatcg ccagcaatat tgggtggcaag caggcgctgg agacgggtga ggcgctgtt 1800
ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc cccagcagg tgggtggcat cgcagcaat 1860
ggcggtggca agcaggcgct ggagacggtc cagcggtgtg tgcgggtgct gtgccaggcc 1920
cacggcttga ccccccagca ggtggtggcc atcgccagca ataattggtg caagcaggcg 1980
ctggagacgg tccagcggtt gttgccggtg ctgtgccagg cccacggctt gacccctcag 2040
caggtggttg ccatcgccag caatggcggc ggcaaggcgg cgctggagag cattgttgcc 2100
cagttatctc gccctgatcc gccgttgccc gcgttgacca acgaccacct cgtcgcttg 2160
gcctgcctcg gcggcgctcc tgcgctggat gcagtgaaaa agggattggg ggatcctatc 2220
agccgttccc agctggtgaa gtccgagctg gaggagaaga aatccgagtt gaggcacaag 2280
ctgaagtacg tccccacga gtacatcgag ctgacgaga tgcggcgaa cagcaccag 2340
gaccgtatcc tggagatgaa ggtgatggag ttcttcatga aggtgtacgg ctacaggggc 2400
aagcacctgg gcggctccag gaagcccgac ggcgcatct acacgtggg ctcgcccatc 2460
gactacggcg tgatcgtgga caccaggcc tactccggcg gctacaacct gcccatcgcc 2520
caggccgacg aatgcagag gtacgtggag gagaaccaga ccaggaacaa gcacatcaac 2580
cccaacgagt ggtggaaggt gtacccctcc agcgtgaccg agttcaagtt cctgttcgtg 2640
tccggccact tcaagggcaa ctacaaggcc cagctgacca ggctgaacca catcaccaac 2700
tgcaacggcg ccgtgctgtc cgtggaggag ctctgatcg gcggcgagat gatcaaggcc 2760
ggcacccctga cctggaggga ggtgaggagg aagttcaaca acggcgagat caacttcgcg 2820
gccgactgat aa 2832

```

```

<210> 23
<211> 2814
<212> ДНК
<213> штучна послідовність

<220>
<223> GRex3T4-L TALEN

<400> 23
atgggcgatc ctaaaaagaa acgtaaggtc atcgattacc catacagatgt tccagattac 60
gctatcgata tcgccgatct acgcacgctc ggctacagcc agcagcaaca ggagaagatc 120
aaaccgaagg ttcggttcgac agtggcgagc caccacgagg cactggtcgg ccacgggttt 180
acacacgcgc acatcggtgc gttaagccaa caccgcgagc cgttagggac cgtcgctgtc 240
aagtatcagg acatgatcgc agcgttgcca gaggcgacac acgaagcgat cgttggcgctc 300
ggcaaacagt ggtccggcgc acgcgctctg gaggccttgc tcacgggtggc gggagagtgt 360
agaggctccac cgttacagtt ggacacaggc caacttctca agattgcaaa acgtggcggc 420
gtgaccgcag tggaggcagt gcatgcatgg cgcaatgcac tgacgggtgc cccgctcaac 480
ttgaccccc agcagggtgt ggcacatgcc agcaataatg gtggcaagca ggcgctggag 540
acggtccagc ggtgtgtgcc ggtgtgtgtc caggccacag gcttgacccc ggagcagggtg 600
gtggccatcg ccagccacga tggcgccaag caggcgctgg agacgggtcca gcggtgtgtg 660
ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc cccagcaggc tgggtggccat cgcacgcaat 720
ggcgttgcca agcaggcgct ggagacggtc cagcggctgt tgccggtgct gtccaggccc 780
cacggcttga ccccgagca ggtgtgtgcc atcgccagcc acgatggcgg caagcaggcg 840
ctggagacgg tcacgcggct gttgccggtg ctgtgccagg cccacggctt gacccccag 900
caggtgtgtg ccatcgccag caatggcggt ggcaagcagg cgttgagac ggtccaggcg 960
ctgttgccgg tgctgtgcca ggcacagcgc ttgaccccc agcagggtgt ggccatcgcc 1020
agcaataatg gtggcaagca ggcgctggag acggtccagc ggtgtgtgcc ggtgtgtgtc 1080
caggccacag gcttgacccc ggagcagggtg gtggccatcg ccagcaatat tgggtggcaag 1140
caggcgctgg agacgggtga ggcgctgtgt ccagggccca cggcttgacc 1200
ccccagcagg tgggtggccat cgcacgcaat ggcggtggca agcaggcgct ggagacggtc 1260
cagcggctgt tgccggtgct gtgccaggcc cacggcttga cccccagca ggtgtgtggc 1320
atcgccagca ataattgttg caagcaggcg ctggagacgg tcacgcggct gttgccggtg 1380
ctgtgccagg cccacggctt gacccccgag caggtgtgtg ccatcgccag caatatgtgt 1440
ggcaagcagg cgttgagac ggtgcaggcg ctgttgccgg tgctgtgcca ggcacagcgc 1500
ttgaccccc agcagggtgt ggccatcgcc agcaatatg gtggcaagca ggcgctggag 1560
acggtgcagg cgtgtgtgcc ggtgtgtgtc caggccacag gcttgacccc ccagcagggtg 1620
gtggccatcg ccagcaataa tgggtggcaag caggcgctgg agacgggtcca gcggtgtgtg 1680
ccggtgtgtg gccaggccca cggcttgacc cggagcaggc tgggtggccat cgcacgccac 1740
gatggcgcca agcaggcgct ggagacggtc cagcggctgt tgccggtgct gtgccaggcc 1800
cacggcttga cccccagca ggtgtgtggc atcgccagca atggcggttg caagcaggcg 1860
ctggagacgg tcacgcggct gttgccggtg ctgtgccagg cccacggctt gacccccag 1920
caggtgtgtg ccatcgccag caatggcggt ggcaagcagg cgttgagac ggtccagcgg 1980
ctgttgccgg tgctgtgcca ggcacagcgc ttgacccctc agcagggtgt ggccatcgcc 2040
agcaatggcg ggcgagggcc ggcgctggag agcattgttg cccagttatc tcgccctgat 2100
ccggtgtgtg ccgctgtgac caacgaccac ctgctgcct tggcctgcct cggcggtgtg 2160
cctgcgctgg atcgagtga aaaggattg ggggatccta tcagccgttc ccagctgtgt 2220
aagtccgagc tggaggagaa gaaatccgag ttgaggcaca agctgaagta cgtgccccac 2280
gagtagatcg agctgatcga gatcgccggg aacagcacc aggaccgtat cctggagatg 2340
aaggtgatgg agttcttcat gaaggtgtac ggctacaggg gcaagcacct gggcggtctc 2400
aggaagcccc acggcgccat ctacacgtg ggctccccc tcgactacgg cgtgatcgtg 2460
gacaccaagg cctactccgg cggctacaac ctgcccacg gccaggccga cgaatgcag 2520
aggtagctgg aggagaacca gaccaggaac aagcacatca accccaacga gtgggtggaag 2580
gtgtacccct ccagcgtgac cgagttcaag ttctgtgtcg tgtccggcca cttcaagggc 2640
aactacaagg cccagctgac caggctgaac cacatcacca actgcaacgg cgcgctgtgt 2700
tccgtggagg agctcctgat cggcgcgag atgatcaagg ccggcacctt gacctggag 2760

```

gaggtgagga ggaagttcaa caacggcgag atcaacttcg cggccgactg ataa 2814

<210> 24

<211> 2832

<212> ДНК

<213> штучна послідовність

<220>

<223> GRex3T4-R TALEN

<400> 24

atgggcgatc	ctaaaaagaa	acgtaaggtc	atcgataagg	agaccgccc	tgccaagttc	60
gagagacagc	acatggacag	catcgatata	gccgatctac	gcacgctcgg	ctacagccag	120
cagcaacagg	agaagatcaa	accgaagggt	cggtcgacag	tggcgacgca	ccacgaggca	180
ctggtcggcc	acgggtttac	acacgcgcac	atcggttgct	taagccaaca	cccgccagcg	240
ttagggaccg	tcgctgtcaa	gtatcaggac	atgatcgag	cggtgccaga	ggcgacacac	300
gaagcgatcg	ttggcgtcgg	caaacagtgg	tccggcgcac	gcgctctgga	ggccttgctc	360
acggtggcgg	gagagttgag	aggtccaccg	ttacagttgg	acacaggcca	acttctcaag	420
attgcaaaac	gtggcgcgct	gaccgcagtg	gaggcagtg	atgcatggcg	caatgcactg	480
acgggtgccc	cgtcaactt	gacccccag	caggtggtgg	ccatcgccag	caatggcggt	540
ggcaagcagg	cgtcgagag	ggtccagcgg	ctgttgccgg	tgctgtgcca	ggcccacggc	600
ttgaccccg	agcaggtggt	ggccatcgcc	agccacgatg	gcggcaagca	ggcgctggag	660
acggtccagc	ggctgttgcc	ggtgctgtgc	caggccacg	gcttgacccc	ggagcaggtg	720
gtggccatcg	ccagccacga	tggcggaag	caggcgctgg	agacgggtcca	gcggctgttg	780
ccggtgctgt	gccaggccca	cggcttgacc	cggagcagg	tgggtggcat	cgccagcaat	840
attggtggca	agcaggcgct	ggagacgggt	caggcgctgt	tgccggtgct	gtgccaggcc	900
cacggcttga	ccccggagca	ggtggtggcc	atcgccagcc	acgatggcgg	caagcaggcg	960
ctggagacgg	tccagcggt	gttgccggtg	ctgtgccagg	cccacggctt	gaccccgag	1020
caggtggtgg	ccatcgccag	caatatgtgt	ggcaagcagg	cgtggagac	ggtgacggcg	1080
ctgttgccgg	tgctgtgcca	ggcccaacgg	tgaccccg	agcaggtggt	ggccatcgcc	1140
agcaatatgt	gtggcaagca	ggcgctggag	acggtgcagg	cgctgttgcc	ggtgctgtgc	1200
caggccacg	gcttgacccc	ccagcaggtg	gtggccatcg	ccagcaataa	tggtggcaag	1260
caggcgctgg	agacgggtcca	gcggctgttg	cgggtgctgt	gccaggccca	cggcttgacc	1320
ccccagcagg	tgggtggccat	cgccagcaat	ggcggtggca	agcaggcgct	ggagacgggtc	1380
cagcggtgtg	tgccggtgct	gtgccaggcc	cacggcttga	ccccccagca	ggtggtggcc	1440
atcgccagca	atggcggtgg	caagcaggcg	ctggagacgg	tccagcggt	gttgccggtg	1500
ctgtgcccagg	cccacggctt	gaccccgag	caggtggtgg	ccatcgccag	caatatgtgt	1560
ggcaagcagg	cgtggagac	ggtgcaggcg	ctgttgccgg	tgctgtgcca	ggcccacggc	1620
ttgaccccg	agcaggtggt	ggccatcgcc	agcaatatgt	gtggcaagca	ggcgctggag	1680
acggtgcagg	cgctgttgcc	ggtgctgtgc	caggccacg	gcttgacccc	ccagcaggtg	1740
gtggccatcg	ccagcaataa	tggtggcaag	caggcgctgg	agacgggtcca	gcggctgttg	1800
ccggtgctgt	gccaggccca	cggcttgacc	cggagcagg	tgggtggcat	cgccagcaat	1860
attggtggca	agcaggcgct	ggagacgggt	caggcgctgt	tgccggtgct	gtgccaggcc	1920
cacggcttga	ccccggagca	ggtggtggcc	atcgccagcc	acgatggcgg	caagcaggcg	1980
ctggagacgg	tccagcggt	gttgccggtg	ctgtgccagg	cccacggctt	gacccctcag	2040
caggtggtgg	ccatcgccag	caatggcgcc	ggcaggccgg	cgctggagag	cattgttgcc	2100
cagttatctc	gccctgatcc	ggcggtggcc	gcgttgacca	acgaccacct	cgtgccttg	2160
gcctgcctcg	gcgggctgcc	tgcgctggat	gcagtgaaaa	agggattggg	ggatcctatc	2220
agccgttccc	agctggtgaa	gtccgagctg	gaggagaaga	aatccgagtt	gaggcacaag	2280
ctgaagtacg	tgccccacga	gtacatcgag	ctgatcgaga	tcgcccggaa	cagcaccacg	2340
gaccgtatcc	tgagatgaa	ggtgatggag	ttcttcatga	aggtgtacgg	ctacaggggc	2400
aagcacctgg	gcggctccag	gaagcccgac	ggcgccatct	acaccggtgg	ctccccatc	2460
gactacggcg	tgatcgtgga	caccaaggcc	tactccggcg	gctacaacct	gccccatcg	2520
caggccgacg	aaatgcagag	gtacgtggag	gagaaccaga	ccaggaacaa	gcacatcaac	2580
cccaacgagt	ggtggaaggt	gtacccctcc	agcgtgacgg	agttcaagtt	cctgttcgtg	2640
tccggccact	tcaagggcaa	ctacaaggcc	cagctgacca	ggctgaacca	catcaccaac	2700



```

tgcaacggcg cegtgtgtgc cgtggaggag ctctgatcgc gcggcgagat gatcaaggcc 2760
ggcacctga ccctggagga ggtgaggagg aagttcaaca acggcgagat caacttcgcg 2820
cccactgat aa 2832

```

<210> 25

<211> 2814

<212> ДНК

<213> штучна послідовність

<220>

<223> GRex5T1-L TALEN

<400> 25

```

atgggcgatc ctaaaaagaa acgtaaggtc atcgattacc catacagatg tccagattac 60
gctatcgata tcgcgatctt acgcacgctc ggctacagcc agcagcaaca ggagaagatc 120
aaaccgaagg ttcgttcgac agtggcgagc caccacgagg cactggctcg ccacgggttt 180
acacacgcgc acatcggtgc gtttaagccaa caccggcagc cgttagggac cgtcgctgtc 240
aagtatcagg acatgatcgc agcgttgcca gaggcgacac acgaagcgat cgttggcgtc 300
ggcaaacagt ggtccggcgc acgcgctctg gaggccttgc tcacggtggc gggagagtgg 360
agaggtccac cgttacagtt ggacacaggg caactttctc agattgcaaa acgtgggggc 420
gtgaccgagc tggaggcagt gcatgcatgg cgcaatgcac tgacgggtgc ccgctcaac 480
ttgaccccc agcagggtgt ggccatcgcc agcaataatg gtggcaagca ggcgctggag 540
acggtccagc ggtcgttgcc ggtgctgtgc caggcccaag ccttgacccc ccagcaggtg 600
gtggccatcg ccagcaataa tgggtggcaag caggcgctgg agacggtcca gcggtgttg 660
ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc cccagcagg tggtggccat cgcagcaat 720
ggcgggtggc agcaggcgct ggagacggtc cagcggctgt tgccggtgct gtgccaggcc 780
cacggcctga cccccagca ggtggtggcc atcgccagca ataatggtgg caagcaggcg 840
ctggagacgg tccagcggct gttgcccgtg ctgtgccagg cccacggctt gacccccag 900
caggtggtgg ccatcgccag caatggcggt ggcaagcagg cgtggagac ggtccagcgg 960
ctgttgccgg tgetgtgcca gggccacggc ttgacccgg agcaggtggt ggccatcgcc 1020
agccacgatg gcggcaagca ggcgctggag acggtccagc ggtcgttgcc ggtgctgtgc 1080
caggcccaag ccttgacccc ggagcaggtg gtggccatcg ccagcaatat tgggtggcaag 1140
caggcgctgg agacggtgca ggcgctgttg ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc 1200
ccggagcagg tgggtggccat cgcacgccac gatggcgcca agcaggcgct ggagacggtc 1260
cagcggctgt tgccggtgct gtgccaggcc cagcgttga cccccagca ggtggtggcc 1320
atcgccagca atggcggtgg caagcaggcg ctggagacgg tccagcggct gttgccggtg 1380
ctgtgccagg cccacggctt gacccccag caggtggtgg ccatcgccag caataatggt 1440
ggcaagcagg cgtggagac ggtccagcgg ctgttgccgg tgetgtgcca gggccacggc 1500
ttgaccccc agcagggtgt ggccatcgcc agcaatggcg gtggcaagca ggcgctggag 1560
acggtccagc ggtcgttgcc ggtgctgtgc caggcccaag ccttgacccc ccagcaggtg 1620
gtggccatcg ccagcaatgg cgttggaagc caggcgctgg agacggtcca gcggtgttg 1680
ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc cccagcagg tggtggccat cgcagcaat 1740
aatggtggca agcaggcgct ggagacggtc cagcggctgt tgccggtgct gtgccaggcc 1800
cacggcttga cccccagca ggtggtggcc atcgccagca ataatggtgg caagcaggcg 1860
ctggagacgg tccagcggct gttgccggtg ctgtgccagg cccacggctt gacccccgag 1920
caggtggtgg ccatcgccag caatattggt ggcaagcagg cgtggagac ggtgcaggcg 1980
ctgttgccgg tgetgtgcca gggccacggc ttgacccctc agcaggtggt ggccatcgcc 2040
agcaatggcg gcggcaggcc ggcgctggag agcattgttg cccagtatc tcgcccctgat 2100
ccggcggtgg ccgcttgac caacgaccac ctctcgctt tggcctgctt cggcgggcgt 2160
cctgcgctgg atgcagtga aaagggattg ggggatccta tcagccgttc ccagctgggt 2220
aagtcagagc tggaggagaa gaaatccgag ttgaggcaca agctgaagta cgtgccccac 2280
gagtacatcg agctgatcga gatcgcccg aacagcacc aggaccgtat cctggagatg 2340
aaggtgatgg agttcttcac gaaggtgtac ggctacaggg gcaagcact gggcggtccc 2400
aggaagcccc acggcgccat ctacacgtg ggctccccc tcgactacgg cgtgatcgtg 2460
gacaccaagg cctactccgg cggctacaac ctgcccacgc gccaggccga cgaatgcag 2520
aggtacgtgg aggagaacca gaccaggaac aagcacatca accccaacga gtggtggaag 2580

```



```

gtgtaccctt ccagcgtgac cgagttcaag ttctgtgtcg tgtccggcca ctccaagggc 2640
aactacaagg cccagctgac caggctgaac cacatcacca actgcaacgg cgcgtgtgtg 2700
tcctggagg agctcctgat cggcggcgag atgatcaagg ccggcacctt gacctgtggag 2760
gaggtgagga ggaagttaaa caacggcgag atcaacttcg cggccgactg ataa 2814

```

<210> 26

<211> 2832

<212> ДНК

<213> штучна послідовність

<220>

<223> GRex5T1-R TALEN

<400> 26

```

atgggacgac ctaaaaagaa acgtaagggt atcgataagg agaccgcgcg tgccaagtgc 60
gagagacagc acatggacag catcgatata gccgatctac gcacgctcgg ctacagccag 120
cagcaacagg agaagatcaa accgaagggt cgttcgacag tggcgacgca ccacgaggca 180
ctggtcggcc acgggtttac acacgcgcac atcgttgctg taagccaaca cccggcagcg 240
ttagggaacc tcgctgtcaa gtatcaggac atgatcgag cgttgccaga ggcgacacac 300
gaagcgatcg ttggcgctcg caaacagtgg tccggcgcac gcgctctgga ggccttgcct 360
acgggtggcg gagagttag aggtccaccg ttacagttag acacaggcca acttctcaag 420
attgcaaaac gtggcgcgct gaccgcagtg gaggcagtg atgcatggcg caatgcactg 480
acgggtgccc cgctcaactt gaccccgag caggtggtgg ccatcgccag caatatgtgt 540
ggcaagcagg cgctggagac ggtgcaggcg ctggtgcccg tgcgtgtcca ggcacacggc 600
ttgaccccc agcagggtgt ggccatcgcc agcaatggcg gtggcaagca ggcgtggag 660
acggtccagc ggtcgttgcc ggtgctgtgc caggccacg gcttgacccc ggagcaggtg 720
gtggccatcg ccagccacga tggcgcaag caggcgctgg agacggtcca gcggtgtgt 780
ccggtgctgt gccagggcca cggcttgacc ccggagcagg tgggtggcat cgcacggcac 840
gatggcgcca agcaggcgct ggagacggtc cagcggtgtg tgcggtgtgt gtgccaggcc 900
cacggcttga cccccagca ggtggtggcc atcgccagca atggcggtg caagcaggcg 960
ctggagacgg tccagcggct gttgccgggt ctgtgccagg cccacggctt gacccccag 1020
caggtggtgg ccatcgccag caataatggt ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg 1080
ctggtgccgg tgcgtgtcca ggcacacggc ttgaccccg agcagggtgt ggccatcgcc 1140
agccacgatg gcggcaagca ggcgctggag acggtccagc ggtcgttgcc ggtgctgtgc 1200
caggccacg gcttgacccc ggagcaggtg gtggccatcg ccagcaatat tgggtggcaag 1260
caggcgctgg agacggtgca ggcgctgttg ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc 1320
ccccagcagg tgggtggcat cgccagcaat ggcggtggca agcaggcgct ggagcaggtc 1380
cagcggtgtg tgcggtgtgt gtgccaggcc cagcgcttga ccccgagca ggtggtggcc 1440
atcgccagca atattggtgg caagcaggcg ctggagacgg tgcaggcgct gttgccgggt 1500
ctgtgccagg cccacggctt gacccccag caggtggtgg ccatcgccag caatggcggt 1560
ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg ctggtgccgg tgcgtgtcca ggcacacggc 1620
ttgaccccg agcagggtgt ggccatcgcc agcaatatg gtggcaagca ggcgctggag 1680
acgggtgacg cgctgttgcc ggtgctgtgc caggccacg gcttgacccc ggagcaggtg 1740
gtggccatcg ccagcaatat tgggtggcaag caggcgctgg agacggtgca ggcgctgtgt 1800
ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc ccggagcagg tgggtggcat cgcacggcac 1860
gatggcgcca agcaggcgct ggagacggtc cagcggtgtg tgcggtgtgt gtgccaggcc 1920
cacggcttga ccccgagca ggtggtggcc atcgccagca atattggtgg caagcaggcg 1980
ctggagacgg tgcaggcgct gttgccgggt ctgtgccagg cccacggctt gacccctcag 2040
caggtggtgg ccatcgccag caatggcggc ggcaggcgcg cgctggagag cattgttgc 2100
cagttatctc gccctgatcc ggcgttgccc gcgttgacca acgaccacct cgtgccttg 2160
gcctgcctcg gcggcgctcc tgcgctggat gcagtgaata agggattggg ggtacctatc 2220
agccgttccc agctggtgaa gtccagctg gaggagaaga aatccgagtt gaggcacaag 2280
ctgaagtacg tgcgccacga gtacatcgag ctgacgaga tcgccggaa cagcaccacg 2340
gaccgtatcc tggagatgaa ggtgatggag ttcttcatag aggtgtacgg ctacaggggc 2400
aagcacctgg gcggctccag gaagcccgac ggcgccatct acaccgtggg ctcgcccatc 2460
gactacggcg tgatcgtgga caccaaggcc tactccggcg gctacaacct gcccatcggc 2520

```

```

caggccgacg aaatgcagag gtacgtggag gagaaccaga ccaggaacaa gcacatcaac 2580
cccaacgagt ggtggaaggt gtacccctcc agcgtgaccg agttcaagtt cctgttcgtg 2640
tccggccact tcaagggcaa ctacaaggcc cagctgacca ggctgaacca catcaccac 2700
tgcaacggcg ccgtgctgtc cgtggaggag ctccgtgatcg gcggcgagat gatcaaggcc 2760
ggcaccctga ccctggagga ggtgaggagg aagttcaaca ccggcgagat caacttcgcg 2820
gccgactgat aa 2832

```

<210> 27

<211> 2814

<212> ДНК

<213> штучна послідовність

<220>

<223> GRex5T2-L TALEN

<400> 27

```

atgggcgatc ctaaaaagaa acgtaaggto atcgattacc catacagatgt tccagattac 60
gctatcgata tcgccgatct acgcacgcto ggetacagcc agcagcaaca ggagaagatc 120
aaaccgaagg ttcgttcgac agtggcgagc caccacgagg cactggtcgg ccacgggttt 180
acacacgcg ccatcggttc gttaaagcaa caccggcgag cgttagggac cgtcgctgtc 240
aagtatcagg acatgatcgc agcgttgcca gaggcgacac acgaagcgat cgttggcggtc 300
ggcaaacagt ggtccggcgc acgcgctctg gaggccttgc tcacgggtggc gggagagttg 360
agagggtccac cgttacagtt ggacacaggc caacttctca agattgcaaa acgtggcggtc 420
gtgaccgcag tggaggcagt gcatgcattg cgcaatgcac tgacgggtgc cccgctcaac 480
ttgaccccg agcagggtgt ggcctatcgc agcaatattg gtggcaagca ggcgctggag 540
acgggtgcagg cgtgtgtgcc ggtgtgtgtc caggcccaag gcttgacccc ccagcagggtg 600
gtggccatcg ccagcaatgg cgttggaag caggcgctgg agacgggtcca ggggtgtgtg 660
ccggtgtgtg gccaggccca cggcttgacc cccagcagg tgggtggcat cgcagcaat 720
aatgggtggc agcaggcgct ggagacggto cagcggctgt tgcgggtgtc gtgccaggcc 780
cacggcttga ccccgagca ggtggtggcc atcgccagca atattggtgg caagcaggcg 840
ctggagacgg tgcaggcgct gttgccgggt ctgtgccagg cccacggctt gacccccag 900
cagggtgtgt ccatcgccag caatggcggt ggcaagcagg cgttgagac ggtccagcgg 960
ctgttgcgg tgctgtgcca ggcacacggc ttgaccccg agcagggtgt ggcctatgcc 1020
agcaatattg gtggcaagca ggcgctggag acggtgcagg cgtgtgtgcc ggtgtgtgtc 1080
caggcccaag gcttgacccc ccagcagggtg gtggccatcg ccagcaataa tgggtggcaag 1140
caggcgctgg agacgggtcca gcggtgtgtg ccggtgtgtg gccaggccca cggcttgacc 1200
ccggagcagg tgggtggcat cgcagccac gatggcgga agcaggcgct ggagacggtc 1260
cagcggtgtg tgcgggtgtc gtgccaggcc cagcgcttga ccccccagca ggtggtggcc 1320
atcgccagca atggcggtgg caagcaggcg ctggagacgg tccagcggtc gttgccgggtg 1380
ctgtgccagg cccacggctt gaccccgagg cagggtgtgt ccatcgccag ccacgatggc 1440
ggcaagcagg cgttgagac ggtccagcgg ctgttgccgg tgctgtgcca ggcacacggc 1500
ttgaccccc agcagggtgt ggcctatgcc agcaatggcg gtggcaagca ggcgctggag 1560
acgggtccag ggtgtgtgcc ggtgtgtgtc caggcccaag gcttgacccc ccagcagggtg 1620
gtggccatcg ccagcaataa tgggtggcaag caggcgctgg agacgggtcca gcggtgtgtg 1680
ccggtgtgtg gccaggccca cggcttgacc cccagcagg tgggtggcat cgcagcaat 1740
ggcggtggca agcaggcgct ggagacggto cagcggtgtg tgccggtgtc gtgccaggcc 1800
cacggcttga ccccccagca ggtggtggcc atcgccagca atggcggtgg caagcaggcg 1860
ctggagacgg tccagcggtc gttgccgggt ctgtgccagg cccacggctt gaccccgagg 1920
cagggtgtgt ccatcgccag ccacgatggc ggcaagcagg cgttgagac ggtccagcgg 1980
ctgttgccgg tgctgtgcca ggcacacggc ttgacccctc agcagggtgt ggcctatgcc 2040
agcaatggcg gcggcaggcc ggcgctggag agcattgttg cccagttatc tcgcccctgat 2100
ccggcggttg ccgctgtgac caacgaccac ctgctgcctc tggcctgcct cggcgggcgt 2160
cctgcgctgg atgcagttaa aaagggtatg ggggatccta tcagccgttc ccagctgggt 2220
aagtcagac tggaggagaa gaaatccag ttgaggcaca agctgaagta cgtgccccac 2280
gagtacatcg agctgatcga gatcgcccg aacagcacc aggacccgat cctggagatg 2340
aaggtgatgg agttcttcat gaagggtgac ggctacagg gcaagcacct gggcggtccc 2400

```

```

aggaagcccg acggcgccat ctacaccgtg ggctcccca tcgactacgg cgtgatcgtg 2460
gacaccaagg cctactccgg cggtacaac ctgcccacg gccaggccga cgaatgcag 2520
aggtagctgg aggagaacca gaccaggaac aagcacatca accccaacga gtggtggaag 2580
gtgtaccctt ccagcgtgac cgagttcaag ttccctgttcg tgtccggcca cttcaagggc 2640
aactacaagg ccagcgtgac caggctgaac cacatcacca actgcaacgg cgcgctgtcg 2700
tccgtggagg agctcctgat cggcggcgag atgatcaagg ccggcaccct gaccctggag 2760
gaggtaggga ggaagttaa caacggcgag atcaacttcg cgcccgactg ataa 2814

```

<210> 28

<211> 2832

<212> ДНК

<213> штучна послідовність

<220>

<223> GRex5T2-R TALEN

<400> 28

```

atgggcgatc ctaaaagaa acgtaaggtc atcgataagg agaccgccgc tgccaagttc 60
gagagacagc acatggacag catcgatatc gccgatctac gcacgctcgg ctacagccag 120
cagcaacagg agaagatcaa accgaagggt cgttcgacag tggcgcagca ccacgaggca 180
ctggtcggcc acgggtttac acacgcgcac atcgttgctg taagccaaca cccggcagcg 240
ttagggacgg tcgctgtcaa gtatcaggac atgatcgtag cgttgccaga ggccgacac 300
gaagcgatcg ttggcgtcgg caaacagtgg tccggcgcac gcgctctgga ggccttgcct 360
acggtggcgg gagagttgag aggtccaccg ttacagttgg acacaggcca acttctcaag 420
attgcaaaac gtggcgcggt gaccgcagtg gaggcagtg atgcatggcg caatgcactg 480
acgggtgccc cgtcgaactt gacccccag cagggtggtg ccatcgccag caataatggt 540
ggcaagcagg cgttgagac ggtccagcgg ctggtgcccg tgcgtgtcca ggccccggc 600
ttgaccccg agcaggtggt ggccatcgcc agcaatattg gtggcaagca ggcgctggag 660
acggtgcagg cgtgtgtgcc ggtgctgtgc caggcccacg gcttgacccc ccagcaggtg 720
gtggccatcg ccagcaataa tggtaggcaag caggcgctgg agacggtcca gcggtgttg 780
ccggtgctgt gccagcccca cggcttgacc ccggagcagg tggtagccat cgccagccac 840
gatggcgcca agcaggcgct ggagacgggt cagcggtgtg tgccggtgct gtgccaggcc 900
cacggcttga cccccagca ggtggtggcc atcgccagca ataaggtg caagcaggcg 960
ctggagacgg tccagcggtt gttgccgggt ctgtgccagg cccacggctt gacccccag 1020
cagggtggtg ccatcgccag caatggcggt ggcaagcagg cgttgagac ggtccagcg 1080
ctgttgccgg tgcgtgtcca ggccccggc ttgaccccg agcaggtggt ggccatcgcc 1140
agcaatattg gtggcaagca ggcgctggag acggtgcagg cgtgtgtgcc ggtgctgtgc 1200
caggcccaag gcttgacccc ccagcaggtg gtggccatcg ccagcaataa tggtaggcaag 1260
caggcgctgg agacggtcca cggctgttg ccggtgctgt gccagcccca cggcttgacc 1320
ccccagcagg tggtagccat cgccagcaat ggcggtggca agcaggcgct ggagacgggt 1380
cagcggtgtg tgccggtgct gtgccaggcc cagcgcttga cccggagca ggtggtggcc 1440
atcgccagcc acgatggcgg caagcaggcg ctggagacgg tccagcggtt gttgccgggt 1500
ctgtgccagg cccacggctt gaccccgagg cagggtggtg ccatcgccag caatattggt 1560
ggcaagcagg cgttgagac ggtgcaggcg ctgttgccgg tgcgtgtcca ggccccggc 1620
ttgacccccc agcaggtggt ggccatcgcc agcaatggcg gtggcaagca ggcgctggag 1680
acggtccagc ggtgtgtgcc ggtgctgtgc caggcccacg gcttgacccc ccagcaggtg 1740
gtggccatcg ccagcaataa tggtaggcaag caggcgctgg agacggtcca gcggtgttg 1800
ccggtgctgt gccagcccca cggcttgacc ccggagcagg tggtagccat cgccagcaat 1860
attggtggca agcaggcgct ggagacgggt caggcgctgt tgccggtgct gtgccaggcc 1920
cacggcttga cccccagca ggtggtggcc atcgccagca atggcggtg caagcaggcg 1980
ctggagacgg tccagcggtt gttgccgggt ctgtgccagg cccacggctt gacccctcag 2040
cagggtggtg ccatcgccag caatggcggt ggccagcggt cgttgagag cattgttgcc 2100
cagttatctc gccctgatcc ggcgttgccc gcgttgacca acgaccacct cgtgcgcttg 2160
gcctgcctcg gcggcggtcc tgcgctggat gcagtgaata agggattggg ggtccctatc 2220
agcgttccc agctggtgaa gtccgagctg gaggagaaga aatccgagtt gaggcacaag 2280
ctgaagtacg tgccccacga gtacatcgag ctgatcgaga tcgcccggaa cagcaccag 2340

```



```

gaccgtatcc tggagatgaa ggtgatggag ttcttcatga aggtgtacgg ctacaggggc 2400
aagcacctgg gcggctccag gaagcccgac ggcgccatct acacggtggg ctccccatc 2460
gactacggcg tgatcgtgga caccaaggcc tactccggcg gctacaacct gcccatcggc 2520
caggccgacg aaatgcagag gtacgtggag gagaaccaga ccaggaacaa gcacatcaac 2580
cccaacgagt ggtggaaggt gtacccctcc agcgtgaccg agttcaagtt cctgttcgtg 2640
tccggccact tcaagggaac ctacaaggcc cagctgacca ggctgaacca catcaccaac 2700
tgcaacggcg ccgtgctgtc cgtggaggag ctctgatcgc gcggcgagat gatcaaggcc 2760
ggcacccctga ccctggagga ggtgaggagg aagttcaaca acggcgagat caacttcgcg 2820
gccgactgat aa 2832

```

<210> 29

<211> 2814

<212> ДНК

<213> штучна послідовність

<220>

<223> GRex5T3-L TALEN

<400> 29

```

atgggcgatc ctaaaaagaa acgtaaggtc atcgattacc catacagatg tccagattac 60
gctatcgata tcgccgatct acgcacgctc ggctacagcc agcagcaaca ggagaagatc 120
aaaccgaagg ttcggtcgac agtggcgag caccacgagg cactggtcgg ccacgggttt 180
acacacgcgc acatcgttgc gttaagccaa caccgcgcag cgttagggac cgtcgctgtc 240
aagtatcagg acatgatcgc agcgttgcca gaggcgacac acgaagcgat cgttggcgtc 300
ggcaaacagt ggtccggcgc acgcgctctg gaggccttgc tcacgggtgg gggagagttg 360
agagggtcac cgttacagtt ggacacaggg caacttctca agattgcaaa acgtggcgcg 420
gtgaccgcag tggaggcagt gcatgcatgg cgcaatgcac tgacgggtgc cccgctcaac 480
ttgaccccc agcaggtggt ggccatcgcc agcaatggcg gtggcaagca ggcgctggag 540
acggtccagc ggtctgttgc ggtgctgtgc caggccacg gcttgacccc ggagcaggtg 600
gtggccatcg ccagcaatat tggtggaag caggcgctgg agacggtgca ggcgctgttg 660
ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc cccacgagg tgggggcat cgcagcaaat 720
ggcgggtgca agcaggcgct ggagacggtc cagcggtgtg tgccggtgct gtgccaggcc 780
cacggcttga ccccgagca ggtggtggcc atcgccagca atattggtgg caagcaggcg 840
ctggagacgg tgccaggcgt gttgccgggt ctgtgccagg cccacggctt gacccccag 900
cagggtggtg ccacggtt caatggcggt ggcaagcagg cgtggagac ggtccagcgg 960
ctgttgccgg tgctgtgcca ggccccaggg ttgaccccc agcaggtggt ggccatcgcc 1020
agcaataatg gtggcaagca ggcgctggag acggtccagc ggtgtgtgcc ggtgctgtgc 1080
caggccacag gcttgacccc ggagcaggtg gtggccatcg ccagccacga tggcggaag 1140
caggcgctgg agacggtcca cggcgctgtg cgggtgctgt gccaggccca cggcttgacc 1200
ccggagcagg tggtgcccat cgccagcaat attggtggca agcaggcgct ggagacgggtg 1260
caggcgctgt tgccggtgct gtgccaggcc caggccttga cccccagca ggtggtggcc 1320
atcgccagca ataagtgtgg caagcaggcg ctggagacgg tccagcggtg gttgcccgtg 1380
ctgtgccagg cccacggctt gacccccag cagggtgtgg ccatcgccag caataatggt 1440
ggcaagcagg cgtggagac ggtccagcgg ctgttgccgg tgctgtgcca ggccccaggg 1500
ttgaccccg agcaggtggt ggccatcgcc agcaatatg gtggcaagca ggcgctggag 1560
acgggtcagg cgtgtgtgcc ggtgctgtgc caggccacg gcttgacccc ccagcaggtg 1620
gtggccatcg ccagcaatgg cggtggaag caggcgctgg agacggtcca cgggtgtgtg 1680
ccgggtgctgt gccaggccca cggcttgacc cggagcagg tggtgccat cgccagcaat 1740
attggtggca agcaggcgct ggagacgggt caggcgctgt tgccggtgct gtgccaggcc 1800
cacggcttga cccccagca ggtggtggcc atcgccagca atggcggtgg caagcaggcg 1860
ctggagacgg tccagcggt gttgccgggt ctgtgccagg cccacggctt gacccccag 1920
cagggtggtg ccatcgccag caataatggt ggcaagcagg cgtggagac ggtccagcgg 1980
ctgttgccgg tgctgtgcca ggccccaggg ttgacccctc agcaggtggt ggccatcgcc 2040
agcaatggcg gcggcaggcc ggcgctggag agcattgttg ccagttatc tcgccctgat 2100
ccggcggtgg ccgcttgac caacgaccac ctgctgcct tggcctgcct cggcgggcgt 2160
cctgcgctgg atgcagtga aaagggattg ggggatccta tcagccgttc ccagctggtg 2220

```

```

aagtccgagc tggaggagaa gaaatccgag ttgaggcaca agctgaagta cgtgccccac 2280
gagtacatcg agctgatcga gatcgcccgg aacagcaccg aggaccgtat cctggagatg 2340
aaggtgatgg agttcttcat gaaggtgtac ggctacaggg gcaagcacct gggcggtctc 2400
aggaagcccg acggcgccat ctacaccgtg ggctccccc tgcactacgg cgtgatcgtg 2460
gacaccaagg cctactccgg cggctacaac ctgcccacg gccaggccga cgaatgacg 2520
aggtacgtgg aggagaacca gaccaggaac aagcacatca cccccaacga gtggtggaag 2580
gtgtaccctt ccagcgtgac caggttcaag ttcctgttcg tgtccggcca cttcaagggc 2640
aactacaagg ccagcgtgac caggtgaac cacatcacca actgcaacgg cgcgtgctg 2700
tcctgtgagg agctcctgat cggcgccgag atgatcaagg ccggcacctt gacctggag 2760
gaggtgagga ggaagttcaa caacggcgag atcaacttcg cggcgactg ataa 2814

```

<210> 30

<211> 2832

<212> ДНК

<213> штучна послідовність

<220>

<223> GRex5T3-R TALEN

<400> 30

```

atgggcgatc ctaaaaagaa acgtaaggtc atcgataagg agaccgcccg tgccaagttc 60
gagagacagc acatggacag catcgatata gccgatctac gcacgctcgg ctacagccag 120
cagcaacagg agaagatcaa accgaagggt cgttcgacag tggcgacaga ccacaggcca 180
ctggtcgggc acgggtttac acacgcgcac atcgttgctg taagccaaca cccggcagcg 240
ttagggaacc tcgctgtcaa gtatcaggac atgatcgacg cgttgccaga ggcgacacac 300
gaagcgatcg ttggcgtcgg caaacagtgg tccggcgcac gcgctctgga ggcttctgc 360
acggtggcgg gagagttag aggtccaccg ttacagttag acacaggcca acttctcaag 420
attgcaaaac gtggcgcgct gaccgcagtg gaggcagtg atgcatggcg caatgcactg 480
acgggtgccc cgtcgaactt gacccccag caggtggtgg ccatcgccag caataatggt 540
ggcaagcagg cgtcgagac ggtccagcgg ctgttgccgg tgcgtgcca gggccacggc 600
ttgaccccg agcaggtggt ggccatcgcc agcaatattg gtggcaagca ggcgctggag 660
acggtgcagg cgtgttgcc ggtgtgtgac caggcccaag gcttgacccc ccagcaggtg 720
gtggccatcg ccagcaatgg cgttgccaag caggcgctgg agacggtcca gcggtggtg 780
ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc ccggagcagg tgggtggccat cggcagccac 840
gatggcgcca agcaggcgct ggagacggtc cagcggtgtg tgccggtgct gtgccaggcc 900
cacggcttga ccccgagca ggtggtggcc atcgccagcc acgatggcgg caagcaggcg 960
ctggagacgg tcacagcggt gttgccgggt ctgtgccagg cccacggcct gacccccag 1020
caggtggtgg ccatcgccag caatggcggt ggcaagcagg cgtggagac ggtccagcgg 1080
ctgttgccgg tgcgtgcca gggccacggc ttgaccccg agcaggtggt ggccatcgcc 1140
agccacgatg gcggcaagca ggcgctggag acggtccagc ggctgtgccc ggtgctgtgc 1200
caggcccaag gcttgacccc ggagcaggtg gtggccatcg ccagccacga tggcggaag 1260
caggcgctgg agacggtcca cggctgttg ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc 1320
ccggagcagg tgggtggccat cggcagcaat attggtggca agcaggcgct ggagacggtg 1380
caggcgctgt tgcggtgtgt gtgccaggcc cagcgcttga ccccgagca ggtggtggcc 1440
atcgccagca atattggtgg caagcagcgg ctggagacgg tgcaggcgct gttgccgggt 1500
ctgtgccagg cccacggctt gacccccag caggtggtgg ccatcgccag caataatggt 1560
ggcaagcagg cgtcgagac ggtccagcgg ctgttgccgg tgcgtgcca gggccacggc 1620
ttgacccccc agcaggtggt ggccatcgcc agcaatggcg gtggcaagca ggcgctggag 1680
acggtccagc ggtgtgtgccc ggtgctgtgc caggcccaag gcttgacccc ccagcaggtg 1740
gtggccatcg ccagcaatgg cgttgccaag caggcgctgg agacggtcca gcggtgtgtg 1800
ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc cccagcagg tgggtggccat cggcagcaat 1860
aatggtggca agcaggcgct ggagacggtc cagcggtgtg tgcggtgtgt gtgccaggcc 1920
cacggcttga ccccgagca ggtggtggcc atcgccagca atattggtgg caagcaggcg 1980
ctggagacgg tgcaggcgct gttgccgggt ctgtgccagg cccacggctt gacccctcag 2040
caggtggtgg ccatcgccag caatggcgcc ggcaaggcgg cgtggagag cattgtgtgc 2100
cagttatctc gccctgatcc ggcgttgccc gcgttgacca acgaccacct cgtcgccctg 2160

```

```

gctgcctcg gcgggcgctcc tgcgctggat gcagtgaaaa agggattggg ggatcctatc 2220
agccgttccc agctgggtgaa gtccgagctg gaggagaaga aatccgagtt gaggcacaag 2280
ctgaagtacg tgccccacga gtacatcgag ctgatcgaga tcgcccggaa cagcaccacg 2340
gaccgtatcc tggagatgaa ggtgatggag ttcttcatga aggtgtacgg ctacaggggc 2400
aagcacctgg gcggtccag gaagcccgac ggcgccatct acaccgtggg ctccccatc 2460
gactacggcg tgatcgtgga caccaaggcc tactccggcg gctacaacct gcccatcggc 2520
caggccgacg aaatgcagag gtacgtggag gagaaccaga ccaggaacaa gcacatcaac 2580
cccaacgagt ggtggaaggt gtacccctcc agcgtgaccg agttcaagtt cctgttcgtg 2640
tcgggccact tcaagggcaa ctacaaggcc cagctgacca ggctgaacca catcaccaac 2700
tgcaacggcg ccgtgctgtc cgtggaggag ctctgatcg gcggcgagat gatcaaggcc 2760
ggcaccctga ccctggagga ggtgaggagg aagttcaaca acggcgagat caacttcgcg 2820
gccgactgat aa 2832

```

<210> 31

<211> 60

<212> ДНК

<213> штучна послідовність

<220>

<223> прями́й праймер ексона 2 GR

<220>

<221> misc\_feature

<222> (31); (32); (33); (34); (35); (36); (37); (38); (39); (40)

<223> п являє собою а або с, або t, або g

<400> 31

```
ccatctcatc cctgcgtgtc tccgactcag nnnnnnnnnn gggttcattta acaagctgcc 60
```

<210> 32

<211> 60

<212> ДНК

<213> штучна послідовність

<220>

<223> прями́й праймер ексона 3 GR

<220>

<221> misc\_feature

<222> (31); (32); (33); (34); (35); (36); (37); (38); (39); (40)

<223> п являє собою а або с, або t, або g

<400> 32

```
ccatctcatc cctgcgtgtc tccgactcag nnnnnnnnnn gcattctgac tatgaagtga 60
```

<210> 33

<211> 69

<212> ДНК

<213> штучна послідовність

<220>

<223> прями́й праймер ексона 5 GR

```

<220>
<221> misc_feature
<222> (31); (32); (33); (34); (35); (36); (37); (38); (39); (40)
<223> п являє собою а або с, або т, або г

<400> 33
ccatctcatc cctgcgtgtc tccgactcag nnnnnnnnnn tcagcaggcc actacaggag 60
tctcacaag 69

<210> 34

<211> 50
<212> ДНК
<213> штучна послідовність

<220>
<223> зворотний праймер ексона 2 GR

<400> 34
cctatcccct gtgtgccttg gcagtctcag agccagtgag ggtgaagacg 50

<210> 35

<211> 50
<212> ДНК
<213> штучна послідовність

<220>
<223> зворотний праймер ексона 3 GR

<400> 35
cctatcccct gtgtgccttg gcagtctcag gggctttgca tataatggaa 50

<210> 36

<211> 59
<212> ДНК
<213> штучна послідовність

<220>
<223> зворотний праймер ексона 5 GR

<400> 36
cctatcccct gtgtgccttg gcagtctcag ctgactctcc ccttcatagt cccagaac 59

<210> 37

<211> 49
<212> ДНК
<213> штучна послідовність

<220>

```

```

<223> TRAC_T01

<400> 37
ttgtcccaca gatatccaga accctgaccc tgccgtgtac cagctgaga 49

<210> 38

<211> 49
<212> ДНК
<213> штучна послідовність

<220>
<223> TRBC_T01

<400> 38
tgtgtttgag ccatcagaag cagagatctc ccacacccaa aaggccaca 49

<210> 39

<211> 50
<212> ДНК
<213> штучна послідовність

<220>
<223> TRBC_T02

<400> 39
ttcccacccg aggtcgctgt gtttgagcca tcagaagcag agatctccca 50

<210> 40

<211> 49
<212> ДНК
<213> штучна послідовність

<220>
<223> CD52_T02

<400> 40
ttcctctac tcaccatcag cctcctgggt atggtacagg taagagcaa 49

<210> 41

<211> 530
<212> PRT
<213> штучна послідовність

<220>
<223> Повтор TRAC_T01-L

<400> 41
Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys
1 5 10 15

```



Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala  
20 25 30

His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly  
35 40 45

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys  
50 55 60

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn  
65 70 75 80

Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val  
85 90 95

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala  
100 105 110

Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu  
115 120 125

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala  
130 135 140

Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg  
145 150 155 160

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val  
165 170 175

Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val  
180 185 190

Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu  
195 200 205

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu  
210 215 220

Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr  
225 230 235 240

Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala  
 245 250 255  
 Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly  
 260 265 270  
 Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys  
 275 280 285  
 Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala  
 290 295 300  
 His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly  
 305 310 315 320  
 Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys  
 325 330 335  
 Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn  
 340 345 350  
 Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val  
 355 360 365  
 Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala  
 370 375 380  
 Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu  
 385 390 395 400  
 Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala  
 405 410 415  
 Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala  
 420 425 430  
 Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val  
 435 440 445  
 Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val  
 450 455 460  
 Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu  
 465 470 475 480

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu  
485 490 495

Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr  
500 505 510

Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Arg Pro Ala  
515 520 525

Leu Glu  
530

<210> 42

<211> 530

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> Повтор TRAC\_T01-R

<400> 42

Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys  
1 5 10 15

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala  
20 25 30

His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly  
35 40 45

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys  
50 55 60

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His  
65 70 75 80

Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val  
85 90 95

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala  
100 105 110

Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu  
115 120 125

```

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala
 130                      135                      140

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

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val
                      165                      170                      175

Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val
                      180                      185                      190

Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln
                      195                      200                      205

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
210                      215                      220

Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
225                      230                      235                      240

Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala
                      245                      250                      255

Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly
                      260                      265                      270

Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys
                      275                      280                      285

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala
290                      295                      300

His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly
305                      310                      315                      320

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
                      325                      330                      335

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn
340                      345                      350

```

```

Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val
    355                      360                      365

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala
    370                      375                      380

Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu
    385                      390                      395                      400

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala
    405                      410                      415

Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala
    420                      425                      430

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val
    435                      440                      445

Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val
    450                      455                      460

Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln
    465                      470                      475                      480

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
    485                      490                      495

Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
    500                      505                      510

Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Arg Pro Ala
    515                      520                      525

Leu Glu
    530

<210> 43

<211> 530
<212> PRT
<213> штучна послідовність

<220>
<223> Повтор TRBC_T01-L

<400> 43

```

```

Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys
1          5          10          15

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala
20          25          30

His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly
35          40          45

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
50          55          60

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn
65          70          75          80

Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val
85          90          95

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala
100         105         110

Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu
115         120         125

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala
130         135         140

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

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val
165         170         175

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

Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln
195         200         205

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
210         215         220

Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
225         230         235         240

```

Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala  
245 250 255

Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly  
260 265 270

Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys  
275 280 285

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala  
290 295 300

His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly  
305 310 315 320

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys  
325 330 335

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His  
340 345 350

Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val  
355 360 365

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala  
370 375 380

Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu  
385 390 395 400

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala  
405 410 415

Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg  
420 425 430

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val  
435 440 445

Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val  
450 455 460

Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu  
465 470 475 480

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu  
485 490 495

Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr  
500 505 510

Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Arg Pro Ala  
515 520 525

Leu Glu  
530

<210> 44

<211> 530

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> Повтор TRBC\_T01-R

<400> 44

Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys  
1 5 10 15

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala  
20 25 30

His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly  
35 40 45

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys  
50 55 60

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn  
65 70 75 80

Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val  
85 90 95

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala  
100 105 110



```

Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu
  115                      120                      125

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala
  130                      135                      140

Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg
  145                      150                      155                      160

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val
  165                      170                      175

Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val
  180                      185                      190

Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln
  195                      200                      205

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
  210                      215                      220

Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
  225                      230                      235                      240

Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala
  245                      250                      255

Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly
  260                      265                      270

Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys
  275                      280                      285

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala
  290                      295                      300

His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly
  305                      310                      315                      320

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
  325                      330                      335

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn
  340                      345                      350

```

Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val  
355 360 365

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala  
370 375 380

Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu  
385 390 395 400

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala  
405 410 415

Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg  
420 425 430

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val  
435 440 445

Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val  
450 455 460

Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln  
465 470 475 480

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu  
485 490 495

Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr  
500 505 510

Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Arg Pro Ala  
515 520 525

Leu Glu  
530

<210> 45

<211> 530

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> Повтор TRBC\_T02-L

```

<400> 45
Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys
1      5      10      15

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala
20      25      30

His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly
35      40      45

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
50      55      60

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His
65      70      75      80

Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val
85      90      95

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala
100     105     110

Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu
115     120     125

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala
130     135     140

Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg
145     150     155     160

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val
165     170     175

Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val
180     185     190

Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu
195     200     205

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
210     215     220

```

```

Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
225                               230               235           240

Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala
                245               250           255

Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly
                260               265           270

Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys
                275               280           285

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala
                290               295           300

His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly
305                               310               315           320

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
                325               330           335

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn
                340               345           350

Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val
                355               360           365

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala
                370               375           380

Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu
385                               390               395           400

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala
                405               410           415

Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg
                420               425           430

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val
                435               440           445

Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val
                450               455           460

```

Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu  
465 470 475 480

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu  
485 490 495

Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr  
500 505 510

Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Arg Pro Ala  
515 520 525

Leu Glu  
530

<210> 46

<211> 530

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> Повтор TRBC\_T02-R

<400> 46

Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys  
1 5 10 15

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala  
20 25 30

His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly  
35 40 45

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys  
50 55 60

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn  
65 70 75 80

Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val  
85 90 95

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala  
100 105 110

```

Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu
  115                               120                   125

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala
  130                               135                   140

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

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val
  165                               170                   175

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

Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln
  195                               200                   205

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
  210                               215                   220

Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
  225                               230                   235                   240

Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala
  245                               250                   255

Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly
  260                               265                   270

Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys
  275                               280                   285

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala
  290                               295                   300

His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly
  305                               310                   315                   320

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
  325                               330                   335

```

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn  
340 345 350

Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val  
355 360 365

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala  
370 375 380

Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu  
385 390 395 400

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala  
405 410 415

Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg  
420 425 430

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val  
435 440 445

Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val  
450 455 460

Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln  
465 470 475 480

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu  
485 490 495

Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr  
500 505 510

Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Arg Pro Ala  
515 520 525

Leu Glu  
530

<210> 47

<211> 530

<212> PRT

<213> штучна послідовність

```

<220>
<223>  Повтор CD52_T02-L

<400>  47
Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys
1          5          10          15

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala
          20          25          30

His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly
          35          40          45

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
          50          55          60

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His
          65          70          75          80

Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val
          85          90          95

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala
          100          105          110

Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu
          115          120          125

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala
          130          135          140

Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg
          145          150          155          160

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val
          165          170          175

Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val
          180          185          190

Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln
          195          200          205

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
          210          215          220

```



```

Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
225                      230                      235                      240

Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala
                245                      250                      255

Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly
                260                      265                      270

Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys
                275                      280                      285

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala
                290                      295                      300

His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly
305                      310                      315                      320

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
                325                      330                      335

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His
                340                      345                      350

Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val
                355                      360                      365

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala
                370                      375                      380

Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu
385                      390                      395                      400

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala
                405                      410                      415

Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg
                420                      425                      430

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val
                435                      440                      445

```

```

Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val
 450                      455                      460

Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu
465                      470                      475                      480

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
                      485                      490                      495

Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
                      500                      505                      510

Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Arg Pro Ala
                      515                      520                      525

Leu Glu
 530

<210>  48

<211>  530
<212>  PRT
<213>  штучна послідовність

<220>
<223>  Повтор CD52_T02-R

<400>  48
Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys
 1                      5                      10                      15

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala
                      20                      25                      30

His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly
                      35                      40                      45

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
                      50                      55                      60

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His
65                      70                      75                      80

Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val
                      85                      90                      95

```

```

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala
  100                               105                       110

Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu
  115                               120                       125

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala
  130                               135                       140

Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg
  145                               150                       155                       160

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val
  165                               170                       175

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

Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln
  195                               200                       205

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
  210                               215                       220

Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
  225                               230                       235                       240

Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala
  245                               250                       255

Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly
  260                               265                       270

Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys
  275                               280                       285

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala
  290                               295                       300

His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly
  305                               310                       315                       320

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
  325                               330                       335

```

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn  
340 345 350

Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val  
355 360 365

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala  
370 375 380

Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu  
385 390 395 400

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala  
405 410 415

Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg  
420 425 430

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val  
435 440 445

Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val  
450 455 460

Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu  
465 470 475 480

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu  
485 490 495

Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr  
500 505 510

Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Arg Pro Ala  
515 520 525

Leu Glu  
530

<210> 49

<211> 2814

<212> ДНК  
 <213> штучна послідовність

<220>  
 <223> TRAC\_T01-L TALEN

```

<400> 49
atgggcgatc ctaaaagaa acgtaagggtc atcgattacc catacagatg tccagattac 60
gctatcgata tcgccgatct acgcacgctc ggctacagcc agcagcaaca ggagaagatc 120
aaacgaagg ttggttcgac agtggcgag caccacgagg cactggtcgg ccacgggttt 180
acacacgagc acatcggttg gttaagccaa caccggcag cgttagggac cgtcgctgtc 240
aagtatcagg acatgatcgc agcgttgcc gaggcgacac acgaagcgat cgttggcgte 300
ggcaaacagt ggtccggcgc acgcgctctg gaggccttgc tcacggttgg gggagagtgt 360
agaggtccac cgttacagtt ggacacagge caacttctca agattgcaaa acgtggcgge 420
gtgaccgagc tggaggcagt gcatgcatgg cgcaatgcac tgacgggtgc cccgctcaac 480
ttgaccccc agcaggtggt ggccatcgcc agcaatggcg gtggcaagca ggcgctggag 540
acggccagc ggcgtgtgcc ggtgctgtgc caggccacg gcttgacccc ccagcaggtg 600
gtggccatcg ccagcaataa tgggtggcaag caggcgctgg agacggtcca ggcgctgttg 660
ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc cccagcagg tggggccat ccgagcaat 720
gacgggtgca agcaggcgct ggagacgggtc cagcggtgtg tgcggtgtgt gtcgagggc 780
cacggcttga cccggagca ggtggtggcc atcgccagcc acgatggcgg caagcaggcg 840
ctggagacgg tccagcggtt gttccgggtg ctgtgccagg cccacggctt gacccggag 900
caggtggtgg ccacgcccag ccacgatggc ggcaagcagg cgtggagac ggtccagcgg 960
ctgttgccgg tctgtgcca ggccacggc ttgacccgg agcaggtggt ggccatcgcc 1020
agccacgatg gcggcaagca ggcgctggag acggtccagc ggcgtgtgcc ggtgctgtgc 1080
caggccacg gcttgacccc ggagcaggtg gtggccatcg ccagcaataa tgggtggcaag 1140
caggcgctgg agacggtgca ggcgctgttg ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc 1200
ccggagcagg tggtgccat cgccagccac gatggcgcca agcaggcgct ggagacgggtc 1260
cagcggtgtg tccgggtgct gtgccaggcc cagcgcttga cccggagca ggtggtggcc 1320
atcgccagca atattggtgg caagcaggcg ctggagacgg tgcaggcgct gttgccggtg 1380
ctgtgccagg cccacggctt gacccccag caggtggtgg ccacgcccag caataatggt 1440
ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg ctgttgccgg tctgtgcca ggccacggc 1500
ttgacccgg agcaggtggt ggccatcgcc agcaatatg gtggcaagca ggcgctggag 1560
acggtgcagg cgtggtgcc ggtgctgtgc caggccacg gcttgacccc ccagcaggtg 1620
gtggccatcg ccagcaatgg cgggtggcaag caggcgctgg agacggtcca ggcgctgttg 1680
ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc ccggagcagg tggtgccat cgccagcaat 1740
attggtggca agcaggcgct ggagacgggtg caggcgctgt tccggtgtgt gtcgagggc 1800
cacggcttga ccccccagca ggtggtggcc atcgccagca atggcggtg caagcaggcg 1860
ctggagacgg tccagcggtt gttgccgggt ctgtgccagg cccacggctt gacccggag 1920
caggtggtgg ccacgcccag ccacgatggc ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg 1980
ctgttgccgg tctgtgcca ggccacggc ttgacccctc agcaggtggt ggccatcgcc 2040
agcaatggcg gcggcaggcc ggcgctggag agcattgttg cccagttatc tcgccctgat 2100
ccggcggtgg ccggttgac caacgaccac ctctgcctt tggcctgctt cggcggtgtg 2160
cctgcgctgg atcgagtga aaagggattg ggggatacta tcagccgttc ccagctggtg 2220
aagtcgagc tggaggagaa gaaatccgag ttgaggcaca agctgaagta cgtgccccac 2280
gagtacatcg agctgatcga gatcgccgg aacagcacc aggaccgat cctggagatg 2340
aaggtgatgg agttcttcat gaaggtgtac ggctacaggg gcaagcaact gggcggtctc 2400
aggaagcccc acggcgccat ctacacggtg ggctccccc tcgactacgg cgtgatcgtg 2460
gacaccaagg ctaactcgg cggtacaac ctgcccacg gccaggccga cgaatgcag 2520
aggtacgtgg aggagaacca gaccaggaac aagcacatca acccaacga gtggtggaag 2580
gtgtacccct ccagcgtgac cgagttcaag ttcctgtctg tgcgggcca cttaagggc 2640
aactacaagg ccagctgac caggctgaac cacatcacca actgcaacgg cgccgtgctg 2700
tccgtggagg agctcctgat cggcgcgag atgatcaagg ccggcacctt gaccctggag 2760
gaggtgagga ggaagtcaa caacggcgag atcaacttcg cggccgactg ataa 2814

```

<210> 50

<211> 2832  
 <212> ДНК  
 <213> штучна послідовність

<220>  
 <223> TRAC\_T01-R TALEN

```

<400> 50
atgggcgatc ctaaaagaa acgtaaggtc atcgataagg agaccgccgc tgccaagttc 60
gagagacagc acatggacag catcgatatc gccgatctac gcacgctcgg ctacagccag 120
cagcaacagg agaagatcaa accgaagggt cgttcgacag tggcgacgca ccacgaggca 180
ctgggtcggcc acgggtttac acacgcgcac atcgttgctg taagccaaca ccggcgagcg 240
ttagggaaccg tcgctgtcaa gtatcaggac atgacgcgag cgttgccaga ggcgacacac 300
gaagcgatcg ttggcgctcg caaacagtgg tccggcgcac gcgctctgga ggcttgctc 360
acgggtggcgg gagagttgag aggtccaccg ttacagttgg acacaggcca acttctcaag 420
attgcaaaac gtggcgcgct gaccgcagtg gaggcagtgc atgcatggcg caatgcactg 480
acgggtgcccc cgtcaactt gaccccgag caggtggtgg ccacgccag ccacgatggc 540
ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg ctggtgcccg tgctgtgcca ggcccacggc 600
ttgaccccc agcaggtggt ggccatcgcc agcaatggcg gtggcaagca ggcgctggag 660
acgggtccagc ggtgcttgcc ggtgctgtgc caggccacg gcttgacccc ggagcaggtg 720
gtggccatcg ccagccacga tggcggaag caggcgctgg agacggtcca gcggtggtg 780
ccggtgctgt gccaggccca cggttgacc cggagcagg tgggtggcat cgcagcaat 840
attggtggca agcaggcgct ggagacgggt caggcgctgt tgcgggtgct gtgccaggcc 900
cacggcttga cccccagca ggtggtggcc atcgccagca ataagtgtg caagcaggcg 960
ctggagacgg tccagcggct gttgccggtg ctgtgccagg cccacggctt gacccggag 1020
caggtggtgg ccacgccag ccacgatggc ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg 1080
ctgttgccgg tgctgtgcca ggcccacggc ttgaccccc agcaggtggt ggccatcgcc 1140
agcaatggcg gtggcaagca ggcgctggag acgggtccagc ggtgcttgcc ggtgctgtgc 1200
caggccacg gcttgacccc ccagcaggtg gtggccatcg ccagcaataa tggtggaag 1260
caggcgctgg agacggtcca gcggtgctg ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc 1320
ccccagcagg tgggtggcat cgccagcaat aatggtggca agcaggcgct ggagacgggt 1380
cagcggtgtg tgccggtgct gtgccaggcc cagcgcttga cccccagca ggtggtggcc 1440
atcgccagca atggcggtg caagcaggcg ctggagacgg tccagcggct gttgccggtg 1500
ctgtgccagg cccacggctt gaccccgag caggtggtgg ccacgccag caatattggt 1560
ggcaagcagg cgctggagac ggtgcaggcg ctgttgccgg tgctgtgcca ggcccacggc 1620
ttgaccccc agcaggtggt ggccatcgcc agccacgat gcggcaagca ggcgctggag 1680
acgggtccagc ggtgcttgcc ggtgctgtgc caggccacg gcttgacccc ggagcaggtg 1740
gtggccatcg ccagcaatat tgggtggcaag caggcgctgg agacggtgca ggcgctgttg 1800
ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc ccggagcagg tgggtggcat cgccagccac 1860
gatggcgcca agcaggcgct ggagacgggt cagcggtgtg tgccggtgct gtgccaggcc 1920
cacggcttga cccccagca ggtggtggcc atcgccagca ataagtgtg caagcaggcg 1980
ctggagacgg tccagcggct gttgccggtg ctgtgccagg cccacggctt gacccctcag 2040
caggtggtgg ccacgccag caatggcgcc ggcaggcgcg cgctggagag cattgttgcc 2100
cagttatctc gccctgatcc ggcgttgccc gcgttgacca acgaccacct cgtcgcttg 2160
gcctgcctcg gcggcgctcc tgcgctggat gcagtgaata agggattggg ggtacctatc 2220
agccgttccc agctggtgaa gtccgagctg gaggagaaga aatccgagtt gaggcacaag 2280
ctgaagtacg tgccccacga gtacatcgag ctgacgaga tcgcccggaa cagcacccag 2340
gaccgtatcc tggagatgaa ggtgatggag ttcttcatag aggtgtacgg ctacaggggc 2400
aagcacctgg gcggtccag gaagcccgac ggcgcatct acaccgtggg ctcccccatc 2460
gactacggcg tgatcgtgga caccaaggcc tactccggcg gctacaacct gcccacggc 2520
caggccgacg aaatgcagag gtacgtggag gagaaccaga ccaggaacaa gcacatcaac 2580
cccaacgagt ggtggaaggt gtacccctcc agcgtgaccg agttcaagtt cctgttcgtg 2640
tccggccact tcaagggcaa ctacaaggcc cagctgacca ggtgaaacca catcaccaac 2700
tgcaacggcg ccgtgctgtc cgtggaggag ctctgatcg gcggcgagat gatcaaggcc 2760
ggcaccctga ccctggaggga ggtgaggagg aagttcaaca acggcgagat caacttcgcg 2820
gcgactgat aa 2832

```



```

<210> 51
<211> 2814
<212> ДНК
<213> штучна послідовність

<220>
<223> TRBC_T01-L TALEN

<400> 51
atgggcgatc ctaaaaagaa acgtaagggtc atcgattacc catacgatgt tccagattac 60
gctatcgata tcgccgatct acgcacgctc ggctacagcc agcagcaaca ggagaagatc 120
aaaccgaagg ttcgttcgac agtggcgag caccacgagg cactggtcgg ccacgggttt 180
acacacgcgc acatcggttc gttaaagcaa caccgggag cgttagggac cgtcgctgtc 240
aagtatcagg acatgatcgc agcgttgcca gaggcgacac acgaagcgat cgttggcgctc 300
ggcaaacagt ggtccggcgc acgcgctctg gaggccttgc tcacggtggc gggagagttg 360
agaggccac cgttacagt ggacacaggg caacttctca agattgcaaa acgtggcggc 420
gtgaccgagc tggaggcagt gcatgcatgg cgcaatgcac tgacgggtgc cccgctcaac 480
ttgaccccc agcagggtgt ggccatcgcc agcaataatg gtggcaagca ggcgctggag 540
acgggtccagc ggtcgttgcc ggtgctgtgc caggccacag gcttgacccc ccagcagggtg 600
gtggccatcg ccagcaatgg cgggtggcaag caggcgctgg agacgggtcca gcggctgtt 660
ccgggtgctgt gccaggccca cgcttgacc cccagcagg tgggtggccat cgcagcaat 720
aatgggtggca agcaggcgct ggagacggtc cagcggtgtg tgcggtgtgt gtgccaggcc 780
cacggcttga cccccagca ggtggtggcc atgccagca atggcggtgg caagcaggcg 840
ctggagacgg tccagcggct gttgccggtg ctgtgccagg cccacggctt gacccccag 900
caggtggtgg ccatcgccag caatggcggt ggcaagcagg cgtggagac ggtccagcgg 960
ctgttgccgg tgcgtgcca ggccacggc ttgaccccc agcagggtgt ggccatcgcc 1020
agcaatggcg gtggcaagca ggcgctggag acgggtccagc ggtcgttgcc ggtgctgtgc 1080
caggccacag gcttgacccc ccagcagggtg gtggccatcg ccagcaataa tgggtggcaag 1140
caggcgctgg agacgggtcca gcggctgttgc cgggtgctgt gccaggccca cggcttgacc 1200
ccggagcagg tgggtggccat cgccagcaat attggtggca agcaggcgct ggagacgggt 1260
caggcgctgt tgcggtgtgt gtgccaggcc cacggcttga cccccagca ggtggtggcc 1320
atgccagca ataaggtgtg caagcaggcg ctggagacgg tccagcggct gttgccggtg 1380
ctgtgccagg cccacggctt gacccccgag caggtggtgg ccatcgccag ccacgatggc 1440
ggcaagcagg cgtggagac ggtccagcgg ctgttgccgg tgcgtgcca ggccacggc 1500
ttgaccccc agcagggtgt ggccatcgcc agccacgat ggggaagca ggcgctggag 1560
acgggtccagc ggtcgttgcc ggtgctgtgc caggccacag gcttgacccc ggagcagggtg 1620
gtggccatcg ccagcaatat tgggtggcaag caggcgctgg agacgggtgca ggcgctgtt 1680
ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc cccagcagg tgggtggccat cgcagcaat 1740
ggcgggtggca agcaggcgct ggagacggtc cagcggtgtg tgcggtgtgt gtgccaggcc 1800
cacggcttga ccccgagca ggtggtggcc atgccagcc acgatggcgg caagcaggcg 1860
ctggagacgg tccagcggct gttgccggtg ctgtgccagg cccacggctt gacccccgag 1920
caggtggtgg ccatcgccag caatatgtgt ggcaagcagg cgtggagac ggtgcaggcg 1980
ctgttgccgg tgcgtgcca ggccacggc ttgacccctc agcagggtgt ggccatcgcc 2040
agcaatggcg gcggcaggcc ggcgctggag agcattgttg cccagttatc tcgccctgat 2100
ccggcgttgg ccgcttgac caacgaccac ctctgcctc tggcctgcct cggcggcgct 2160
cctgcgctgg atgcagttaa aaagggatgt ggggatccta tcagccgttc ccagctggtg 2220
aagtcgagc tggaggagaa gaaatccgag ttgaggcaca agctgaagta cgtgccccac 2280
gagtagatcg agctgatcga gatcgccgg aacagcacc aggaccgat cctggagatg 2340
aaggtgatgg agttcttcat gaaggtgtac ggctacaggg gcaagcacct gggcggtcc 2400
aggaagcccg acggcgccat ctacaccgtg ggctcccca tcgactacgg cgtgatcgtg 2460
gacaccaagg cctactcgg cggtacaac ctgcccacg gccaggccga gaaatgcag 2520
aggtacgtgg aggagaacca gaccaggaac aagcacatca accccaacga gtggtggaag 2580
gtgtacccct ccagcgtgac cgagttcaag ttctgttcg tgcgggcca ctcaagggc 2640
aactacaagg cccagctgac caggctgaac cacatcacca actgcaacgg cgccgtgctg 2700
tccgtggagg agtcctgat cggcgcgag atgatcaagg ccggcacct gacctggag 2760
gaggtgagga ggaagtcaa caacggcgag atcaacttcg cggccgactg ataa 2814

```

```

<210> 52
<211> 2832
<212> ДНК
<213> штучна послідовність

<220>
<223> TRBC_T01-R TALEN

<400> 52
atgggcgatc ctaaaagaa acgtaaggtc atcgataagg agaccgccgc tgccaagttc 60
gagagacagc acatggacag catcgatata gccgatctac gcacgctcgg ctacagccag 120
cagcaacagg agaagatcaa accgaagggt cggtcgacag tggcgacaga ccacgagga 180
ctggtcggcc acgggtttac acacgcgcac atcggttgcg taagccaaca cccggcagcg 240
ttaggggaccg tcgctgtcaa gtatcaggac atgacgcgag cgttgccaga ggcgacacac 300
gaagcgatcg ttggcgtcgg caaacagtgg tccggcgcac gcgctctgga gcccttgcct 360
acggtggcgg gagagttgag aggtccaccg ttacagttgg acacaggcca acttctcaag 420
attgcaaaac gtggcgcggt gaccgcagtg gaggcagtg atgcatggcg caatgcactg 480
acgggtgccc cgctcaactt gacccccag caggtggtgg ccatcgccag caataatggt 540
ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg ctggtgccgg tgctgtgcca gggccacggc 600
ttgaccccc agcaggtggt gggcatcgcc agcaatggcg gtggcaagca ggcgctggag 660
acggtccagc ggtggttgc ggtgctgtgc caggccacg gcttgacccc ccagcaggtg 720
gtggccatcg ccagcaataa tgggtggcaag caggcgctgg agacggtcca cgggtggtg 780
cgggtgctgt gccaggccca cggcttgacc cccagcagg tggtggccat cggcagcaat 840
aatggtggca agcaggcgct ggagacggtc cagcggtgtg tgccggtgct gtgccaggcc 900
cacggcttga ccccgagca ggtggtggcc atcgccagcc acgatggcgg caagcaggcg 960
ctggagacgg tcacgaggct gttgccgggt ctgtgccagg cccacggctt gacccggag 1020
caggtggtgg ccatcgccag ccacgatggc ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg 1080
ctgttgccgg tgctgtgcca gggccacggc ttgaccccc agcaggtggt gggcatcgcc 1140
agcaatggcg gtggcaagca ggcgctggag acggtccagc ggtggttgc ggtgctgtgc 1200
caggccacg gcttgacccc ccagcaggtg gtggccatcg ccagcaatgg cgggtggcaag 1260
caggcgctgg agacggtcca cggctgttgc cgggtgctgt gccaggccca cggcttgacc 1320
ccccagcagg tggtggccat cggcagcaat ggcggtggca agcaggcgct ggagacggtc 1380
cagcggtgtg tgccggtgct gtgccaggcc cagcgcttga cccccagca ggtggtggcc 1440
atcgccagca atggcggtg caagcaggcg ctggagacgg tcacgaggct gttgccgggt 1500
ctgtgccagg cccacggctt gacccccag caggtggtgg ccatcgccag caataatggt 1560
ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg ctgttgccgg tgctgtgcca gggccacggc 1620
ttgaccccc agcaggtggt gggcatcgcc agcaataatg gtggcaagca ggcgctggag 1680
acggtccagc ggtggttgc ggtgctgtgc caggccacg gcttgacccc ccagcaggtg 1740
gtggccatcg ccagcaataa tgggtggcaag caggcgctgg agacggtcca cggctgttgc 1800
ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc cccagcagg tggtggccat cggcagcaat 1860
ggcggtggca agcaggcgct ggagacggtc cagcggtgtg tgccggtgct gtgccaggcc 1920
cacggcttga cccccagca ggtggtggcc atcgccagca ataaggttgg caagcaggcg 1980
ctggagacgg tcacgaggct gttgccgggt ctgtgccagg cccacggctt gacccctcag 2040
caggtggtgg ccatcgccag caatggcggc ggcaaggccg cgctggagag cattgttgc 2100
cagttatctc gcctgatcc ggcgttggcc gcgttgacca acgaccacct cgtcgcttgc 2160
gcctgcctcg gcggcgctcc tgcgctggat gcagtgaata agggatttgg ggtacctatc 2220
agcgttccc agctggtgaa gtccgagctg gaggagaaga aatccgagtt gaggcacaag 2280
ctgaagtacg tgccccacga gtacatcgag ctgacgaga tcgccccgaa cagcaccag 2340
gaccgtatcc tggagatgaa ggtgatggag ttcttcatga aggtgtacgg ctacaggggc 2400
aagcacctgg gcggctccag gaagcccgac ggcgcatct acaccgtggg ctcccccatc 2460
gactacggcg tgatcgtgga caccaaggcc tactccggcg gctacaacct gcccacggc 2520
caggccgacg aaatgcagag gtacgtggag gagaaccaga ccaggaacaa gcacatcaac 2580
cccaacgagt ggtggaaggt gtacccctcc agcgtgaccg agttcaagtt cctgttcgtg 2640
tcgggccact tcaagggcaa ctacaaggcc cagctgacca ggtgaacca catcaccaac 2700
tgcaacggcg ccgtgctgtc cgtggaggag ctccgtatcg gcggcgagat gatcaaggcc 2760
ggcaccctga cctggagga ggtgaggagg aagttcaaca acggcgagat caacttcgcg 2820

```



gccgactgat aa

2832

&lt;210&gt; 53

&lt;211&gt; 2814

&lt;212&gt; ДНК

&lt;213&gt; штучна послідовність

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; TRBC\_T02-L TALEN

&lt;400&gt; 53

atgggcgatc	ctaaaaagaa	acgtaaggtc	atcgattacc	catacgaatg	tccagattac	60
gctatcgata	tcgccgatct	acgcacgctc	ggctacagcc	agcagcaaca	ggagaagatc	120
aaacggaagg	ttcggtcgac	agtggcgag	caccacgagg	cactggctcg	ccacgggttt	180
acacacgcgc	acatcgttgc	gttaagccaa	caccgcgcag	cgttagggac	cgtcgctgtc	240
aagtatcagg	acatgatcgc	agcgttgcca	gaggcgacac	acgaagcgat	cgttgccgtc	300
ggcaaacagt	ggccggcgcc	acgcgctctg	gaggccttgc	tcacgggtgg	gggagagttg	360
agaggtccac	cgttacagtt	ggacacaggg	caacttctca	agattgcaaa	acgtggcggc	420
gtgaccgcag	tggaggcagt	gcatacatgg	cgcaatgcac	tgacgggtgc	cccgtcaac	480
ttgaccccg	agcaggtggt	ggccatcgcc	agccacgatg	gcggcaagca	ggcgctggag	540
acggtccagc	ggctgttgcc	gggtgctgtg	caggccacgc	gcttgacccc	ggagcaggtg	600
gtggccatcg	ccagccacga	tggcggaag	caggcgctgg	agacgggtcca	gggctgttg	660
ccggtgctgt	gccagcccca	cggcttgacc	ccggagcagg	tgttgcccat	cgccagccac	720
gatggcgcca	agcaggcgct	ggagacgggt	cagcggtgtg	tgccggtgct	gtgccaggcc	780
cacggcttga	cccgggagca	gggtggtggc	atcgccagca	atattggtgg	caagcaggcg	840
ctgggagcgg	tgcaggcgct	gttgccgggtg	ctgtgccagg	cccacggctt	gacccgggag	900
cagggtggtg	ccatcgccag	ccacgatggc	ggcaagcagg	cgttgagac	ggtccagcgg	960
ctgttgccgg	tgtgtgcca	ggccacgggc	ttgaccccg	agcaggtggt	ggccatcgcc	1020
agccacgatg	gcggcaagca	ggcgctggag	acggtccagc	ggctgttgcc	gggtgctgtg	1080
caggccccc	gcttgacccc	ggagcagggtg	gtggccatcg	ccagccacga	tggcggaag	1140
caggcgctgg	agacgggtcca	cgggtgtgtg	ccggtgctgt	gccagcccca	cggcttgacc	1200
cccagcagg	tgttgcccat	cgccagcaat	aatggtggca	agcaggcgct	ggagacgggtc	1260
cagcggtgtg	tgcgggtgct	gtgccaggcc	cacggcttga	cccgggagca	ggtggtggcc	1320
atcgccagca	atattggtgg	caagcaggcg	ctgggagcgg	tgcaggcgct	gttgccgggtg	1380
ctgtgccagg	cccacggctt	gaccccccag	cagggtggtg	ccatcgccag	caataatggt	1440
ggcaagcagg	cgttgagac	gggtccagcgg	ctgttgccgg	tgtgtgcca	ggccacgggc	1500
ttgacccccc	agcaggtggt	ggccatcgcc	agcaataatg	gtggcaagca	ggcgctggag	1560
acggtccagc	ggctgttgcc	gggtgctgtg	caggccacgc	gcttgacccc	ccagcaggtg	1620
gtggccatcg	ccagcaatgg	cgggtggcaag	caggcgctgg	agacgggtcca	gggctgttg	1680
ccggtgctgt	gccaggccca	cggcttgacc	ccggagcagg	tgttgcccat	cgccagccac	1740
gatggcgcca	agcaggcgct	ggagacgggtc	cagcggtgtg	tgccggtgct	gtgccaggcc	1800
cacggcttga	ccccccagca	gggtggtggc	atcgccagca	ataatggtgg	caagcaggcg	1860
ctgggagcgg	tccagcggtc	gttgccgggtg	ctgtgccagg	cccacggctt	gacccgggag	1920
caggtggtgg	ccatcgccag	ccacgatggc	ggcaagcagg	cgttgagac	ggtccagcgg	1980
ctgttgccgg	tgtgtgcca	ggcccaaggc	ttgacccctc	agcaggtggt	ggccatcgcc	2040
agcaatggcg	gcggcaggcc	ggcgctggag	agcattgttg	cccagttatc	tcgcccgtgat	2100
ccggcggtgg	ccgcgttgac	caacgaccac	ctcgtgcct	tggcctgcct	cggcggtgct	2160
cctgcgctgg	atgcagtga	aaagggatg	ggggatccta	tcagccgttc	ccagctggtg	2220
aagtccgagc	tggaggagaa	gaaatccgag	ttgaggcaca	agctgaagta	cgtgccccac	2280
gagtacatcg	agctgatcga	gatcgccggg	aacagcacc	aggaccgtat	cctggagatg	2340
aaggtgatgg	agttcttcat	gaaggtgtac	ggctacaggg	gcaagcacct	gggcggtccc	2400
aggaagcccg	acggcgccat	ctacaccgtg	ggctccccca	tcgaactacgg	cgtgatcgtg	2460
gacaccaagg	cctaactccg	cggctacaac	ctgcccacgc	gccaggccga	cgaatgcag	2520
aggtacgtgg	aggagaacca	gaccaggaac	aagcacatca	accccaacga	gtggtggaag	2580
gtgtacccct	ccagcgtgac	cgagttcaag	ttcctgttcg	tgtccggcca	cttcaagggc	2640
aactacaagg	cccagctgac	caggctgaac	cacatcacca	actgcaacgg	cgcgctgctg	2700

```
tccgtggagg agctcctgat cggcggcgag atgatcaagg ccggcaccct gaccctggag 2760
gaggtgagga ggaagttcaa caacggcgag atcaacttcg cggccgactg ataa 2814
```

<210> 54

<211> 2832

<212> ДНК

<213> штучна послідовність

<220>

<223> TRBC\_T02-R TALEN

<400> 54

```
atgggcgatc ctaaaaagaa acgtaaggtc atcgataagg agaccgcccg tgccaagtgc 60
gagagacagc acatggacag catcgatata gccgatctac gcacgctcgg ctacagccag 120
cagcaaacagg agaagatcaa accgaaggtt cgttcgacag tggcgacaga ccacgaggca 180
ctggtcggcc acgggtttac acacgcgcac atcggtgcgt taagccaaca cccggcagcg 240
ttagggacgg tcgctgtcaa gtatcaggac atgatacgag cgttgccaga ggcgacacac 300
gaagcgatcg ttggcgtcgg caaacagtgg tccggcgcac gcgctctgga ggcttgcgc 360
acgggtggcg gagagttgag aggtccaccg ttacagttgg acacaggcca acttctcaag 420
attgcaaaac gtggcggcgt gaccgcagtg gaggcagtgc atgcatggcg caatgcaactg 480
acgggtgccc cgtcaactt gacccccag caggtggtgg ccatcgccag caataatggt 540
ggcaagcagg cgtggagac ggtccagcgg ctggtgccgg tgctgtgcca ggcccacggc 600
ttgaccccc agcaggtggt ggccatcgcc agcaataatg gtggcaagca ggcgctggag 660
acggtcacgc ggtgctgccc ggtgctgtgc caggccccag gcttgacccc ccagcaggtg 720
gtggccatcg ccagcaataa tggtagcaag caggcgctgg agacggtcca gcgctggtg 780
ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc ccggagcagg tggtagccat cggcagcaat 840
attggtgcca agcaggcgct ggagacggtg caggcgctgt tgccggtgct gtgccaggcc 900
cacggcttga cccccagca ggtggtggcc atcgccagca ataattggtg caagcaggcg 960
ctggagacgg tcacagcggt gttgccggtg ctgtgccagg cccacggctt gaccccgagg 1020
caggtggtgg ccacgcccag caatatggtt ggcaagcagg cgtggagac ggtgcaggcg 1080
ctggtgccgg tgctgtgcca ggcccacggc ttgaccccc agcaggtggt ggccatcgcc 1140
agcaatggcg gtggcaagca ggcgctggag acggtcacgc ggctgtgccc ggtgctgtgc 1200
caggccccag gcttgacccc ggagcaggtg gtggccatcg ccagccacga tggcggaag 1260
caggcgctgg agacggtcca cggctgttg ccgggtgctgt gccaggccca cggcttgacc 1320
ccccagcagg tggtagccat cgccagcaat ggcggtggca agcaggcgct ggagacggtc 1380
cagcggtgtg tgccggtgct gtgccaggcc caccgcttga ccccgaggca ggtggtggcc 1440
atcgccagcc acgatggcgg caagcaggcg ctggagacgg tcacgcggtt gttgccggtg 1500
ctgtgccagg cccacggctt gacccccag caggtggtgg ccatcgccag caatggcggt 1560
ggcaagcagg cgttgagac ggtccagcgg ctggtgccgg tgctgtgcca ggcccacggc 1620
ttgaccccc agcaggtggt ggccatcgcc agcaataatg gtggcaagca ggcgctggag 1680
acggtcacgc ggtggtgccc ggtgctgtgc caggccccag gcttgacccc ggagcaggtg 1740
gtggccatcg ccagccacga tggcggaag caggcgctgg agacggtcca cggctgtgtg 1800
ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc cccagcagg tggtagccat cggcagcaat 1860
ggcggtggca agcaggcgct ggagacggtc cagcggtgtg tgccggtgct gtgccaggcc 1920
cacggcttga cccccagca ggtggtggcc atcgccagca atggcggtgg caagcaggcg 1980
ctggagacgg tcacgcggtt gttgccggtg ctgtgccagg cccacggctt gacccctcag 2040
caggtggtgg ccatcgccag caatggcggt ggcaagcagg cgtggagag cattgttgcc 2100
cagttatctc gccctgatcc ggcggtggcc gcgttgacca acgaccacct cgtcgcttg 2160
gcctgcctcg gcggcgctcc tgcgctggat gcagtgaata agggattggg ggatcctatc 2220
agccgttccc agctggtgaa gtccgagctg gaggagaaga aatccgagt gaggcacaag 2280
ctgaagtacg tccccacga gtacatcgag ctgatacaga tcgcccggaa cagcaccacg 2340
gaccgtatcc tggagatgaa ggtgatggag ttcttcatga aggtgtacgg ctacaggggc 2400
aagcacctgg gcggctccag gaagccccgac ggcccatct acacgtggg ccccccatc 2460
gactacggcg tgatcgtgga caccaaggcc tactccggcg gctacaacct gcccacggc 2520
caggccgacg aaatgcagag gtacgtggag gagaaccaga ccaggaacaa gcacatcaac 2580
cccaacgagt ggtggaaggt gtaccctcc agcgtgaccg agttcaagtt cctgttcgtg 2640
```

```

tccggccact tcaagggcaa ctacaaggcc cagctgacca ggctgaacca catcaccaac 2700
tgcaacggcg cctgtctgtc cgtggaggag ctctgatcgc gcggcgagat gatcaaggcc 2760
ggcaccctga cctggagga ggtgaggagg aagttcaaca acggcgagat caacttcgcg 2820
gccgactgat aa 2832

```

<210> 55

<211> 2814

<212> ДНК

<213> штучна послідовність

<220>

<223> CD52\_T02-L TALEN

<400> 55

```

atgggcgatc ctaaaagaa acgtaaggct atcgattacc catacgaatg tccagattac 60
gctatcgata tcgccgatct acgcacgctc ggctacagcc agcagcaaca ggagaagatc 120
aaaccgaagg ttctgtcgac agtggcgag caccacgagg cactgggtcgg ccacgggttt 180
acacacggcg acatcggttc gtttaagcaa caccggcgag cgttagggac cgtcgctgtc 240
aagtatcagg acatgatcgc agcgttgcca gaggcgacac acgaagcgat cgttggcgte 300
ggcaaacagt ggtccggcgc acgcgctctg gaggccttgc tcacggtggc gggagagttg 360
agaggtccac cgttacagtt ggacacaggg caacttctca agattgcaaa acgtggcggc 420
gtgacggcag tggaggcagt gcatgcatgg cgcaatgcac tgacgggtgc ccgctcaac 480
ttgaccccc agcaggtggt ggccatcgcc agcaatggcg gtggcaagca ggcgctggag 540
acggtccagc ggtggttggc ggtgctgtgc caggccacg gcttgacccc ggagcaggtg 600
gtggccatcg ccagccacga tggcggaag caggcgctgg agacggtcca gcggtgttg 660
cgggtgctgt gccaggccca cggcttgacc cggagcagg tgggtggccat cgccagccca 720
gatggcgcca agcaggcgct ggagacggtc cagcggtgtg tgccggtgct gtgccaggcc 780
cacggcttga cccccagca ggtggtggcc atcgccagca atggcggtgg caagcaggcg 840
ctggagacgg tcacagcggt gttgcccgtg ctgtgccagg cccacggctt gacccggag 900
caggtggtgg ccatcgccag ccacgatggc ggcaagcagg cgtggagac ggtccagcg 960
ctgttgccgg tgcgtgcca ggcccacggc ttgaccccg agcaggtggt ggccatcgcc 1020
agccacgatg gcggcaagca ggcgctggag acggtccagc ggtggttgc ggtgctgtgc 1080
caggccacg gcttgacccc ccagcaggtg gtggccatcg ccagcaatgg cgttggcaag 1140
caggcgctgg agacggtcca cggctgttg cgggtgctgt gccaggccca cggcttgacc 1200
ccggagcagg tgggtggccat cgccagcaat attggtggca agcaggcgct ggagacgggtg 1260
caggcgctgt tgccggtgct gtgccaggcc caggcttga ccccgagca ggtggtggcc 1320
atcgccagcc acgatggcgg caagcaggcg ctggagacgg tcacagcggt gttgccggtg 1380
ctgtgccagg cccacggctt gacccccag caggtggtgg ccatcgccag caatggcggt 1440
ggcaagcagg cgtggagac ggtccagcgg ctgttgccgg tgcgtgcca ggcccacggc 1500
ttgaccccg agcaggtggt ggccatcgcc agccacgatg gcggcaagca ggcgctggag 1560
acggtccagc ggtggttgc ggtgctgtgc caggccacg gcttgacccc ggagcaggtg 1620
ctggccatcg ccagcaatat tgggtggcaag caggcgctgg agacggtgca ggcgctgttg 1680
cgggtgctgt gccaggccca cggcttgacc ccggagcagg tgggtggccat cgccagccac 1740
gatggcgcca agcaggcgct ggagacggtc cagcggtgtg tgccggtgct gtgccaggcc 1800
cacggcttga ccccgagca ggtggtggcc atcgccagcc acgatggcgg caagcaggcg 1860
ctggagacgg tcacagcggt gttgccggtg ctgtgccagg cccacggctt gacccggag 1920
caggtggtgg ccatcgccag caatattggt ggcaagcagg cgtggagac ggtcagcgcg 1980
ctgttgccgg tgcgtgcca ggcccacggc ttgacccctc agcaggtggt ggccatcgcc 2040
agcaatggcg gcggcaggcc ggcgctggag agcattgttg cccagttatc tcgccctgat 2100
ccggcggttg ccgcgttgac caacgaccac ctctgcctc tggcctgcct cggcgggcgt 2160
cctgcgctgg atgcagtga aaagggattg ggggatccta tcagccgttc ccagctggtg 2220
aagtcaggagc tggaggagaa gaaatccgag ttgaggcaca agctgaagta cgtgccccac 2280
gagtatatcg agctgatcga gatcgccgg aacagcacc aggacggtat cctggagatg 2340
aaggtgatgg agttcttcat gaagggtgtac ggctacaggg gcaagcacct gggcggtccc 2400
aggaaagccc acggcgccat ctacaccggt ggctccccca tgaactacgg cgtgatcgtg 2460
gacaccaagg cctactccgg cggctacaac ctgcccacat gccaggccga cgaatgcag 2520

```



aggtaacgtgg	aggagaacca	gaccaggaac	aagcacatca	accccaacga	gtggtggaag	2580
gtgtaccct	ccagcgtgac	cgagttcaag	ttcctgttcg	tgcccgcca	cttcaagggc	2640
aactacaagg	cccagctgac	caggctgaac	cacatcacca	actgcaacgg	cgccgtgctg	2700
tccgtggagg	agctcctgat	cgccggcgag	atgatcaagg	cgccaccct	gacctggag	2760
gaggtgagga	ggaagttcaa	caacggcgag	atcaacttcg	cgcccgactg	ataa	2814

<210> 56

<211> 2832

<212> ДНК

<213> штучна послідовність

<220>

<223> CD52\_T02-R TALEN

<400> 56

atgggcatc	ctaaaaagaa	acgtaaggtc	atcgataagg	agaccgccc	tgccaagttc	60
gagagacagc	acatggacag	catcgatata	gccgatctac	gcacgctcgg	ctacagccag	120
cagcaacagg	agaagatcaa	accgaagggt	cggtcgacag	tgccgacgca	ccacgaggca	180
ctggtcggcc	acgggtttac	acacgcgcac	atcggttcgt	taagccaaca	cccgccagcg	240
ttaggacacg	tcgctgtcaa	gtatcaggac	atgatcgacg	cggtgccaga	ggcgacacac	300
gaagcgatcg	ttggcgtcgg	caaacagtgg	tcggcgccac	gcgctctgga	ggccttgctc	360
acgggtggcg	gagagttgag	aggtccaccg	ttacagttag	acacaggcca	acttctcaag	420
attgcaaaac	gtggcgcggt	gaccgcagtg	gaggcagtg	atgcatggcg	caatgcactg	480
acgggtgccc	cgctcaactt	gacccccag	caggtggtgg	ccatcgccag	caatggcggt	540
ggcaagcagg	cgctggagac	ggtccagcgg	ctgttgccgg	tgctgtgcca	ggccacgggc	600
ttgaccccc	agcagggtgt	ggccatcgcc	agcaataatg	gtggcaagca	ggcgctggag	660
acgggtccagc	ggctgttgcc	ggtgctgtgc	caggcccaag	gcttgacccc	ggagcaggtg	720
gtggccatcg	ccagccacga	tgccggcaag	caggcgctgg	agacgggtcca	gcggctgttg	780
ccggtgctgt	gccaggccca	cggtctgacc	ccccagcagg	tggtggccat	cgccagcaat	840
ggcggtggca	agcaggcgct	ggagacggtc	cagcggtgtg	tgccggtgct	gtgccaggcc	900
cacggcttga	ccccggagca	ggtggtggcc	atcgccagcc	acgatggcgg	caagcaggcg	960
ctggagacgg	tccagcggtc	gttgccgggt	ctgtgccagg	cccacggctt	gacccccag	1020
caggtggtgg	ccatcgccag	caatggcggt	ggcaagcagg	cgctggagac	ggtccagcgg	1080
ctgttgccgg	tgctgtgcca	ggccacggc	ttgaccccc	agcagggtgt	ggccatcgcc	1140
agcaatggcg	gtggcaagca	ggcgctggag	acggtccagc	ggctgttgcc	ggtgctgtgc	1200
caggcccaag	gcttgacccc	ggagcagggt	gtggccatcg	ccagcaatat	tggtggcaag	1260
caggcgctgg	agacgggtga	ggcgctgttg	ccggtgctgt	gccaggccca	cggtctgacc	1320
ccggagcagg	tggtggccat	cgccagccac	gatggcgcca	agcaggcgct	ggagacggtc	1380
cagcggtgtg	tgccggtgct	gtgccaggcc	cacggcttga	ccccggagca	ggtggtggcc	1440
atcgccagcc	acgatggcgg	caagcaggcg	ctggagacgg	tccagcggtc	gttgccgggtg	1500
ctgtgccagg	cccacggctt	gacccccag	caggtggtgg	ccatcgccag	caatggcggt	1560
ggcaagcagg	cgctggagac	ggtccagcgg	ctgttgccgg	tgctgtgcca	ggccacgggc	1620
ttgaccccc	agcagggtgt	ggccatcgcc	agcaataatg	gtggcaagca	ggcgctggag	1680
acgggtccagc	ggctgttgcc	ggtgctgtgc	caggcccaag	gcttgacccc	ccagcagggtg	1740
gtggccatcg	ccagcaatgg	cggtggcaag	caggcgctgg	agacgggtcca	gcggctgttg	1800
ccggtgctgt	gccaggccca	cggtctgacc	ccggagcagg	tggtggccat	cgccagcaat	1860
attggtggca	agcaggcgct	ggagacgggt	caggcgctgt	tgccggtgct	gtgccaggcc	1920
cacggcttga	ccccggagca	ggtggtggcc	atcgccagcc	acgatggcgg	caagcaggcg	1980
ctggagacgg	tccagcggtc	gttgccgggt	ctgtgccagg	cccacggctt	gacccctcag	2040
caggtggtgg	ccatcgccag	caatggcggc	ggcaggccgg	cgctggagag	cattgttgcc	2100
cagttatctc	gcctgatcc	ggcggtggcc	gcgttgacca	acgaccacct	cgctgccttg	2160
gcctgcctcg	gcggcgctcc	tgcgctggat	gcagtgaata	agggattggg	ggatcctatc	2220
agccgttccc	agctgggtgaa	gtccgagctg	gaggagaaga	aatccgagtt	gaggcacaag	2280
ctgaagtagc	tgccccacga	gtacatcgag	ctgacgaga	tcgccccgaa	cagcaccag	2340
gaccgtatcc	tgagatgaa	ggtgatggag	ttcttcatga	aggtgtacgg	ctacaggggc	2400
aagcacctgg	gcgggtccag	gaagcccgac	ggcgccatct	acaccgtggg	ctccccatc	2460

```

gactacggcg tgatcgtgga caccaaggcc tactccggcg gctacaacct gcccatcggc 2520
caggccgacg aaatgcagag gtacgtggag gagaaccaga ccaggaacaa gcacatcaac 2580
cccaacgagt ggtggaaggt gtaccctcc agcgtgaccg agttcaagtt cctgttcgtg 2640
tccggccact tcaagggcaa ctacaaggcc cagctgacca ggctgaacca catcaccaac 2700
tgcaacggcg ccgtgctgtc cgtggaggag ctctgatcg gcggcgagat gatcaaggcc 2760
ggcaccctga ccctggagga ggtgaggagg aagttcaaca acggcgagat caacttcgcg 2820
gccgactgat aa 2832

```

<210> 57

<211> 49

<212> ДНК

<213> штучна послідовність

<220>

<223> TRAC\_T02

<400> 57

tttagaaagt tcctgtgatg tcaagctggt cgagaaaagc ttgaaaca 49

<210> 58

<211> 49

<212> ДНК

<213> штучна послідовність

<220>

<223> TRAC\_T03

<400> 58

tccagtgaca agtctgtctg cctattcacc gatattgatt ctcaaacaa 49

<210> 59

<211> 49

<212> ДНК

<213> штучна послідовність

<220>

<223> TRAC\_T04

<400> 59

tatatcacag acaaaactgt gctagacatg aggtctatgg acttcaaga 49

<210> 60

<211> 49

<212> ДНК

<213> штучна послідовність

<220>

<223> TRAC\_T05

<400> 60

tgagggtctat ggacttcaag agcaacagtg ctgtggcctg gagcaacaa	49
<210> 61	
<211> 47	
<212> ДНК	
<213> штучна послідовність	
<220>	
<223> CD52_T01	
<400> 61	
ttcctcttcc tcctaccacc atcagcctcc ttacctgta ccataac	47
<210> 62	
<211> 43	
<212> ДНК	
<213> штучна послідовність	
<220>	
<223> CD52_T04	
<400> 62	
ttcctctctac tcaccacagc ctctcgggtct tacctgtacc ata	43
<210> 63	
<211> 43	
<212> ДНК	
<213> штучна послідовність	
<220>	
<223> CD52_T05	
<400> 63	
ttctactcac catcagctcc tggttatttg ctcttacctg tac	43
<210> 64	
<211> 47	
<212> ДНК	
<213> штучна послідовність	
<220>	
<223> CD52_T06	
<400> 64	
ttatcccact tctcctctac agatacaaac tttttgtcct gagagtc	47
<210> 65	
<211> 47	

```

<212> ДНК
<213> штучна послідовність

<220>
<223> CD52_T07

<400> 65
tggactctca ggacaaacga caccagccaa atgctgaggg gctgctg 47

<210> 66

<211> 60
<212> ДНК
<213> штучна послідовність

<220>
<223> прямиий праймер CD52

<220>
<221> misc_feature
<222> (31); (32); (33); (34); (35); (36); (37); (38); (39); (40)
<223> п являє собою а або с, або t, або g

<400> 66
ccatctcatc cctgcgtgtc tccgactcag nnnnnnnnnn cagatctgca gaaaggaagc 60

<210> 67

<211> 61
<212> ДНК
<213> штучна послідовність

<220>
<223> прямиий праймер TRAC

<220>
<221> misc_feature
<222> (31); (32); (33); (34); (35); (36); (37); (38); (39); (40)
<223> п являє собою а або с, або t, або g

<400> 67
ccatctcatc cctgcgtgtc tccgactcag nnnnnnnnnn atcactggca tctggactcc 60
a 61

<210> 68

<211> 62
<212> ДНК
<213> штучна послідовність

<220>
<223> прямиий праймер TRBC1

<220>
<221> misc_feature

```

```

<222> (31); (32); (33); (34); (35); (36); (37); (38); (39); (40)
<223> п являє собою а або с, або т, або г

<400> 68
ccatctcatc cctgcgtgtc tccgactcag nnnnnnnnnn agagccccta ccagaaccag 60
ac 62

<210> 69

<211> 62
<212> ДНК
<213> штучна послідовність

<220>
<223> прямой праймер TRBC2

<220>
<221> misc_feature
<222> (31); (32); (33); (34); (35); (36); (37); (38); (39); (40)
<223> п являє собою а або с, або т, або г

<400> 69
ccatctcatc cctgcgtgtc tccgactcag nnnnnnnnnn ggacctagta acataattgt 60
gc 62

<210> 70

<211> 51
<212> ДНК
<213> штучна послідовність

<220>
<223> зворотний праймер GR CD52

<400> 70
cctatcccct gtgtgccttg gcagttctcag cctgttggag tccatctgct g 51

<210> 71

<211> 50
<212> ДНК
<213> штучна послідовність

<220>
<223> зворотний праймер GR TRAC

<400> 71
cctatcccct gtgtgccttg gcagttctcag cctcatgtct agcacagttt 50

<210> 72

<211> 51
<212> ДНК
<213> штучна послідовність

```



```

<220>
<223> зворотний праймер GR TRBC1-2

<400> 72
cctatcccct gtgtgccttg gcagtcctcag accagctcag ctccacgtgg t
51

<210> 73

<211> 495
<212> PRT
<213> штучна послідовність

<220>
<223> анти-CD19 CAR

<400> 73
Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1 5 10 15

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

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

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

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

Asn Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser
85 90 95

Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala
100 105 110

Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Ser Arg Val Phe
115 120 125

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly
130 135 140

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met
145 150 155 160

```

Thr Gln Ala Ala Pro Ser Ile Pro Val Thr Pro Gly Glu Ser Val Ser  
 165 170 175  
 Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu Asn Ser Asn Gly Asn Thr  
 180 185 190  
 Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu  
 195 200 205  
 Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser  
 210 215 220  
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr Leu Arg Ile Ser Arg Val Glu  
 225 230 235 240  
 Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln His Leu Glu Tyr Pro  
 245 250 255  
 Phe Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Ser Asp Pro  
 260 265 270  
 Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala  
 275 280 285  
 Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly  
 290 295 300  
 Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile  
 305 310 315 320  
 Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val  
 325 330 335  
 Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe  
 340 345 350  
 Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly  
 355 360 365  
 Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg  
 370 375 380  
 Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln

```

385              390              395              400

Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp
      405              410              415

Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro
      420              425              430

Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp
      435              440              445

Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg
      450              455              460

Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr
465              470              475              480

Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
      485              490              495

```

```

<210> 74
<211> 49
<212> ДНК
<213> штучна послідовність

<220>
<223> CTLA4_T01

<400> 74
tggccctgca ctctcctgtt tttttctctc ttcctccctg tcttctgca 49

<210> 75
<211> 49
<212> ДНК
<213> штучна послідовність

<220>
<223> CTLA4_T03

<400> 75
ttttccatgc tagcaatgca cgtggcccag cctgctgtgg tactggcca 49

<210> 76
<211> 49
<212> ДНК

```

```

<213> штучна послідовність

<220>
<223> CTLA4_T04

<400> 76
tccatgctag caatgcacgt ggcccagcct gctgtggtac tggccagca 49

<210> 77

<211> 49
<212> ДНК
<213> штучна послідовність

<220>
<223> PDCD1_T01

<400> 77
ttctccccag ccctgctcgt ggtgaccgaa ggggacaacg ccaccttca 49

<210> 78

<211> 49
<212> ДНК
<213> штучна послідовність

<220>
<223> PDCD1_T03

<400> 78
tacctctgtg gggccatctc cctggccccc aaggcgcaga tcaaagaga 49

<210> 79

<211> 530
<212> PRT
<213> штучна послідовність

<220>
<223> Повтор CTLA4_T01-L

<400> 79
Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys
1 5 10 15

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala
20 25 30

His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly
35 40 45

```

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys  
50 55 60

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His  
65 70 75 80

Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val  
85 90 95

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala  
100 105 110

Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu  
115 120 125

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala  
130 135 140

Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg  
145 150 155 160

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val  
165 170 175

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

Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln  
195 200 205

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu  
210 215 220

Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr  
225 230 235 240

Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala  
245 250 255

Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly  
260 265 270

Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys  
275 280 285

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala  
290 295 300

His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly  
305 310 315 320

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys  
325 330 335

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn  
340 345 350

Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val  
355 360 365

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala  
370 375 380

Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu  
385 390 395 400

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala  
405 410 415

Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg  
420 425 430

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val  
435 440 445

Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val  
450 455 460

Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu  
465 470 475 480

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu  
485 490 495

Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr  
500 505 510

```

Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Arg Pro Ala
    515                      520                      525

Leu Glu
    530

<210> 80

<211> 530
<212> PRT
<213> штучна послідовність

<220>
<223> Повтор CTLA4_T01-R

<400> 80
Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys
1                      5                      10                      15

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala
    20                      25                      30

His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly
    35                      40                      45

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
    50                      55                      60

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn
65                      70                      75                      80

Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val
    85                      90                      95

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala
    100                     105                     110

Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu
    115                     120                     125

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala
    130                     135                     140

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

```

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val  
 165 170 175  
 Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val  
 180 185 190  
 Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln  
 195 200 205  
 Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu  
 210 215 220  
 Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr  
 225 230 235 240  
 Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala  
 245 250 255  
 Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly  
 260 265 270  
 Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys  
 275 280 285  
 Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala  
 290 295 300  
 His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly  
 305 310 315 320  
 Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys  
 325 330 335  
 Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn  
 340 345 350  
 Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val  
 355 360 365  
 Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala  
 370 375 380  
 Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu  
 385 390 395 400



```

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala
      405                      410                      415

Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg
      420                      425                      430

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val
      435                      440                      445

Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val
      450                      455                      460

Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln
      465                      470                      475                      480

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
      485                      490                      495

Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
      500                      505                      510

Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Arg Pro Ala
      515                      520                      525

Leu Glu
      530

<210> 81
<211> 530
<212> PRT
<213> штучна послідовність

<220>
<223> Повтор CTLA4_T03-L

<400> 81
Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys
1          5          10          15

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala
20          25          30

His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly
35          40          45

```

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys  
50 55 60

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn  
65 70 75 80

Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val  
85 90 95

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala  
100 105 110

Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu  
115 120 125

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala  
130 135 140

Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg  
145 150 155 160

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val  
165 170 175

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

Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln  
195 200 205

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu  
210 215 220

Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr  
225 230 235 240

Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala  
245 250 255

Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly  
260 265 270

Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys  
 275 280 285  
 Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala  
 290 295 300  
 His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly  
 305 310 315 320  
 Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys  
 325 330 335  
 Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn  
 340 345 350  
 Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val  
 355 360 365  
 Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala  
 370 375 380  
 Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu  
 385 390 395 400  
 Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala  
 405 410 415  
 Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg  
 420 425 430  
 Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val  
 435 440 445  
 Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val  
 450 455 460  
 Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu  
 465 470 475 480  
 Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu  
 485 490 495  
 Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr  
 500 505 510

```

Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Arg Pro Ala
    515                      520                      525

Leu Glu
    530

<210> 82
<211> 530
<212> PRT
<213> штучна послідовність

<220>
<223> Повтор CTLA4_T03-R

<400> 82
Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys
1          5                      10                      15

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala
    20                      25                      30

His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly
    35                      40                      45

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
    50                      55                      60

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His
65          70                      75                      80

Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val
    85                      90                      95

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala
    100                     105                     110

Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu
    115                     120                     125

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala
    130                     135                     140

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

```

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val  
 165 170 175  
 Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val  
 180 185 190  
 Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln  
 195 200 205  
 Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu  
 210 215 220  
 Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr  
 225 230 235 240  
 Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala  
 245 250 255  
 Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly  
 260 265 270  
 Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys  
 275 280 285  
 Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala  
 290 295 300  
 His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly  
 305 310 315 320  
 Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys  
 325 330 335  
 Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn  
 340 345 350  
 Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val  
 355 360 365  
 Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala  
 370 375 380

```

Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu
385                      390                      395                      400

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala
                      405                      410                      415

Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala
                      420                      425                      430

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val
                      435                      440                      445

Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val
                      450                      455                      460

Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu
465                      470                      475                      480

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
                      485                      490                      495

Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
                    500                      505                      510

Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Arg Pro Ala
                    515                      520                      525

Leu Glu
530

<210> 83

<211> 530
<212> PRT
<213> штучна послідовність

<220>
<223> Повтор CTLA4_T04-L

<400> 83
Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys
1                      5                      10                      15

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala
                20                      25                      30

```

```

His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly
   35                               40                               45

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
   50                               55                               60

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn
   65                               70                               75                               80

Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val
   85                               90                               95

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala
  100                               105                               110

Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu
  115                               120                               125

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala
  130                               135                               140

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

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val
  165                               170                               175

Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val
  180                               185                               190

Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln
  195                               200                               205

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
  210                               215                               220

Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
  225                               230                               235                               240

Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala
  245                               250                               255

Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly
  260                               265                               270

```

Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys  
 275 280 285  
 Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala  
 290 295 300  
 His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly  
 305 310 315 320  
 Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys  
 325 330 335  
 Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn  
 340 345 350  
 Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val  
 355 360 365  
 Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala  
 370 375 380  
 Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu  
 385 390 395 400  
 Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala  
 405 410 415  
 Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg  
 420 425 430  
 Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val  
 435 440 445  
 Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val  
 450 455 460  
 Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu  
 465 470 475 480  
 Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu  
 485 490 495



```

Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
      500                      505                      510

Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Arg Pro Ala
      515                      520                      525

Leu Glu
      530

<210>  84
<211>  530
<212>  PRT
<213>  штучна послідовність

<220>
<223>  Повтор CTLA4_T04-R

<400>  84
Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys
1                      5                      10                      15

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala
      20                      25                      30

His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly
      35                      40                      45

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
      50                      55                      60

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn
      65                      70                      75                      80

Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val
      85                      90                      95

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala
      100                     105                     110

Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu
      115                     120                     125

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala
      130                     135                     140

```

```

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

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val
165                      170                      175

Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val
180                      185                      190

Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu
195                      200                      205

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
210                      215                      220

Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
225                      230                      235                      240

Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala
245                      250                      255

Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly
260                      265                      270

Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys
275                      280                      285

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala
290                      295                      300

His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly
305                      310                      315                      320

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
325                      330                      335

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn
340                      345                      350

Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val
355                      360                      365

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala
370                      375                      380

```

Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu  
385 390 395 400

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala  
405 410 415

Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg  
420 425 430

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val  
435 440 445

Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val  
450 455 460

Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu  
465 470 475 480

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu  
485 490 495

Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr  
500 505 510

Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Arg Pro Ala  
515 520 525

Leu Glu  
530

<210> 85

<211> 530

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> Повтор PDCD1\_T01-L

<400> 85

Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys  
1 5 10 15

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala  
20 25 30

His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly  
35 40 45

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys  
50 55 60

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn  
65 70 75 80

Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val  
85 90 95

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala  
100 105 110

Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu  
115 120 125

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala  
130 135 140

Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg  
145 150 155 160

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val  
165 170 175

Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val  
180 185 190

Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu  
195 200 205

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu  
210 215 220

Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr  
225 230 235 240

Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala  
245 250 255

Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly  
 260 265 270  
 Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys  
 275 280 285  
 Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala  
 290 295 300  
 His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly  
 305 310 315 320  
 Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys  
 325 330 335  
 Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His  
 340 345 350  
 Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val  
 355 360 365  
 Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala  
 370 375 380  
 Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu  
 385 390 395 400  
 Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala  
 405 410 415  
 Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg  
 420 425 430  
 Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val  
 435 440 445  
 Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val  
 450 455 460  
 Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu  
 465 470 475 480  
 Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu  
 485 490 495

Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr  
500 505 510

Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Arg Pro Ala  
515 520 525

Leu Glu  
530

<210> 86

<211> 529

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> Повтор PDCD1\_T01-R

<400> 86

Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys  
1 5 10 15

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala  
20 25 30

His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly  
35 40 45

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys  
50 55 60

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn  
65 70 75 80

Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val  
85 90 95

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala  
100 105 110

Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu  
115 120 125

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala  
130 135 140

```

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

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val
165                      170                      175

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

Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln
195                      200                      205

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
210                      215                      220

Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
225                      230                      235                      240

Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala
245                      250                      255

Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly
260                      265                      270

Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Lys Gln
275                      280                      285

Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His
290                      295                      300

Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly
305                      310                      315                      320

Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln
325                      330                      335

Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly
340                      345                      350

Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu
355                      360                      365

```

Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser  
 370 375 380  
 Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro  
 385 390 395 400  
 Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile  
 405 410 415  
 Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu  
 420 425 430  
 Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val  
 435 440 445  
 Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln  
 450 455 460  
 Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln  
 465 470 475 480  
 Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr  
 485 490 495  
 Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro  
 500 505 510  
 Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Arg Pro Ala Leu  
 515 520 525  
 Glu  
 <210> 87  
 <211> 530  
 <212> PRT  
 <213> штучна послідовність  
 <220>  
 <223> Повтор PDCD1\_T03-L  
 <400> 87  
 Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys  
 1 5 10 15



Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala  
20 25 30

His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly  
35 40 45

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys  
50 55 60

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His  
65 70 75 80

Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val  
85 90 95

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala  
100 105 110

Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu  
115 120 125

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala  
130 135 140

Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg  
145 150 155 160

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val  
165 170 175

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

Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln  
195 200 205

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu  
210 215 220

Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr  
225 230 235 240

Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala  
245 250 255

Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly  
 260 265 270  
 Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys  
 275 280 285  
 Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala  
 290 295 300  
 His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly  
 305 310 315 320  
 Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys  
 325 330 335  
 Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn  
 340 345 350  
 Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val  
 355 360 365  
 Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala  
 370 375 380  
 Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu  
 385 390 395 400  
 Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala  
 405 410 415  
 Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg  
 420 425 430  
 Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val  
 435 440 445  
 Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val  
 450 455 460  
 Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu  
 465 470 475 480

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu  
485 490 495

Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr  
500 505 510

Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Arg Pro Ala  
515 520 525

Leu Glu  
530

<210> 88

<211> 529

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> Повтор PDCD1\_T03-R

<400> 88

Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys  
1 5 10 15

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala  
20 25 30

His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly  
35 40 45

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys  
50 55 60

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His  
65 70 75 80

Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val  
85 90 95

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala  
100 105 110

Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu  
115 120 125

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala  
130 135 140

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

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val  
165 170 175

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

Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln  
195 200 205

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu  
210 215 220

Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr  
225 230 235 240

Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala  
245 250 255

Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly  
260 265 270

Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys  
275 280 285

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala  
290 295 300

His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly  
305 310 315 320

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys  
325 330 335

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn  
340 345 350

Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val  
355 360 365

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala  
370 375 380

Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu  
385 390 395 400

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala  
405 410 415

Ile Ala Ser Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu  
420 425 430

Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val  
435 440 445

Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln  
450 455 460

Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln  
465 470 475 480

Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr  
485 490 495

Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro  
500 505 510

Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Arg Pro Ala Leu  
515 520 525

Glu

<210> 89

<211> 2814

<212> ДНК

<213> штучна послідовність

<220>

<223> CTLA4\_T01-L TALEN

<400> 89

atgggcgatc ctaaaaagaa acgtaaggtc atcgattacc catacgtatgt tccagattac 60

```

gctatcgata tcgccgatct acgcacgctc ggetacagcc agcagcaaca ggagaagatc 120
aaaccgaagg ttcggttcgac agtggcgccag caccacgagg cactggtcgg ccacggggtt 180
acacacgcgc acatcggtgc gtttaagccaa caccggcgag cgttagggac cgtcgctgtc 240
aagtatcagg acatgatcgc agcgttgcca gaggcgacac acgaagcgat cgttggcgtc 300
ggcaaacagt ggtccggcgc acgcgctctg gaggccttgc tcacggtggc gggagagttg 360
agagggtccac cgttacagtt ggacacaggc caacttctca agattgcaaa acgtggcggc 420
gtgaccgcag tggaggcagt gcatgcattg cgcaatgcac tgacgggtgc ccgcgtcaac 480
ttgaccccc agcagggtgt ggccatcgcc agcaataatg gtggcaagca ggcgctggag 540
acggtccagc ggtggttgcc ggtgctgtgc caggcccaag gcttgacccc ccagcaggtg 600
gtggccatcg ccagcaataa tgggtggcaag caggcgctgg agacggtcca gcggtgtgtg 660
ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc ccggagcagg tgggtggcat cgcagccac 720
gatggcgcca agcaggcgct ggagacggtc caggcgctgt tgccggtgct gtgccaggcc 780
cacggcttga ccccgagca ggtggtggcc atcgccagcc acgatggcgg caagcaggcg 840
ctggagacgg tccagcggtc gttgccggtg ctgtgccagg cccacggctt gaccccggag 900
caggtggttg ccatcgccag ccacgatggc ggcaagcagg cgttgagac ggtccagcgg 960
ctgttgccgg tgctgtgcca ggcccacggc ttgaccccc agcagggtgt ggccatcgcc 1020
agcaatggcg gtggcaagca ggcgctggag acggtccagc ggtggttgcc ggtgctgtgc 1080
caggcccaag gcttgacccc ccagcaggtg gtggccatcg ccagcaataa tgggtggcaag 1140
caggcgctgg agacggtcca cggctgtgtg ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc 1200
ccggagcagg tgggtggcat cgcacgccac gatggcgcca agcaggcgct ggagacggtc 1260
cagcggtgtg tgccggtgct gtgccaggcc cagcgcttga ccccgagca ggtggtggcc 1320
atcgccagca atattggtg caagcaggcg ctggagacgg tgacggcgct gttgccggtg 1380
ctgtgccagg cccacggctt gaccccgagg caggtggttg ccatcgccag ccacgatggc 1440
ggcaagcagg cgttgagac ggtccagcgg ctgttgccgg tgctgtgcca ggcccacggc 1500
ttgaccccc agcagggtgt ggccatcgcc agcaatggcg gtggcaagca ggcgctggag 1560
acggtccagc ggtggttgcc ggtgctgtgc caggcccaag gcttgacccc ggaagcaggtg 1620
gtggccatcg ccagcccaag tggcgccaag caggcgctgg agacggtcca gcggtgtgtg 1680
ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc ccccgagcagg tgggtggcat cgcagcaat 1740
ggcggtggca agcaggcgct ggagacggtc cagcggtgtg tgccggtgct gtgccaggcc 1800
cacggcttga ccccgagca ggtggtggcc atcgccagcc acgatggcgg caagcaggcg 1860
ctggagacgg tccagcggtc gttgccggtg ctgtgccagg cccacggctt gaccccgagg 1920
caggtggttg ccatcgccag ccacgatggc ggcaagcagg cgttgagac ggtccagcgg 1980
ctgttgccgg tgctgtgcca ggcccacggc ttgacccctc agcagggtgt ggccatcgcc 2040
agcaatggcg gcggcaggcc ggcgctggag agcattgttg cccagttatc tcgccctgat 2100
ccggcggttg ccgcttgacc caacgaccac ctgctgcctc tggcctgcct cggcgggcgt 2160
cctgcgttg atgcagtga aaagggattg ggggatccta tcagccgttc ccagctggtg 2220
aagtcagac tggaggagaa gaaatccgag ttgaggcaca agctgaagta cgtgccccac 2280
gagtacatcg agctgatcga gatcgcccg aacagcacc aggaccgtat cctggagatg 2340
aaggtgatgg agttcttcat gaaggtgtac ggctacaggg gcaagcacct gggcggtccc 2400
aggaagccc agcgcgccat ctacacgtg ggctcccca tcgactacgg cgtgatcgtg 2460
gacaccaagg cctactccgg cggctacaac ctgcccacg gccaggccga cgaatgcag 2520
aggtacgtgg aggagaacca gaccaggaac aagcacatca acccaacga gtggtggaag 2580
gtgtaccctc ccagcgtgac cgagttcaag ttctgttgc tgctcgcca cttcaagggc 2640
aactacaagg ccagcgtgac caggctgaac cacatacca actgcaacgg ccgctgctg 2700
tcggtggagg agctcctgat cggcgccgag atgatcaagg ccggcacctc gacctggag 2760
gaggtgagga ggaagttaa caacggcgag atcaacttcg cggccgactg ataa 2814

```

<210> 90

<211> 2832

<212> ДНК

<213> штучна послідовність

<220>

<223> CTLA4\_T01-R TALEN

<400> 90

```

atgggcgatc ctaaaaagaa acgtaagggtc atcgataagg agaccgcccg tgccaagttc 60
gagagacagc acatggacag catcgatata gccgatctac gcacgctcgg ctacagccag 120
cagcaacagg agaagatcaa accgaaggtt cgttcgacag tggcgacaga ccacaggcca 180
ctggtcggcc acgggtttac acacgcgcac atcgttgcgt taagccaaca cccggcagcg 240
ttagggacgg tcgctgtcaa gtatcaggac atgatcgag cgttgccaga ggcgacacac 300
gaagcgatcg ttggcgtcgg caaacagtgg tccggcgcac gcgctctgga ggcttgcctc 360
acggtggcgg gagagttag aggtccaccg ttacagttag acacaggcca acttctcaag 420
attgcaaaac gtggcgggcg gaccgcagtg gaggcagtgc atgcatggcg caatgcactg 480
acgggtgccc cgtcaactt gacccccag caggtggtgg ccatcgccag caataatggt 540
ggcaagcagg cgtggagac ggtccagcgg ctgttgccgg tgctgtgcca ggcccacggc 600
ttgaccccg agcaggtggt ggccatcgcc agccacgatg gcggcaagca ggcgctggag 660
acggtcacag ggtgttgcc ggtgctgtgc caggccacg gcttgacccc ggagcaggtg 720
gtggccatcg ccagcaatat tggtagcaag caggcgctgg agacggtgca ggcgctgttg 780
ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc cccagcagg ttgtggccat cgccagcaat 840
aatggtggca agcaggcgct ggagacgggt cagcggtgtg tgccggtgct gtgccaggcc 900
cacggcttga ccccgagca ggtggtggcc atcgccagca atattggtgg caagcaggcg 960
ctggagacgg tcaggcgctg gttgccgggt ctgtgccagg cccacggctt gaccccgag 1020
caggtggtgg ccatcgccag caatatggt ggcaagcagg cgtggagac ggtgcaggcg 1080
ctgttgccgg tgctgtgcca ggcccacggc ttgacccccc agcaggtggt ggccatcgcc 1140
agcaataatg gtggcaagca ggcgctggag acggtccagc ggctgttgcc ggtgctgtgc 1200
caggccacg gcttgacccc ggagcaggtg gtggccatcg ccagcaatat ttgtggcaag 1260
caggcgctgg agacggtgca ggcgctgttg ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc 1320
ccggagcagg ttgtggccat cgccagccac gatggcgcca agcaggcgct ggagacgggt 1380
cagcggtgtg tgccggtgct gtgccaggcc cagcgcttga ccccgagca ggtggtggcc 1440
atcgccagca atattggtgg caagcaggcg ctggagacgg tcaggcgctg gttgccgggtg 1500
ctgtgccagg cccacggctt gacccccag caggtggtgg ccatcgccag caataatggt 1560
ggcaagcagg cgtggagac ggtccagcgg ctgttgccgg tgctgtgcca ggcccacggc 1620
ttgacccccc agcaggtggt ggccatcgcc agcaataatg gtggcaagca ggcgctggag 1680
acggtccagc ggctgttgcc ggtgctgtgc caggccacg gcttgacccc ccagcaggtg 1740
gtggccatcg ccagcaataa ttgtggcaag caggcgctgg agacggtcca gcggtgttg 1800
ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc ccggagcagg ttgtggccat cgccagcaat 1860
attggtggca agcaggcgct ggagacgggt caggcgctgt tgccggtgct gtgccaggcc 1920
cacggcttga ccccccagca ggtggtggcc atcgccagca atggcggtg caagcaggcg 1980
ctggagacgg tccagcggct gttgccgggt ctgtgccagg cccacggctt gacccctcag 2040
caggtggtgg ccatcgccag caatggcggc ggcaaggcgg cgtggagag cattgttgcc 2100
cagttatctc gccctgatcc ggcttggtgc gcgttgacca acgaccacct cgtcgcttg 2160
gcctgcctcg gcggcgctcc tgcgctggat gcagtgaata agggattggg ggatcctatc 2220
agccgttccc agctggtgaa gtccgagctg gaggagaaga aatccgagtt gaggcacaag 2280
ctgaagtacg tgcctccaga gtacatcgag ctgatcgaga tcgcccggaa cagcaccag 2340
gaccgtatcc tggagatgaa ggtgatggag ttcttcatga aggtgtacgg ctacaggggc 2400
aagcacctgg gcggtccag gaagcccgac ggcccatct acacgtggg ctcccccatc 2460
gactacggcg tgatcgtgga caccaaggcc tactccggcg gctacaacct gcccatcggc 2520
caggccgacg aaatgcagag gtacgtggag gagaaccaga ccaggaacaa gcacatcaac 2580
cccaacgagt ggtggaaggt gtacccctcc agcgtgaccg agttcaagtt cctgttcgtg 2640
tccggccact tcaagggcaa ctacaaggcc cagctgacca ggctgaacca catcaccaac 2700
tgcaacggcg ccgtgctgtc cgtggaggag ctctgatcg gcggcgagat gatcaaggcc 2760
ggcaccctga ccctggagga ggtgaggagg aagttcaaca acggcgagat caacttcgcg 2820
gccgactgat aa 2832

```

<210> 91

<211> 2814

<212> ДНК

<213> штучна послідовність

<220>

<223> CTLA4\_T03-L TALEN



```

<400> 91
atgggcgatc ctaaaaagaa acgtaaggtc atcgattacc catacgaatg tccagattac 60
gctatcgata tcgccgatct acgcacgctc ggctacagcc agcagcaaca ggagaagatc 120
aaaccgaagg ttctgtcgac agtggcgagc caccacgagg cactggtcgg ccacgggttt 180
acacacgcgc acatcgttgc gttaaagcaa caccgcgcag cgttagggac cgtcgctgtc 240
aagtatcagg acatgatcgc agcgttgcca gaggcgacac acgaagcgat cgttggcgctc 300
ggcaaacagt ggtccggcgc acgcgctctg gaggccttgc tcacgggtggc gggagagttg 360
agagggtccac cgttacagtt ggacacaggc caacttctca agattgcaaa acgtggcggc 420
gtgaccgcag tggaggcagt gcatgcatgg cgcaatgcac tgacgggtgc cccgctcaac 480
ttgaccccc agcagggtgt ggccatcgcc agcaatggcg gtggcaagca ggcgctggag 540
acgggtccagc ggtggttgc ggtgctgtgc caggcccaag ccttgacccc ccagcagggtg 600
gtggccatcg ccagcaatgg cgttgccaag caggcgctgg agacgggtcca gcggtgtgtg 660
ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc cccagcagg tgggtggcat cgccagcaat 720
ggcgtggca agcaggcgct ggagacggtc cagcggtgtg tgccggtgtc gtgccaggcc 780
cacggttga cccgggagca ggtggtggcc atcgccagcc acgatggcgg caagcaggcg 840
ctggagacgg tcacggcgtt gttgccggtg ctgtgccagg cccacggcctt gacccgggag 900
caggtggtgg ccatcgccag ccacgatggc ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg 960
ctgttgccgg tgctgtgcca ggcccaaggc ttgacccggg agcagggtgt ggcctcggc 1020
agcaatatg gtggcaagca ggcgctggag acggtgcagg cgctgttccc ggtgctgtgc 1080
caggcccaag gcttgacccc ccagcagggtg gtggccatcg ccagcaatgg cgttggcaag 1140
caggcgctgg agacgggtcca gcggtgtgtg ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc 1200
ccccagcagg tgggtggcat cgccagcaat aatggtggca agcaggcgct ggagacggtc 1260
cagcggtgtg tgccggtgtc gtgccaggcc cagcgcttga ccccgagca ggtggtggcc 1320
atcgccagcc acgatggcgg caagcaggcg ctggagacgg tcacggcgtc gttgccggtg 1380
ctgtgccagg cccacggcctt gacccccag caggtggtgg ccatcgccag caatggcggt 1440
ggcaagcagg cgctgggagc ggtccagcgg ctgttgccgg tgctgtgcca ggcacggc 1500
ttgacccggg agcagggtgt ggccatcgcc agcaatatg gtggcaagca ggcgctggag 1560
acgggtcagg cgctgttgc ggtgctgtgc caggcccaag ccttgacccc ccagcagggtg 1620
gtggccatcg ccagcaataa tgggtggcaag caggcgctgg agacgggtcca gcggtgtgtg 1680
ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc ccggagcagg tgggtggcat cgccagccac 1740
gatggcgca agcaggcgct ggagacggtc cagcggtgtg tgccggtgtc gtgccaggcc 1800
cacggttga ccccgagca ggtggtggcc atcgccagca atattggtg caagcaggcg 1860
ctggagacgg tgcaaggcgt gttgccggtg ctgtgccagg cccacggcctt gacccggag 1920
caggtggtgg ccatcgccag caatatgtgt ggcaagcagg cgctggagac ggtgcaggcg 1980
ctgttgccgg tgctgtgcca ggcccaaggc ttgacccctc agcagggtgt ggcctcggc 2040
agcaatggcg gcggcaggcc ggcgctggag agcattgttg cccagttatc tcgccctgat 2100
ccggcggttg ccgcgttgac caacgaccac ctgcctgcct tggcctgcct cggcgggcgt 2160
cctgcgctgg atgcagttaa aaagggattg ggggatccta tcagccgttc ccagctggtg 2220
aagtccgagc tggaggagaa gaaatccgag ttgaggcaca agctgaagta cgtgccccac 2280
gagtagatcg agctgatcga gatcgcccg aacagcacc aggacccgat cctggagatg 2340
aaggtagatg agttcttcat gaagggtgtac ggctacagg gcaagcacct gggcggtctc 2400
aggaagcccg acggcgccat ctacaccgtg ggctccccca tcgactacgg cgtgatcgtg 2460
gacaccaagg cctactccgg cggctacaac ctgcccacgc gccaggccga cgaatgcag 2520
aggtagctgg aggagaacca gaccaggaac aagcacatca accccaacga gtggtggaag 2580
gtgtaccctt ccagcgtgac cgagttcaag ttctgtgtcg tgtccggcca cttcaagggc 2640
aactacaagg cccagctgac caggctgaac cacatcacca actgcaacgg cgcgctgctg 2700
tcggtggagg agctcctgat cggcggcgag atgatcaagg ccggcacctt gaccctggag 2760
gaggtaggga ggaagttaaa caacggcgag atcaacttcg cggcgactg ataa 2814

```

<210> 92

<211> 2832

<212> ДНК

<213> штучна послідовність

<220>



&lt;223&gt; CTLA4\_T03-RTALEN

&lt;400&gt; 92

```

atgggcgatc ctaaaaagaa acgtaaggtc atcgataagg agaccgcccg tgccaagttc 60
gagagacagc acatgggacag catcgatata gccgatctac gcacgctcgg ctacagccag 120
cagcaacagg agaagatcaa accgaagggt cgttcgacag tggcgacgca ccacagggca 180
ctggtcggcc acgggtttac acacgcgcac atcgttgctg taagccaaca cccggcagcg 240
ttaggggaccg tcgctgtcaa gtatcaggac atgatcgacg cgttgccaga ggcgacacac 300
gaagcgatcg ttggcgtcgg caaacagtgg tccggcgcac gcgctctgga gcccttgctc 360
acggtggcgg gagagttagg aggtccacgg ttacagtggg acacaggcca acttctcaag 420
attgcaaaac gtggcgccgt gaccgcagtg gaggcagtg c atgcatggcg caatgcactg 480
acgggtgccc cgtcctaact gaccccccag caggtggtgg ccatcgccag caataatggt 540
ggcaagcagg cgtgggagac ggtccagcgg ctggtgcccg tgctgtgcca gggccacggc 600
ttgacccccc agcaggtggt gggccatcgcc agcaataatg gtggcaagca ggcgctggag 660
acggtccagc ggtggttggc ggtgctgtgc caggccacag gcttgacccc ggagcaggtg 720
gtggccatcg ccagccacga tggcggaag caggcgctgg agacggtcca gcgctgttg 780
ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc ccggagcagg tgggtggcat cggcagccac 840
gatggcgcca agcaggcgct ggagacgggt cagcggtgtg tgccggtgct gtgccaggcc 900
cacggcttga ccccgagca ggtggtggcc atcgccagca atattggtgg caagcaggcg 960
ctggagacgg tgacggcgct gttgcccggt ctgtgccagg cccacggctt gacccccacg 1020
caggtggtgg ccatcgccag caataatggt ggcaagcagg cgtgggagac ggtccagcgg 1080
ctggtgcccg tgctgtgcca gggccacggc ttgacccccc agcaggtggt gggccatcgcc 1140
agcaatggcg gtggcaagca ggcgctggag acggtccagc ggtggttggc ggtgctgtgc 1200
caggccacag gcttgacccc ggagcaggtg gtggccatcg ccagcaatat tgggtggcaag 1260
caggcgctgg agacgggtga ggcgctgttg ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc 1320
ccggagcagg tgggtggcat cgccagccac gatggcgcca agcaggcgct ggagacgggtc 1380
cagcggtgtg tgccggtgct gtgccaggcc cacggcttga ccccgagca ggtggtggcc 1440
atcgccagcc acgatggcg caagcaggcg ctggagacgg tccagcggtt gttgccggtg 1500
ctgtgccagg cccacggctt gacccccgag caggtggtgg ccatcgccag caatattggt 1560
ggcaagcagg cgtgggagac ggtgcaggcg ctggtgcccg tgctgtgcca gggccacggc 1620
ttgacccccg agcaggtggt gggccatcgcc agccacgatg gcggcaagca ggcgctggag 1680
acggtccagc ggtggttggc ggtgctgtgc caggccacag gcttgacccc ggagcaggtg 1740
gtggccatcg ccagcaatat tgggtggcaag caggcgctgg agacggtgca ggcgctgttg 1800
ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc cccagcagg tgggtggcat cgccagcaat 1860
aatgggtgga agcaggcgct ggagacgggt cagcggtgtg tgccggtgct gtgccaggcc 1920
cacggcttga ccccgagca ggtggtggcc atcgccagcc acgatggcgg caagcaggcg 1980
ctggagacgg tccagcggtt gttgccggtg ctgtgccagg cccacggctt gacccctcag 2040
caggtggtgg ccatcgccag caatggcgcc ggacggccgg cgtgggagag cattgttgcc 2100
cagttatctc gccctgatcc ggcgttgccc gcgttgacca acgaccacct cgtcgcttg 2160
gcctgctcgg gcggggcgtc tgccgtggat gcagtgaata agggattggg ggcctctatc 2220
agcgttccc agctggtgaa gtccgagctg gaggagaaga aatccgagtt gaggcacaag 2280
ctgaagtacg tgccccacga gtacatcgag ctgatcgaga tcgcccggaa cagcaccag 2340
gaccgtatcc tggagatgaa ggtgatggag ttcttcatga aggtgtacgg ctacaggggc 2400
aagcacctgg gcggctccag gaagcccgcac ggcgcatct acaccgtggg ctcccccatc 2460
gactacggcg tgatcgtgga caccaaggcc tactccggcg gctacaacct gcccatcgcc 2520
caggcccgacg aatgcagag gtacgtggag gagaaccaga ccaggaacaa gcacatcaac 2580
cccaacgagt ggtggaaggt gtacccctcc agcgtgaccg agttcaagtt cctgttcgtg 2640
tcgggccact tcaagggcaa ctacaaggcc cagctgacca ggtgaacca catcaccaac 2700
tgcaacggcg ccgtgctgtc cgtggaggag ctccctgatc gcggcgagat gatcaaggcc 2760
ggcaccctga ccctggagga ggtgaggagg aagttcaaca acggcgagat caacttcgcg 2820
gccgactgat aa 2832

```

&lt;210&gt; 93

&lt;211&gt; 2814

&lt;212&gt; ДНК

&lt;213&gt; штучна послідовність

```

<220>
<223> CTLA4_T04-L TALEN

<400> 93
atgggcgatc ctaaaaagaa acgtaagggtc atcgattacc catacgaatgt tccagattac 60
gctatcgata tcgccgatct acgcacgctc ggctacagcc agcagcaaca ggagaagatc 120
aaaccgaagg ttctgttcgac agtggcgagc caccacgagg cactgggtcgg ccacgggttt 180
acacacgcgc acatcgttgc gtttaagccaa caccgcggcag cgttagggac cgtcgctgtc 240
aagtatcagg acatgatcgc agcgttgcca gaggcgacac acgaagcgat cgttggcgtc 300
ggcaaacagt ggtccggcgc acgcgctctg gaggccttgc tcacggtggc gggagagttg 360
agaggtcac cgttacagtt ggacacaggg caacttctca agattgcaaa acgtggcggc 420
gtgaccgcag tggaggcagt gcatgcatgg cgaatgcac tgacgggtgc cccgctcaac 480
ttgaccccgagg agcagggtgt ggccatcgcc agccacgatg gcggcaagca ggcgtggag 540
acggtcacag ggtgtgtgcc ggtgctgtgc caggccacag gcttgacccc ggagcagggt 600
gtggccatcg ccagccacga tggcggaag caggcgctgg agacggtcca gcggtgtgtg 660
cgggtgctgt gccaggccca cggcttgacc cgggagcagg tggtgcccat cgcagcaat 720
attggtggca agcaggcgct ggagacgggt caggcgctgt tgcgggtgct gtgccaggcc 780
cacggcttga cccccagca ggtggtggcc atcgccagca atggcggttg caagcaggcg 840
ctggagacgg tccagcggct gttccgggtg ctgtgccagg cccacggctt gacccccag 900
cagggtgttg ccatcgccag caataatggt ggcaagcagg cgttgagac ggtccagcgg 960
ctgttgccgg tgcgtgtcca ggccacggc ttgaccccgagg agcagggtgt ggccatcgcc 1020
agccacgatg gcggcaagca ggcgtggag acggtcacag ggtgtgtgcc ggtgctgtgc 1080
caggccacag gcttgacccc ccagcagggt gtggccatcg ccagcaatgg cggtggaag 1140
caggcgctgg agacggtcca cggctgtgtg cgggtgctgt gccaggccca cggcttgacc 1200
ccggagcagg tgggtggccat cgccagcaat attggtggca agcaggcgct ggagacgggt 1260
caggcgctgt tgcgggtgct gtgccaggcc caggccttga cccccagca ggtggtggcc 1320
atcgccagca ataaggtgtg caagcaggcg ctggagacgg tccagcggct gttgccgggt 1380
ctgtgccagg cccacggctt gaccccgagg cagggtgttg ccatcgccag ccacgatggc 1440
ggcaagcagg cgttgagac ggtccagcgg ctgttgccgg tgcgtgtcca ggccacggc 1500
ttgaccccgagg agcagggtgt ggccatcgcc agcaatattg gtggcaagca ggcgtggag 1560
acgggtcagg cgtgtgtgcc ggtgctgtgc caggccacag gcttgacccc ggagcagggt 1620
gtggccatcg ccagcaatat tgggtggcaag caggcgctgg agacggtgca ggcgtgtgtg 1680
cgggtgctgt gccaggccca cggcttgacc cccagcagg tgggtggccat cgccagcaat 1740
ggcggtggca agcaggcgct ggagacgggt caggcgctgt tgcgggtgct gtgccaggcc 1800
cacggcttga cccccagca ggtggtggcc atcgccagca ataaggtgtg caagcaggcg 1860
ctggagacgg tccagcggct gttgccgggt cgtgtccagg cccacggctt gaccccgagg 1920
cagggtgttg ccatcgccag ccacgatggc ggcaagcagg cgttgagac ggtccagcgg 1980
ctgttgccgg tgcgtgtcca ggccacggc ttgacccctc agcagggtgt ggccatcgcc 2040
agcaatggcg gcggcaggcc ggcgtggag agcattgttg cccagttatc tcgcccgtgat 2100
ccggcgcttg ccgcgttgac caacgaccac ctcgtgcct tggcctgctt cggcgggcgt 2160
cctgcgctgg atgcagtga aaagggtatg ggggatccta tcagccgttc ccagctggtg 2220
aagtcggagc tggaggagaa gaaatccgag ttgaggcaca agctgaagta cgtgccccac 2280
gagtacatcg agctgatcga gatcgccgg aacagcacc aggaccgtat cctggagatg 2340
aagggtatgg agttcttcat gaagggttac ggctacaggg gcaagcacct gggcggtcc 2400
aggaaagccc acggcgccat ctacaccgtg ggtccccc tgaactacgg cgtgatcgtg 2460
gacaccaagg cctactccgg cggctacaac ctgcccatcg gccaggccga cgaaatgcag 2520
aggtacgtgg aggagaacca gaccaggaac aagcacatca accccaacga gtggtggaag 2580
gtgtacccct ccagcgtgac cgagttcaag ttcctgttcg tgcgggcca cttcaagggc 2640
aactacaagg cccagctgac caggctgaac cacatcacca actgcaacgg cgcggtgctg 2700
tccgtggagg agctcctgat cggcgggcag atgatcaagg ccggcaccct gaccctggag 2760
gagggtgagga ggaagttcaa caacggcgag atcaacttcg cggccgactg ataa 2814

<210> 94
<211> 2832
<212> ДНК

```

&lt;213&gt; штучна послідовність

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; CTLA4\_T04-R TALEN

&lt;400&gt; 94

atgggagatc	ctaaaaagaa	acgtaagggtc	atcgataagg	agaccgcccgc	tgccaagtgc	60
gagagacagc	acatggacag	catcgatatc	gccgatctac	gcacgctcgg	ctacagccag	120
cagcaacagg	agaagatcaa	accgaagggtt	cgttcgacag	tgccgcagca	ccacgaggca	180
ctgggtcgcc	acgggtttac	acacgcgcac	atcggtgcgt	taagccaaca	cccggcagcg	240
ttagggaccg	tcgctgtcaa	gtatcaggac	atgatcgagc	cgttgccaga	ggcgacacac	300
gaagcgatcg	ttggctcgcc	caaacagtgg	tccggcgcac	gcgctctgga	ggccttgctc	360
acgggtggcgg	gagagttgag	agggtccaccg	ttacagttgg	acacaggcca	acttctcaag	420
attgcaaaac	gtggcggcgt	gaccgcagtg	gaggcagtg	atgcatggcg	caatgcactg	480
acgggtgccc	cgctcaactt	gacccccag	cagggtggtgg	ccatcgccag	caataatggt	540
ggcaagcagg	cgctggagac	gggtccagcgg	ctggtgccgg	tgctgtgcca	ggccccaggg	600
ttgaccccg	agcaggtggt	ggccatcgcc	agccacgatg	gcggcaagca	ggcgtggtg	660
acgggtccagc	ggctgttgcc	gggtgctg	caggccccag	gcttgacccc	ccagcaggtg	720
gtggccatcg	ccagcaatgg	cgggtggcaag	caggcgctgg	agacggtcca	cggtgtgttg	780
ccgggtgctgt	gccaggccca	cggtctgacc	ccccagcagg	tggtggccat	cgccagcaat	840
aatggtggca	agcaggcgct	ggagacgggtc	cagcggtgtg	tgccggtgct	gtgccagggc	900
cacggcttga	ccccccagca	ggtggtggcc	atcgccagca	ataatggtgg	caagcaggcg	960
ctggagacgg	tccagcggct	gttgccgggtg	ctgtgccagg	cccacggctt	gaccccgagg	1020
cagggtggtgg	ccatcgccag	ccacgatggc	ggcaagcagg	cgctggagac	gggtccagcgg	1080
ctgttgccgg	tgctgtgcca	ggccccaggg	ttgaccccg	agcaggtggt	ggccatcgcc	1140
agccacgatg	gcggcaagca	ggcgtggag	acgggtccagc	ggctgttgcc	gggtgctg	1200
caggccccag	gcttgacccc	ggagcaggtg	gtggccatcg	ccagcaatat	tggtggcaag	1260
caggcgctgg	agacggtgca	ggcgtgtgtg	ccggtgctgt	gccaggccca	cggtctgacc	1320
ccccagcagg	tggtggccat	cgccagcaat	aatggtggca	agcaggcgct	ggagacgggtc	1380
cagcggtctgt	tgccggtgct	gtgccaggcc	cacggcttga	ccccccagca	ggtggtggcc	1440
atcgccagca	atggcggtgg	caagcaggcg	ctggagacgg	tccagcggct	gttgccgggtg	1500
ctgtgccagg	cccacggctt	gaccccgagg	cagggtggtgg	ccatcgccag	caatatggtg	1560
ggcaagcagg	cgctggagac	ggtgcaggcg	ctggtgccgg	tgctgtgcca	ggccccaggg	1620
ttgaccccg	agcaggtggt	ggccatcgcc	agccacgatg	gcggcaagca	ggcgtggag	1680
acgggtccagc	ggctgttgcc	gggtgctg	caggccccag	gcttgacccc	ggagcaggtg	1740
gtggccatcg	ccagccacga	tgccggcaag	caggcgctgg	agacggtcca	gcggctgttg	1800
ccgggtgctgt	gccaggccca	cggtctgacc	ccggagcagg	tggtggccat	cgccagcaat	1860
attggtggca	agcaggcgct	ggagacgggtg	caggcgctgt	tgccggtgct	gtgccaggcc	1920
cacggcttga	ccccggagca	ggtggtggcc	atcgccagcc	acgatggcgg	caagcaggcg	1980
ctggagacgg	tccagcggtc	gttgccgggtg	ctgtgccagg	cccacggctt	gacccctcag	2040
cagggtggtgg	ccatcgccag	caatggcgcc	ggcaggccgg	cgctggagag	cattgtgtgc	2100
cagttatctc	gccctgatcc	ggcgttgcc	gcgttgacca	acgaccacct	cgtcgcttg	2160
gcctgcctcg	gcgggcgtcc	tgctgtgat	gcagtgaata	agggattggg	ggatcctatc	2220
agccgttccc	agctggtgaa	gtccgagctg	gaggagaaga	aatccgagtt	gaggcacaag	2280
ctgaagtacg	tgccccacga	gtacatcgag	ctgatcgaga	tcgcccggaa	cagcaccag	2340
gaccgtatcc	tgagatgaa	ggtgatggag	ttcttcatga	aggtgtacgg	ctacaggggc	2400
aagcacctgg	gcggctccag	gaagccccgac	ggcgccatct	acaccgtggg	ctccccatc	2460
gactacggcg	tgatcggtga	caccaaggcc	tactccggcg	gctacaacct	gccccatcgg	2520
caggccgacg	aaatgcagag	gtacgtggag	gagaaccaga	ccaggaaaca	gcacatcaac	2580
ccaacagagt	ggtggaaggt	gtaccctcc	agcgtgaccg	agttcaagtt	cctgttcgtg	2640
tccggccact	tcaagggcaa	ctacaaggcc	cagctgacca	ggctgaacca	catcaccac	2700
tgcaacggcg	ccgtgctgtc	cgtggaggag	ctcctgatcg	gcggcgagat	gatcaaggcc	2760
ggcaccttga	ccctggagga	ggtgaggagg	aagttcaaca	acggcgagat	caacttcgcg	2820
gcgactgat	aa					2832

&lt;210&gt; 95



<211> 2814  
 <212> ДНК  
 <213> штучна послідовність

<220>  
 <223> PDCD1\_T01-L TALEN

```

<400> 95
atgggcgatc ctaaaaagaa acgtaaggtc atcgattacc catacgatgt tccagattac 60
gctatcgata tcgccgatct acgcacgctc ggctacagcc agcagcaaca ggagaagatc 120
aaaccgaagg ttctgttcgac agtggcgagc caccacgagg cactggtcgg ccacgggttt 180
acacacgcgc acatcgttgc gttaagccaa cacccggcag cgttagggac cgtcgctgtc 240
aagtatcagg acatgatcgc agcgttgcca gaggcgacac acgaagcgcg cgttggcgtc 300
ggcaaacagt ggtccggcgc acgcgctctg gaggccttgc tcacgggtggc gggagagtgt 360
agaggccac cgttacagtt ggacacaggg caacttctca agattgcaaa acgtggcggc 420
gtgaccgcag tggaggcagt gcatgcatgg cgcaatgcac tgacgggtgc cccgctcaac 480
ttgaccccc agcaggtggt ggccatcgcc agcaatggcg gtggcaagca ggcgctggag 540
acggtccagc ggtggtgccc ggtgctgtgc caggccacag gcttgacccc ggagcaggtg 600
gtggccatcg ccagccacga tggcgccaag caggcgctgg agacgggtcca gcggctgttg 660
ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc cccagcagg tggtagccat cgccagcaat 720
ggcggtagga agcaggcgct ggagacggtc cagcggctgt tgcgggtgct gtgccaggcc 780
cacggcttga ccccgagca ggtggtggcc atcgccagcc acgatggcgg caagcaggcg 840
ctggagacgg tccagcggct gttgcgggtg ctgtgccagg cccacggctt gaccccgag 900
cagggtggtg ccatcgccag ccacgatggc ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg 960
ctgttgccgg tgcgtgcca ggccccaggg ttgaccccg agcaggtggt ggccatcgcc 1020
agccacgatg gcggcaagca ggcgctggag acggtccagc ggtgctgtgc ggtgctgtgc 1080
caggccacag gcttgacccc ggagcaggtg gtggccaag tggcgccaag 1140
caggcgctgg agacggtcca gcggctgttg ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc 1200
ccggagcagg tggtagccat cgccagcaat attggtggca agcaggcgct ggagacggtg 1260
caggcgctgt tgcgggtgct gtgccaggcc cagcgcttga ccccccagca ggtggtggcc 1320
atcgccagca ataaggttgg caagcaggcg ctggagacgg tccagcggct gttgccgggtg 1380
ctgtgccagg cccacggctt gaccccgag cagggtggtg ccatcgccag ccacgatggc 1440
ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg ctggtgcccg tgcgtgcca ggccccaggg 1500
ttgaccccg agcaggtggt ggccatcgcc agccacgatg gcggcaagca ggcgctggag 1560
acggtccagc ggtggttgcg ggtgctgtgc caggccacag gcttgacccc ggagcaggtg 1620
gtggccatcg ccagccacga tggcgccaag caggcgctgg agacggtcca gcggctgttg 1680
ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc cccagcagg tggtagccat cgccagcaat 1740
ggcggtagga agcaggcgct ggagacggtc cagcggctgt tgcgggtgct gtgccaggcc 1800
cacggcttga ccccccagca ggtggtggcc atcgccagca ataaggttgg caagcaggcg 1860
ctggagacgg tccagcggct gttgcgggtg ctgtgccagg cccacggctt gaccccgag 1920
cagggtggtg ccatcgccag ccacgatggc ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg 1980
ctgttgcccg tgcgtgcca ggccccaggg ttgacccctc agcaggtggt ggccatcgcc 2040
agcaatggcg gcggcaggcc ggcgctggag agcattgttg cccagttatc tcgccctgat 2100
ccggcgttgg ccgcgttgac caacgaccac ctctgcgct tggcctgctt cggcgggcgt 2160
cctgcgctgg atgcagtga aaagggttgg ggggatccta tcagccgttc ccagctggtg 2220
aagtcggagc tggaggagaa gaaatccgag ttgaggcaca agctgaagta cgtgccccac 2280
gagtagatcg agctgatcga gatcgcccgg aacagcacc aggaccgat cctggagatg 2340
aaggtagtgg agttcttcat gaaggtgtac ggctacagg gcaagcacct gggcggtctc 2400
aggaaagccc acggcgccat ctacaccgtg ggctccccca tcgactacgg cgtgatcgtg 2460
gacaccaagg cctactccgg cggtacaac ctgcccacg gccaggccga cgaaatgcag 2520
aggtagctgg aggagaacca gaccaggaac aagcacatca accccaacga gtggtggaag 2580
gtgtacccct ccagcgtgac cgagttcaag ttctgttctg tgtccggcca ctccaagggc 2640
aactacaagg cccagctgac caggctgaac cacatcacca actgcaacgg cgccgtgctg 2700
tccgtggagg agctcctgat cggcggcgag atgatcaagg ccggcaccct gaccctggag 2760
gaggtgagga ggaagttcaa caacggcgag atcaacttcg cggccgactg ataa 2814

```

<210> 96

<211> 2829  
 <212> ДНК  
 <213> штучна послідовність

<220>  
 <223> PDCD1\_T01-R TALEN

```

<400> 96
atgggcgatc ctaaaaagaa acgtaagggtc atcgataagg agaccgccgc tgccaagttc 60
gagagacagc acatggacag catcgatatc gccgatctac gcacgctcgg ctacagccag 120
cagcaacagg agaagatcaa accgaagggtt cgttcgacag tggcgcgaca ccacgaggca 180
ctgggtcgcc acgggtttac acacgcgcac atcgttgctg taagccaaca cccggcagcg 240
ttaggggaccg tcgctgtcaa gtatcaggac atgatcgagc cgttgccaga ggcgacacac 300
gaagcgatcg ttggcgtcgg caaacagtggt tccggcgcac gcgctctgga ggctctgctc 360
acggtggcgg gagagttgag aggtccaccg ttacagttgg acacaggcca acttctcaag 420
attgcaaaac gtggcggcgt gaccgcagtg gaggcagtg atgcatggcg caatgcactg 480
acgggtgccc cgtcgaactt gacccccag caagtcgtcg caatcgccag caataacgga 540
gggaagcaag ccctcgaaac cgtgcagcgg ttgcttcctg tgctctgcca ggccacggc 600
cttaccctcg agcaggtggt ggccatcgca agtaacattg gaggaagca agccttgagg 660
acagtcgagg ccctgttgcc cgtcgtgtgc caggcacacg gcctcacacc agagcaggtc 720
gtggccattg cctccaacat cggggggaaa caggctctgg agaccgtcca ggccctgctg 780
cccgctctct gtcaagctca cggcctgact ccccaacaag tggtcgccat cgcctctaata 840
aacggcggga agcaggcact ggaacacagt cagagactgc tccctgtgct ttgccaaagt 900
catgggttga ccccccaaca ggtcgtcgct attgcctcaa acaacggggg caagcaggcc 960
cttgagactg tgcagaggct gttgccagtg ctgtgtcagg ctacgggct cactccacaa 1020
caggtgggtg caattgccag caacggcggc ggaagcaag ctcttgaac cgtgcaacgc 1080
ctcctgcccg tgctctgtca ggctcatggc ctgacaccac aacaagtctg ggccatcgcc 1140
agtaataatg gcgggaaaca ggctcttgag accgtccaga ggctgctccc agtgctctgc 1200
caggcacacg ggctgacccc ccagcagggtg gtggctatcg ccagcaataa tgggggcaag 1260
caggccctgg aaacagtcca gcgcctgctg ccagtgtctt gccaggctca cgggctcact 1320
ccgaacagg tcgtggcaat cgctccaac ggagggaagc aggtctctga gaccgtgcag 1380
agactgtctg ccgtcttgtg ccaggcccac ggaactcacac ctacgagggt cgtcgccatt 1440
gcctctaaca acgggggcaa acaagccctg gagacagtgc agcggctgtt gcctgtgttg 1500
tgccaagccc acggcttgac tcctcaacaa gtggtegcc a tcgctcaaa tggcgcgga 1560
aaacaagctc tggagacagt gcagaggttg ctgcccgtcc tctgccaagc ccacggcctg 1620
actcccaac aggtcgtcgc cattgccagc aacggcggag gaaagcaggc tctgaaact 1680
gtgcagcggc tgcttcctgt gctgtgtcag gctcatgggc tgacccccca gcaagtgggtg 1740
gctattgcct ctaacaatgg aggcaagcaa gcccttgaga cagtcacag gctgttgcca 1800
gtgctgtgcc aggccacagg gctcacaccc cagcaggtgg tcgccatcgc cagtaacggc 1860
gggggcaaac aggcattgga aaccgtccag cgcctgcttc cagtgtctctg ccaggcacac 1920
ggactgacac ccgaacaggt ggtggccatt gcattccatg atgggggcaa gcaggccctg 1980
gagacgtgc agagactcct gccagtggtg tgccaagctc acggcctcac ccctcagcaa 2040
gtcgtggcca tcgcctcaaa cggggggggc cggcctgcac tggagagcat tgttgcccag 2100
ttatctcgcc ctgatccggc gttggcggcg ttgaccaacg accactcgt cgccctggcc 2160
tgctcggcg ggctcctgc gctggatgca gtgaaaaagg gattggggga tcctatcagc 2220
cgttcccagc tgggtgaagt cgagctggag gagagaaat ccgagttgag gcacaagctg 2280
aagtacgtgc cccacagta catcgagctg atcgagatcg cccggaacag caccagggac 2340
cgtatcctgg agatgaaggt gatggagtgc ttcattgaagg tgtacggcta caggggcaag 2400
cacctggcg gctccaggaa gccgcaggc gccatctaca ccgtgggtc ccccatcgac 2460
tacggcgtga tcgtggacac caaggcctac tccggcggct acaacctgcc catcgccag 2520
gccgacgaaa tgcagaggtg cgtggaggag aaccagacca ggaacaagca catcaacccc 2580
aacgagtggt ggaaggtgta cccctccagc gtgaccaggt tcaagtctct gttcgtgtcc 2640
ggccacttca agggcaacta caaggcccag ctgaccaggc tgaaccacat caccactgc 2700
aacggcgccg tgctgtccgt ggaggagctc ctgatcggcg gcgagatgat caaggccggc 2760
accctgaccc tggaggaggt gaggaggaag ttcaacaacg gcgagatcaa cttcgcgccc 2820
gactgataa 2829

```

```

<210> 97
<211> 2814
<212> ДНК
<213> штучна послідовність

<220>
<223> PDCD1_T03-L TALEN

<400> 97
atgggcgatc ctaaaaagaa acgtaaggtc atcgattacc catacgatgt tccagattac 60
gctatcgata tcgccgatct acgcacgctc ggctacagcc agcagcaaca ggagaagatc 120
aaaccgaagg ttcgttcgac agtggcgagc caccacgagg cactggctcg ccacgggttt 180
acacacgcgc acatcggtgc gttaaagcaa caccgcgcag cgttagggac cgtcgctgtc 240
aagtatcagg acatgatgc agcgttgcca gaggcgacac acgaagcgat cgttgccgtc 300
ggcaaacagt ggtccggcgc acgcgctctg gaggccttgc tcacggtggc gggagagtgt 360
agaggtccac cgttacagtt ggacacaggc caacttctca agattgcaaa acgtggcggc 420
gtgaccgcag tggaggcagt gcatgcatgg cgcaatgcac tgacgggtgc cccgctcaac 480
ttgaccccgag agcagggtgt gggcatcgcc agcaatattg gtggcaagca ggcgctggag 540
acggtgcagg cgtgtgtgcc ggtgctgtgc caggccacag gcttgacccc ggagcagggt 600
gtggccatcg ccagccacga tggcggaag caggcgctgg agacggtcca gcggtgtgtg 660
ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc ccggagcagg tgggtggcat cggcagccac 720
gatggcgcca agcaggcgct ggagacggtc cagcggtgtg tgccggtgct gtgccaggcc 780
cacggttga cccccagca ggtgtggccc atcgccagca atggcggtgg caagcaggcg 840
ctggagacgg tccagcggtt gttgcgggtg ctgtgccagg cccacggctt gaccccgagg 900
caggtgggtg ccatcgccag ccacgatggc ggcaagcagg cgtggagac ggtccagcgg 960
ctggtgcccg tgcgtgtcca gggccacggc ttgaccccc agcagggtgt ggcctcggc 1020
agcaatggcg gtggcaagca ggcgctggag acggtccagc ggtgtgtgcc ggtgctgtgc 1080
caggccacag gcttgacccc ccagcagggt gtggccatcg ccagcaataa tgggtggcaag 1140
caggcgctgg agacggtcca ggggtgtgtg ccggtgtgtg gccaggccca cggcttgacc 1200
ccccagcagg tgggtggcat cggcagcaat ggcggtggca agcaggcgct ggagacggtc 1260
cagcggtgtg tgcggtgtc gtgccaggcc cagggttga cccccagca ggtgtggccc 1320
atcgccagca ataattgtgg caagcaggcg ctggagacgg tccagcggtt gttgcccgtg 1380
ctgtgccagg cccacggctt gacccccag caggtggtgg ccatcgccag caataatggt 1440
ggcaagcagg cgtggagac ggtccagcgg ctggtgccg tgcgtgtcca gggccacggc 1500
ttgaccccc agcagggtgt gggcatcgcc agcaataatg gtggcaagca ggcgctggag 1560
acggtccagc ggtgtgtgcc ggtgctgtgc caggccacag gcttgacccc ccagcagggtg 1620
gtggccatcg ccagcaataa tgggtggcaag caggcgctgg agacggtcca gcggtgtgtg 1680
ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc ccggagcagg tgggtggcat cggcagccac 1740
gatggcgcca agcaggcgct ggagacggtc cagcggtgtg tgccggtgct gtgccaggcc 1800
cacggcttga ccccgagca ggtgtggccc atcgccagcc acgatggcgg caagcaggcg 1860
ctggagacgg tccagcggtt gttgccggtg ctgtgccagg cccacggctt gacccggag 1920
caggtggtgg ccatcgccag caatattggt ggcaagcagg cgtggagac ggtgcaggcg 1980
ctggtgccgg tgcgtgtcca gggccacggc ttgaccctc agcagggtgt ggcctcggc 2040
agcaatggcg gcggcaggcc ggcgctggag agcattgttg ccagttatc tcgccctgat 2100
ccggcggttg ccggttgac caacgacac ctcgtgcctt tggcctgct cggcgggcgt 2160
cctgcgctgg atgcagtga aaagggattg ggggatccta tcagccgttc ccagctggtg 2220
aagtcagagc tggaggagaa gaaatccgag ttgaggcaca agctgaagta cgtgccccac 2280
gagtacatcg agctgatcga gatcgcccg aacagcacc aggaccgtat cctggagatg 2340
aaggtgatgg agttcttcat gaaggtgtac ggctacaggg gcaagcacct gggcggtcc 2400
aggaagcccg acggcgccat ctacacgctg ggctccccca tcgactacgg cgtgatcgtg 2460
gacaccaagg cctactccgg cggctacaac ctgcccacg gccaggccga cgaatgcag 2520
aggatcgtgg aggagaacca gaccaggaac aagcacatca accccaacga gtggtggaag 2580
gtgtacccct ccagcgtgac cgagtcaag ttctgttgc tgctcggcca cttcaagggc 2640
aactacaagg cccagctgac caggctgaac cacatcacca actgcaacgg ccgctgctg 2700
tccgtggagg agctcctgat cggcggcgag atgatcaagg ccggcacctt gaccctggag 2760
gaggtgagga ggaagttaa caacggcgag atcaacttcg cggcgactg ataa 2814

```



```

<210> 98
<211> 2829
<212> ДНК
<213> штучна послідовність

<220>
<223> PDCD1_T03-R TALEN

<400> 98
atgggcgatc ctaaaaagaa acgtaaggtc atcgataagg agaccgccgc tgccaagtgc 60
gagagacagc acatggacag catcgatata gccgatctac gcacgcctcg ctacagccag 120
cagcaacagg agaagatcaa accgaagggt cggtcgacag tggcgacaga ccacgaggca 180
ctggtcggcc acgggtttac acacgcgcac atcggtgcgt taagccaaca cccggcagcg 240
ttagggaccg tcgctgtcaa gtatcaggac atgacgcag cggtgccaga ggcgacacac 300
gaagcgatcg ttggcgctcg caaacagtgg tccggcgcac gcgctctgga ggccttgctc 360
acggtggcgg gagagttag aggtccaccg ttacagttag acacaggcca acttctcaag 420
attgcaaaac gtggcgcgct gaccgcagtg gaggcagtg atgcatggcg caatgcactg 480
acgggtgccc cgctcaactt gacccccgag caagtcgtcg caatcgccag ccatgatgga 540
gggaagcaag ccttcgaaac cgtgcagcgg ttgcttctct tgctctgcca gggccacggc 600
cttacccttc agcaggtggt ggccatcgca agtaacggag gaggaagca agccttgagg 660
acagtgcagc gcctgttgcc cgtgctgtgc caggcacacg gcctcacacc agagcaggtc 720
gtggccattg cctcccatga cggggggaaa caggctctgg agaccgtcca gaggtgctctg 780
cccgtcctct gtcaagctca cggcctgact cccaacaag ttgtcgccat cgcctctaag 840
ggcgcgcgga agcaggcact ggaacagtg cagagactgc tcctgtgct ttgccaagct 900
catgggttga ccccccaaca ggtcgtcgct attgcctcaa acgggggggg caagcaggcc 960
cttgagactg tgcagaggct gttgccagtg ctgtgtcagg ctacagggct cactccacaa 1020
caggtggtcg caattgccag caacggcgcc ggaaagcaag ctcttgaac cgtgcaacgc 1080
ctcctgcccg tgctctgtca ggtcatggc ctgacaccac aacaagctgt ggcctatgcc 1140
agtaataatg gcgggaaaca ggctcttgag accgtccaga ggctgctccc agtgcctctg 1200
caggcacacg ggtgacccc cgagcaggtg gtggctatcg ccagcaatat tggggcaag 1260
caggcccttg aacagtcaca ggcctgtctg ccagtgttt gccaggtca cgggctcact 1320
ccccagagg tcgtggcaat cgcctccaac ggcggaggga agcaggctct ggagaccgtg 1380
cagagactgc tgcccgtctt gtgccaggcc caggactca cactgaaca ggtcgtgcc 1440
attgcctctc acgatggggg caaacaagcc ctggagacag tgcagcggct gttgctgtg 1500
ttgtgccaa cccacggctt gactcctcaa caagtgtctg ccacgcctc aaatggcgcc 1560
ggaaaacaag ctctggagag agtgcagagg ttgctgcccg tcctctgcca agcccacggc 1620
ctgactcccc aacaggtcgt cgccattgcc agcaacaacg gaggaagca ggctctcgaa 1680
actgtgcagc ggtgctctcc ttgtgtgtgt caggctcatg ggtgacccc cgagcaagt 1740
gtggctattg cctctaattg aggcaagcaa gcccttgaga cagtccagag gctgttgcca 1800
gtgctgtgcc agggccacgg gctcacacc cagcaggtgg tcgcatcgc cagtaacaac 1860
gggggcaaac aggcattgga aaccgtccag cgcctgcttc cagtgtctg ccaggcacac 1920
ggactgacac ccgaacaggt ggtggccatt gcatccatg atgggggcaa gcaggccctg 1980
gagaccgtgc agagactcct gccagtgttg tgccaagctc acggcctcac cctcagcaa 2040
gtcgtggcca tcgcctcaaa cggggggggc cggcctgcac tggagagcat tgttgcccag 2100
ttatctcgcc ctgatccggc gttggccgcy ttgaccaacg accacctcgt cgccttgccc 2160
tgccctcgcg ggcgtcctgc gctggatgca gtgaaaaagg gattggggga tcctatcagc 2220
cgttccagc tgggtgaagtc cgagctggag gagaagaaat ccgagttgag gcacaagctg 2280
aagtacgtgc cccacagta catcgagctg atcgagatcg cccggaacag caccagggac 2340
cgtatcctgg agatgaaggt gatggagttc ttcataagg tgcacggcta caggggcaag 2400
cacctgggcy gctccaggaa gccgcagcgc gccatctaca ccgtgggctc ccccatcgac 2460
tacggcgtga tcgtggacac caaggcctac tccggcggtc acaacctgcc catcgccag 2520
gccgacgaaa tgcagaggtg cgtggaggag aaccagacca ggaacaagca catcaacccc 2580
aacgagtggt ggaagtgta cccctccagc gtgaccgagt tcaagttcct gttcgtgtcc 2640
ggccacttca agggcaacta caaggccagc ctgaccaggc tgaaccacat caccactgc 2700
aacggcgccg tgctgtccgt ggaggagctc ctgatcgcg gcgagatgat caaggccggc 2760

```

```

accctgaccc tggaggaggt gaggaggaag ttcaacaacg gcgagatcaa ctctgcggcc 2820
gactgataa 2829

<210> 99

<211> 60
<212> ДНК
<213> штучна послідовність

<220>
<223> прями́й прайме́р CTLA4_T01

<220>
<221> misc_feature
<222> (31); (32); (33); (34); (35); (36); (37); (38); (39); (40)
<223> п являє собою а або с, або t, або g

<400> 99
ccatctcatc cctgcgtgtc tccgactcag nnnnnnnnnn ctctacttcc tgaagacctg 60

<210> 100

<211> 60
<212> ДНК
<213> штучна послідовність

<220>
<223> прями́й прайме́р CTLA4_T03/T04

<220>
<221> misc_feature
<222> (31); (32); (33); (34); (35); (36); (37); (38); (39); (40)
<223> п являє собою а або с, або t, або g

<400> 100
ccatctcatc cctgcgtgtc tccgactcag nnnnnnnnnn acagttgaga gatggagggg 60

<210> 101

<211> 59
<212> ДНК
<213> штучна послідовність

<220>
<223> прями́й прайме́р PDCD1_T01

<220>
<221> misc_feature
<222> (31); (32); (33); (34); (35); (36); (37); (38); (39); (40)
<223> п являє собою а або с, або t, або g

<400> 101
ccatctcatc cctgcgtgtc tccgactcag nnnnnnnnnn ccacagaggt aggtgccgc 59

```



```

<210> 102
<211> 60
<212> ДНК
<213> штучна послідовність

<220>
<223> прями́й праймер PDCD1_T03

<220>
<221> misc_feature
<222> (31); (32); (33); (34); (35); (36); (37); (38); (39); (40)
<223> п являє собою а або с, або т, або г

<400> 102
ccatctcatc cctgcgtgtc tccgactcag nnnnnnnnnn gacagagatg ccggtcacca 60

<210> 103
<211> 50
<212> ДНК
<213> штучна послідовність

<220>
<223> зворотний праймер CTLA4_T01

<400> 103
cctatcccct gtgtgccttg gcagtctcag tggaatacag agccagccaa 50

<210> 104
<211> 50
<212> ДНК
<213> штучна послідовність

<220>
<223> зворотний праймер CTLA4_T03/04

<400> 104
cctatcccct gtgtgccttg gcagtctcag ggtgcccgtag cagatggaat 50

<210> 105
<211> 50
<212> ДНК
<213> штучна послідовність

<220>
<223> зворотний праймер PDCD1_T01

<400> 105
cctatcccct gtgtgccttg gcagtctcag ggctctgcag tggaggccag 50

<210> 106

```

```

<211> 50
<212> ДНК
<213> штучна послідовність

<220>
<223> зворотний праймер PDCD1_T03

<400> 106
cctatccct gtgtgccttg gcagtctcag ggacaacgcc accttcacct
50

<210> 107

<211> 281
<212> PRT
<213> штучна послідовність

<220>
<223> рТальфа-FL

<400> 107
Met Ala Gly Thr Trp Leu Leu Leu Leu Ala Leu Gly Cys Pro Ala
1 5 10 15

Leu Pro Thr Gly Val Gly Gly Thr Pro Phe Pro Ser Leu Ala Pro Pro
20 25 30

Ile Met Leu Leu Val Asp Gly Lys Gln Gln Met Val Val Val Cys Leu
35 40 45

Val Leu Asp Val Ala Pro Pro Gly Leu Asp Ser Pro Ile Trp Phe Ser
50 55 60

Ala Gly Asn Gly Ser Ala Leu Asp Ala Phe Thr Tyr Gly Pro Ser Pro
65 70 75 80

Ala Thr Asp Gly Thr Trp Thr Asn Leu Ala His Leu Ser Leu Pro Ser
85 90 95

Glu Glu Leu Ala Ser Trp Glu Pro Leu Val Cys His Thr Gly Pro Gly
100 105 110

Ala Glu Gly His Ser Arg Ser Thr Gln Pro Met His Leu Ser Gly Glu
115 120 125

Ala Ser Thr Ala Arg Thr Cys Pro Gln Glu Pro Leu Arg Gly Thr Pro
130 135 140

```

Gly Gly Ala Leu Trp Leu Gly Val Leu Arg Leu Leu Leu Phe Lys Leu  
145 150 155 160

Leu Leu Phe Asp Leu Leu Leu Thr Cys Ser Cys Leu Cys Asp Pro Ala  
165 170 175

Gly Pro Leu Pro Ser Pro Ala Thr Thr Thr Arg Leu Arg Ala Leu Gly  
180 185 190

Ser His Arg Leu His Pro Ala Thr Glu Thr Gly Gly Arg Glu Ala Thr  
195 200 205

Ser Ser Pro Arg Pro Gln Pro Arg Asp Arg Arg Trp Gly Asp Thr Pro  
210 215 220

Pro Gly Arg Lys Pro Gly Ser Pro Val Trp Gly Glu Gly Ser Tyr Leu  
225 230 235 240

Ser Ser Tyr Pro Thr Cys Pro Ala Gln Ala Trp Cys Ser Arg Ser Arg  
245 250 255

Leu Arg Ala Pro Ser Ser Ser Leu Gly Ala Phe Phe Arg Gly Asp Leu  
260 265 270

Pro Pro Pro Leu Gln Ala Gly Ala Ala  
275 280

<210> 108

<211> 263

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> pТальфа-Дельта18

<400> 108

Met Ala Gly Thr Trp Leu Leu Leu Leu Ala Leu Gly Cys Pro Ala  
1 5 10 15

Leu Pro Thr Gly Val Gly Gly Thr Pro Phe Pro Ser Leu Ala Pro Pro  
20 25 30

Ile Met Leu Leu Val Asp Gly Lys Gln Gln Met Val Val Val Cys Leu  
35 40 45

Val Leu Asp Val Ala Pro Pro Gly Leu Asp Ser Pro Ile Trp Phe Ser  
50 55 60

Ala Gly Asn Gly Ser Ala Leu Asp Ala Phe Thr Tyr Gly Pro Ser Pro  
65 70 75 80

Ala Thr Asp Gly Thr Trp Thr Asn Leu Ala His Leu Ser Leu Pro Ser  
85 90 95

Glu Glu Leu Ala Ser Trp Glu Pro Leu Val Cys His Thr Gly Pro Gly  
100 105 110

Ala Glu Gly His Ser Arg Ser Thr Gln Pro Met His Leu Ser Gly Glu  
115 120 125

Ala Ser Thr Ala Arg Thr Cys Pro Gln Glu Pro Leu Arg Gly Thr Pro  
130 135 140

Gly Gly Ala Leu Trp Leu Gly Val Leu Arg Leu Leu Leu Phe Lys Leu  
145 150 155 160

Leu Leu Phe Asp Leu Leu Leu Thr Cys Ser Cys Leu Cys Asp Pro Ala  
165 170 175

Gly Pro Leu Pro Ser Pro Ala Thr Thr Thr Arg Leu Arg Ala Leu Gly  
180 185 190

Ser His Arg Leu His Pro Ala Thr Glu Thr Gly Gly Arg Glu Ala Thr  
195 200 205

Ser Ser Pro Arg Pro Gln Pro Arg Asp Arg Arg Trp Gly Asp Thr Pro  
210 215 220

Pro Gly Arg Lys Pro Gly Ser Pro Val Trp Gly Glu Gly Ser Tyr Leu  
225 230 235 240

Ser Ser Tyr Pro Thr Cys Pro Ala Gln Ala Trp Cys Ser Arg Ser Arg  
245 250 255

Leu Arg Ala Pro Ser Ser Ser  
260

<210> 109

```

<211> 233
<212> PRT
<213> штучна послідовність

<220>
<223> рТальфа-Дельта48

<400> 109
Met Ala Gly Thr Trp Leu Leu Leu Leu Leu Ala Leu Gly Cys Pro Ala
1 5 10 15

Leu Pro Thr Gly Val Gly Gly Thr Pro Phe Pro Ser Leu Ala Pro Pro
20 25 30

Ile Met Leu Leu Val Asp Gly Lys Gln Gln Met Val Val Val Cys Leu
35 40 45

Val Leu Asp Val Ala Pro Pro Gly Leu Asp Ser Pro Ile Trp Phe Ser
50 55 60

Ala Gly Asn Gly Ser Ala Leu Asp Ala Phe Thr Tyr Gly Pro Ser Pro
65 70 75 80

Ala Thr Asp Gly Thr Trp Thr Asn Leu Ala His Leu Ser Leu Pro Ser
85 90 95

Glu Glu Leu Ala Ser Trp Glu Pro Leu Val Cys His Thr Gly Pro Gly
100 105 110

Ala Glu Gly His Ser Arg Ser Thr Gln Pro Met His Leu Ser Gly Glu
115 120 125

Ala Ser Thr Ala Arg Thr Cys Pro Gln Glu Pro Leu Arg Gly Thr Pro
130 135 140

Gly Gly Ala Leu Trp Leu Gly Val Leu Arg Leu Leu Leu Phe Lys Leu
145 150 155 160

Leu Leu Phe Asp Leu Leu Leu Thr Cys Ser Cys Leu Cys Asp Pro Ala
165 170 175

Gly Pro Leu Pro Ser Pro Ala Thr Thr Thr Arg Leu Arg Ala Leu Gly
180 185 190

Ser His Arg Leu His Pro Ala Thr Glu Thr Gly Gly Arg Glu Ala Thr

```

```

195                200                205

Ser Ser Pro Arg Pro Gln Pro Arg Asp Arg Arg Trp Gly Asp Thr Pro
 210                215                220

Pro Gly Arg Lys Pro Gly Ser Pro Val
225                230

<210> 110
<211> 219
<212> PRT
<213> штучна послідовність

<220>
<223> рТальфа-Дельта62

<400> 110
Met Ala Gly Thr Trp Leu Leu Leu Leu Ala Leu Gly Cys Pro Ala
 1                5                10                15

Leu Pro Thr Gly Val Gly Gly Thr Pro Phe Pro Ser Leu Ala Pro Pro
 20                25                30

Ile Met Leu Leu Val Asp Gly Lys Gln Gln Met Val Val Val Cys Leu
 35                40                45

Val Leu Asp Val Ala Pro Pro Gly Leu Asp Ser Pro Ile Trp Phe Ser
 50                55                60

Ala Gly Asn Gly Ser Ala Leu Asp Ala Phe Thr Tyr Gly Pro Ser Pro
 65                70                75                80

Ala Thr Asp Gly Thr Trp Thr Asn Leu Ala His Leu Ser Leu Pro Ser
 85                90                95

Glu Glu Leu Ala Ser Trp Glu Pro Leu Val Cys His Thr Gly Pro Gly
 100               105               110

Ala Glu Gly His Ser Arg Ser Thr Gln Pro Met His Leu Ser Gly Glu
 115               120               125

Ala Ser Thr Ala Arg Thr Cys Pro Gln Glu Pro Leu Arg Gly Thr Pro
 130               135               140

Gly Gly Ala Leu Trp Leu Gly Val Leu Arg Leu Leu Leu Phe Lys Leu

```

```

145                      150                      155                      160

Leu Leu Phe Asp Leu Leu Leu Thr Cys Ser Cys Leu Cys Asp Pro Ala
                      165                      170                      175

Gly Pro Leu Pro Ser Pro Ala Thr Thr Thr Arg Leu Arg Ala Leu Gly
                      180                      185                      190

Ser His Arg Leu His Pro Ala Thr Glu Thr Gly Gly Arg Glu Ala Thr
                      195                      200                      205

Ser Ser Pro Arg Pro Gln Pro Arg Asp Arg Arg
                      210                      215

<210>  111
<211>  203
<212>  PRT
<213>  штучна послідовність

<220>
<223>  рТальфа-Дельта78

<400>  111
Met Ala Gly Thr Trp Leu Leu Leu Leu Ala Leu Gly Cys Pro Ala
1      5      10      15

Leu Pro Thr Gly Val Gly Gly Thr Pro Phe Pro Ser Leu Ala Pro Pro
20     25     30

Ile Met Leu Leu Val Asp Gly Lys Gln Gln Met Val Val Val Cys Leu
35     40     45

Val Leu Asp Val Ala Pro Pro Gly Leu Asp Ser Pro Ile Trp Phe Ser
50     55     60

Ala Gly Asn Gly Ser Ala Leu Asp Ala Phe Thr Tyr Gly Pro Ser Pro
65     70     75     80

Ala Thr Asp Gly Thr Trp Thr Asn Leu Ala His Leu Ser Leu Pro Ser
85     90     95

Glu Glu Leu Ala Ser Trp Glu Pro Leu Val Cys His Thr Gly Pro Gly
100    105    110

Ala Glu Gly His Ser Arg Ser Thr Gln Pro Met His Leu Ser Gly Glu

```

```

115              120              125
Ala Ser Thr Ala Arg Thr Cys Pro Gln Glu Pro Leu Arg Gly Thr Pro
130              135              140
Gly Gly Ala Leu Trp Leu Gly Val Leu Arg Leu Leu Leu Phe Lys Leu
145              150              155              160
Leu Leu Phe Asp Leu Leu Leu Thr Cys Ser Cys Leu Cys Asp Pro Ala
165              170              175
Gly Pro Leu Pro Ser Pro Ala Thr Thr Thr Arg Leu Arg Ala Leu Gly
180              185              190
Ser His Arg Leu His Pro Ala Thr Glu Thr Gly
195              200
<210> 112
<211> 189
<212> PRT
<213> штучна послідовність
<220>
<223> рТальфа-Дельта92
<400> 112
Met Ala Gly Thr Trp Leu Leu Leu Leu Leu Ala Leu Gly Cys Pro Ala
1      5      10      15
Leu Pro Thr Gly Val Gly Gly Thr Pro Phe Pro Ser Leu Ala Pro Pro
20      25      30
Ile Met Leu Leu Val Asp Gly Lys Gln Gln Met Val Val Val Cys Leu
35      40      45
Val Leu Asp Val Ala Pro Pro Gly Leu Asp Ser Pro Ile Trp Phe Ser
50      55      60
Ala Gly Asn Gly Ser Ala Leu Asp Ala Phe Thr Tyr Gly Pro Ser Pro
65      70      75      80
Ala Thr Asp Gly Thr Trp Thr Asn Leu Ala His Leu Ser Leu Pro Ser
85      90      95
Glu Glu Leu Ala Ser Trp Glu Pro Leu Val Cys His Thr Gly Pro Gly

```



```

100              105              110
Ala Glu Gly His Ser Arg Ser Thr Gln Pro Met His Leu Ser Gly Glu
115              120              125
Ala Ser Thr Ala Arg Thr Cys Pro Gln Glu Pro Leu Arg Gly Thr Pro
130              135              140
Gly Gly Ala Leu Trp Leu Gly Val Leu Arg Leu Leu Leu Phe Lys Leu
145              150              155              160
Leu Leu Phe Asp Leu Leu Leu Thr Cys Ser Cys Leu Cys Asp Pro Ala
165              170              175
Gly Pro Leu Pro Ser Pro Ala Thr Thr Thr Arg Leu Arg
180              185
<210> 113
<211> 171
<212> PRT
<213> штучна послідовність
<220>
<223> рТальфа-Дельта110
<400> 113
Met Ala Gly Thr Trp Leu Leu Leu Leu Leu Ala Leu Gly Cys Pro Ala
1      5      10      15
Leu Pro Thr Gly Val Gly Gly Thr Pro Phe Pro Ser Leu Ala Pro Pro
20      25      30
Ile Met Leu Leu Val Asp Gly Lys Gln Gln Met Val Val Val Cys Leu
35      40      45
Val Leu Asp Val Ala Pro Pro Gly Leu Asp Ser Pro Ile Trp Phe Ser
50      55      60
Ala Gly Asn Gly Ser Ala Leu Asp Ala Phe Thr Tyr Gly Pro Ser Pro
65      70      75      80
Ala Thr Asp Gly Thr Trp Thr Asn Leu Ala His Leu Ser Leu Pro Ser
85      90      95
Glu Glu Leu Ala Ser Trp Glu Pro Leu Val Cys His Thr Gly Pro Gly

```

```

100              105              110
Ala Glu Gly His Ser Arg Ser Thr Gln Pro Met His Leu Ser Gly Glu
115              120              125
Ala Ser Thr Ala Arg Thr Cys Pro Gln Glu Pro Leu Arg Gly Thr Pro
130              135              140
Gly Gly Ala Leu Trp Leu Gly Val Leu Arg Leu Leu Leu Phe Lys Leu
145              150              155              160
Leu Leu Phe Asp Leu Leu Leu Thr Cys Ser Cys
165              170

<210>  114
<211>  167
<212>  PRT
<213>  штучна послідовність

<220>
<223>  pТальфа-Дельта114

<400>  114
Met Ala Gly Thr Trp Leu Leu Leu Leu Ala Leu Gly Cys Pro Ala
1      5      10      15
Leu Pro Thr Gly Val Gly Gly Thr Pro Phe Pro Ser Leu Ala Pro Pro
20      25      30
Ile Met Leu Leu Val Asp Gly Lys Gln Gln Met Val Val Val Cys Leu
35      40      45
Val Leu Asp Val Ala Pro Pro Gly Leu Asp Ser Pro Ile Trp Phe Ser
50      55      60
Ala Gly Asn Gly Ser Ala Leu Asp Ala Phe Thr Tyr Gly Pro Ser Pro
65      70      75      80
Ala Thr Asp Gly Thr Trp Thr Asn Leu Ala His Leu Ser Leu Pro Ser
85      90      95
Glu Glu Leu Ala Ser Trp Glu Pro Leu Val Cys His Thr Gly Pro Gly
100     105     110
Ala Glu Gly His Ser Arg Ser Thr Gln Pro Met His Leu Ser Gly Glu

```

```

115              120              125

Ala Ser Thr Ala Arg Thr Cys Pro Gln Glu Pro Leu Arg Gly Thr Pro
130              135              140

Gly Gly Ala Leu Trp Leu Gly Val Leu Arg Leu Leu Leu Phe Lys Leu
145              150              155              160

Leu Leu Phe Asp Leu Leu Leu
165

<210> 115
<211> 344
<212> PRT
<213> штучна послідовність

<220>
<223> рТальфа-FL-CD28

<400> 115
Met Ala Gly Thr Trp Leu Leu Leu Leu Leu Ala Leu Gly Cys Pro Ala
1      5      10      15

Leu Pro Thr Gly Val Gly Gly Thr Pro Phe Pro Ser Leu Ala Pro Pro
20      25      30

Ile Met Leu Leu Val Asp Gly Lys Gln Gln Met Val Val Val Cys Leu
35      40      45

Val Leu Asp Val Ala Pro Pro Gly Leu Asp Ser Pro Ile Trp Phe Ser
50      55      60

Ala Gly Asn Gly Ser Ala Leu Asp Ala Phe Thr Tyr Gly Pro Ser Pro
65      70      75      80

Ala Thr Asp Gly Thr Trp Thr Asn Leu Ala His Leu Ser Leu Pro Ser
85      90      95

Glu Glu Leu Ala Ser Trp Glu Pro Leu Val Cys His Thr Gly Pro Gly
100     105     110

Ala Glu Gly His Ser Arg Ser Thr Gln Pro Met His Leu Ser Gly Glu
115     120     125

Ala Ser Thr Ala Arg Thr Cys Pro Gln Glu Pro Leu Arg Gly Thr Pro

```

130	135	140
Gly Gly Ala Leu Trp Leu Gly Val Leu Arg Leu Leu Leu Phe Lys Leu		
145	150	155 160
Leu Leu Phe Asp Leu Leu Leu Thr Cys Ser Cys Leu Cys Asp Pro Ala		
	165	170 175
Gly Pro Leu Pro Ser Pro Ala Thr Thr Thr Arg Leu Arg Ala Leu Gly		
	180	185 190
Ser His Arg Leu His Pro Ala Thr Glu Thr Gly Gly Arg Glu Ala Thr		
	195	200 205
Ser Ser Pro Arg Pro Gln Pro Arg Asp Arg Arg Trp Gly Asp Thr Pro		
	210	215 220
Pro Gly Arg Lys Pro Gly Ser Pro Val Trp Gly Glu Gly Ser Tyr Leu		
	225	230 235 240
Ser Ser Tyr Pro Thr Cys Pro Ala Gln Ala Trp Cys Ser Arg Ser Arg		
	245	250 255
Leu Arg Ala Pro Ser Ser Ser Leu Gly Ala Phe Phe Arg Gly Asp Leu		
	260	265 270
Pro Pro Pro Leu Gln Ala Gly Ala Ala Ala Ser Gly Gly Val Leu Ala		
	275	280 285
Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg		
	290	295 300
Ser Lys Arg Ser Arg Gly Gly His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro		
	305	310 315 320
Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro		
	325	330 335
Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser		
	340	
<210>	116	
<211>	311	

```

<212> PRT
<213> штучна послідовність

<220>
<223> pТальфа-FL-CD8

<400> 116
Met Ala Gly Thr Trp Leu Leu Leu Leu Leu Ala Leu Gly Cys Pro Ala
1 5 10 15

Leu Pro Thr Gly Val Gly Gly Thr Pro Phe Pro Ser Leu Ala Pro Pro
20 25 30

Ile Met Leu Leu Val Asp Gly Lys Gln Gln Met Val Val Val Cys Leu
35 40 45

Val Leu Asp Val Ala Pro Pro Gly Leu Asp Ser Pro Ile Trp Phe Ser
50 55 60

Ala Gly Asn Gly Ser Ala Leu Asp Ala Phe Thr Tyr Gly Pro Ser Pro
65 70 75 80

Ala Thr Asp Gly Thr Trp Thr Asn Leu Ala His Leu Ser Leu Pro Ser
85 90 95

Glu Glu Leu Ala Ser Trp Glu Pro Leu Val Cys His Thr Gly Pro Gly
100 105 110

Ala Glu Gly His Ser Arg Ser Thr Gln Pro Met His Leu Ser Gly Glu
115 120 125

Ala Ser Thr Ala Arg Thr Cys Pro Gln Glu Pro Leu Arg Gly Thr Pro
130 135 140

Gly Gly Ala Leu Trp Leu Gly Val Leu Arg Leu Leu Leu Phe Lys Leu
145 150 155 160

Leu Leu Phe Asp Leu Leu Leu Thr Cys Ser Cys Leu Cys Asp Pro Ala
165 170 175

Gly Pro Leu Pro Ser Pro Ala Thr Thr Thr Arg Leu Arg Ala Leu Gly
180 185 190

Ser His Arg Leu His Pro Ala Thr Glu Thr Gly Gly Arg Glu Ala Thr
195 200 205

```

Ser Ser Pro Arg Pro Gln Pro Arg Asp Arg Arg Trp Gly Asp Thr Pro  
210 215 220

Pro Gly Arg Lys Pro Gly Ser Pro Val Trp Gly Glu Gly Ser Tyr Leu  
225 230 235 240

Ser Ser Tyr Pro Thr Cys Pro Ala Gln Ala Trp Cys Ser Arg Ser Arg  
245 250 255

Leu Arg Ala Pro Ser Ser Ser Leu Gly Ala Phe Phe Arg Gly Asp Leu  
260 265 270

Pro Pro Pro Leu Gln Ala Gly Ala Ala Ala Ser His Arg Asn Arg Arg  
275 280 285

Arg Val Cys Lys Cys Pro Arg Pro Val Val Lys Ser Gly Asp Lys Pro  
290 295 300

Ser Leu Ser Ala Arg Tyr Val  
305 310

<210> 117

<211> 325

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> pТальфа-FL-41BB

<400> 117

Met Ala Gly Thr Trp Leu Leu Leu Leu Leu Ala Leu Gly Cys Pro Ala  
1 5 10 15

Leu Pro Thr Gly Val Gly Gly Thr Pro Phe Pro Ser Leu Ala Pro Pro  
20 25 30

Ile Met Leu Leu Val Asp Gly Lys Gln Gln Met Val Val Val Cys Leu  
35 40 45

Val Leu Asp Val Ala Pro Pro Gly Leu Asp Ser Pro Ile Trp Phe Ser  
50 55 60

Ala Gly Asn Gly Ser Ala Leu Asp Ala Phe Thr Tyr Gly Pro Ser Pro  
65 70 75 80

Ala Thr Asp Gly Thr Trp Thr Asn Leu Ala His Leu Ser Leu Pro Ser  
85 90 95

Glu Glu Leu Ala Ser Trp Glu Pro Leu Val Cys His Thr Gly Pro Gly  
100 105 110

Ala Glu Gly His Ser Arg Ser Thr Gln Pro Met His Leu Ser Gly Glu  
115 120 125

Ala Ser Thr Ala Arg Thr Cys Pro Gln Glu Pro Leu Arg Gly Thr Pro  
130 135 140

Gly Gly Ala Leu Trp Leu Gly Val Leu Arg Leu Leu Leu Phe Lys Leu  
145 150 155 160

Leu Leu Phe Asp Leu Leu Leu Thr Cys Ser Cys Leu Cys Asp Pro Ala  
165 170 175

Gly Pro Leu Pro Ser Pro Ala Thr Thr Thr Arg Leu Arg Ala Leu Gly  
180 185 190

Ser His Arg Leu His Pro Ala Thr Glu Thr Gly Gly Arg Glu Ala Thr  
195 200 205

Ser Ser Pro Arg Pro Gln Pro Arg Asp Arg Arg Trp Gly Asp Thr Pro  
210 215 220

Pro Gly Arg Lys Pro Gly Ser Pro Val Trp Gly Glu Gly Ser Tyr Leu  
225 230 235 240

Ser Ser Tyr Pro Thr Cys Pro Ala Gln Ala Trp Cys Ser Arg Ser Arg  
245 250 255

Leu Arg Ala Pro Ser Ser Ser Leu Gly Ala Phe Phe Arg Gly Asp Leu  
260 265 270

Pro Pro Pro Leu Gln Ala Gly Ala Ala Gly Ser Lys Arg Gly Arg Lys  
275 280 285

Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr  
290 295 300

Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu

```

305                                310                                315                                320

Gly Gly Cys Glu Leu
325

<210> 118
<211> 296
<212> PRT
<213> штучна послідовність

<220>
<223> рТальфа-Дельта48-CD28

<400> 118
Met Ala Gly Thr Trp Leu Leu Leu Leu Leu Ala Leu Gly Cys Pro Ala
1      5      10      15

Leu Pro Thr Gly Val Gly Gly Thr Pro Phe Pro Ser Leu Ala Pro Pro
20      25      30

Ile Met Leu Leu Val Asp Gly Lys Gln Gln Met Val Val Val Cys Leu
35      40      45

Val Leu Asp Val Ala Pro Pro Gly Leu Asp Ser Pro Ile Trp Phe Ser
50      55      60

Ala Gly Asn Gly Ser Ala Leu Asp Ala Phe Thr Tyr Gly Pro Ser Pro
65      70      75      80

Ala Thr Asp Gly Thr Trp Thr Asn Leu Ala His Leu Ser Leu Pro Ser
85      90      95

Glu Glu Leu Ala Ser Trp Glu Pro Leu Val Cys His Thr Gly Pro Gly
100     105     110

Ala Glu Gly His Ser Arg Ser Thr Gln Pro Met His Leu Ser Gly Glu
115     120     125

Ala Ser Thr Ala Arg Thr Cys Pro Gln Glu Pro Leu Arg Gly Thr Pro
130     135     140

Gly Gly Ala Leu Trp Leu Gly Val Leu Arg Leu Leu Leu Phe Lys Leu
145     150     155     160

Leu Leu Phe Asp Leu Leu Leu Thr Cys Ser Cys Leu Cys Asp Pro Ala

```



```

                                165                170                175
Gly Pro Leu Pro Ser Pro Ala Thr Thr Thr Arg Leu Arg Ala Leu Gly
      180                185                190
Ser His Arg Leu His Pro Ala Thr Glu Thr Gly Gly Arg Glu Ala Thr
      195                200                205
Ser Ser Pro Arg Pro Gln Pro Arg Asp Arg Arg Trp Gly Asp Thr Pro
      210                215                220
Pro Gly Arg Lys Pro Gly Ser Pro Val Ala Ser Gly Gly Val Leu Ala
      225                230                235                240
Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg
      245                250                255
Ser Lys Arg Ser Arg Gly Gly His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro
      260                265                270
Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro
      275                280                285
Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser
      290                295

<210>  119
<211>  263
<212>  PRT
<213>  штучна послідовність

<220>
<223>  рТальфа-Дельта48-CD8

<400>  119
Met Ala Gly Thr Trp Leu Leu Leu Leu Ala Leu Gly Cys Pro Ala
1      5      10      15

Leu Pro Thr Gly Val Gly Gly Thr Pro Phe Pro Ser Leu Ala Pro Pro
      20      25      30

Ile Met Leu Leu Val Asp Gly Lys Gln Gln Met Val Val Val Cys Leu
      35      40      45

Val Leu Asp Val Ala Pro Pro Gly Leu Asp Ser Pro Ile Trp Phe Ser

```

```

50              55              60
Ala Gly Asn Gly Ser Ala Leu Asp Ala Phe Thr Tyr Gly Pro Ser Pro
65              70              75              80
Ala Thr Asp Gly Thr Trp Thr Asn Leu Ala His Leu Ser Leu Pro Ser
85              90              95
Glu Glu Leu Ala Ser Trp Glu Pro Leu Val Cys His Thr Gly Pro Gly
100             105             110
Ala Glu Gly His Ser Arg Ser Thr Gln Pro Met His Leu Ser Gly Glu
115             120             125
Ala Ser Thr Ala Arg Thr Cys Pro Gln Glu Pro Leu Arg Gly Thr Pro
130             135             140
Gly Gly Ala Leu Trp Leu Gly Val Leu Arg Leu Leu Leu Phe Lys Leu
145             150             155             160
Leu Leu Phe Asp Leu Leu Leu Thr Cys Ser Cys Leu Cys Asp Pro Ala
165             170             175
Gly Pro Leu Pro Ser Pro Ala Thr Thr Thr Arg Leu Arg Ala Leu Gly
180             185             190
Ser His Arg Leu His Pro Ala Thr Glu Thr Gly Gly Arg Glu Ala Thr
195             200             205
Ser Ser Pro Arg Pro Gln Pro Arg Asp Arg Arg Trp Gly Asp Thr Pro
210             215             220
Pro Gly Arg Lys Pro Gly Ser Pro Val Ala Ser His Arg Asn Arg Arg
225             230             235             240
Arg Val Cys Lys Cys Pro Arg Pro Val Val Lys Ser Gly Asp Lys Pro
245             250             255
Ser Leu Ser Ala Arg Tyr Val
260
<210> 120
<211> 277

```

```

<212> PRT
<213> штучна послідовність

<220>
<223> pТальфа-Дельта48-41BB

<400> 120
Met Ala Gly Thr Trp Leu Leu Leu Leu Leu Ala Leu Gly Cys Pro Ala
1 5 10 15

Leu Pro Thr Gly Val Gly Gly Thr Pro Phe Pro Ser Leu Ala Pro Pro
20 25 30

Ile Met Leu Leu Val Asp Gly Lys Gln Gln Met Val Val Val Cys Leu
35 40 45

Val Leu Asp Val Ala Pro Pro Gly Leu Asp Ser Pro Ile Trp Phe Ser
50 55 60

Ala Gly Asn Gly Ser Ala Leu Asp Ala Phe Thr Tyr Gly Pro Ser Pro
65 70 75 80

Ala Thr Asp Gly Thr Trp Thr Asn Leu Ala His Leu Ser Leu Pro Ser
85 90 95

Glu Glu Leu Ala Ser Trp Glu Pro Leu Val Cys His Thr Gly Pro Gly
100 105 110

Ala Glu Gly His Ser Arg Ser Thr Gln Pro Met His Leu Ser Gly Glu
115 120 125

Ala Ser Thr Ala Arg Thr Cys Pro Gln Glu Pro Leu Arg Gly Thr Pro
130 135 140

Gly Gly Ala Leu Trp Leu Gly Val Leu Arg Leu Leu Leu Phe Lys Leu
145 150 155 160

Leu Leu Phe Asp Leu Leu Leu Thr Cys Ser Cys Leu Cys Asp Pro Ala
165 170 175

Gly Pro Leu Pro Ser Pro Ala Thr Thr Thr Arg Leu Arg Ala Leu Gly
180 185 190

Ser His Arg Leu His Pro Ala Thr Glu Thr Gly Gly Arg Glu Ala Thr
195 200 205

```

```

Ser Ser Pro Arg Pro Gln Pro Arg Asp Arg Arg Trp Gly Asp Thr Pro
210                215                220

Pro Gly Arg Lys Pro Gly Ser Pro Val Gly Ser Lys Arg Gly Arg Lys
225                230                235                240

Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr
245                250                255

Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu
260                265                270

Gly Gly Cys Glu Leu
275

<210> 121
<211> 172
<212> PRT
<213> штучна послідовність

<220>
<223> pТальфа-Дельта114-TCРальфа.IC

<400> 121
Met Ala Gly Thr Trp Leu Leu Leu Leu Ala Leu Gly Cys Pro Ala
1          5          10          15

Leu Pro Thr Gly Val Gly Gly Thr Pro Phe Pro Ser Leu Ala Pro Pro
20          25          30

Ile Met Leu Leu Val Asp Gly Lys Gln Gln Met Val Val Val Cys Leu
35          40          45

Val Leu Asp Val Ala Pro Pro Gly Leu Asp Ser Pro Ile Trp Phe Ser
50          55          60

Ala Gly Asn Gly Ser Ala Leu Asp Ala Phe Thr Tyr Gly Pro Ser Pro
65          70          75          80

Ala Thr Asp Gly Thr Trp Thr Asn Leu Ala His Leu Ser Leu Pro Ser
85          90          95

Glu Glu Leu Ala Ser Trp Glu Pro Leu Val Cys His Thr Gly Pro Gly
100         105         110

```

Ala Glu Gly His Ser Arg Ser Thr Gln Pro Met His Leu Ser Gly Glu  
115 120 125

Ala Ser Thr Ala Arg Thr Cys Pro Gln Glu Pro Leu Arg Gly Thr Pro  
130 135 140

Gly Gly Ala Leu Trp Leu Gly Val Leu Arg Leu Leu Leu Phe Lys Leu  
145 150 155 160

Leu Leu Phe Asp Leu Leu Leu Arg Leu Trp Ser Ser  
165 170

<210> 122

<211> 173

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> pТальфа.ЕС-TCРальфа. ТМ. IC

<400> 122

Met Ala Gly Thr Trp Leu Leu Leu Leu Ala Leu Gly Cys Pro Ala  
1 5 10 15

Leu Pro Thr Gly Val Gly Gly Thr Pro Phe Pro Ser Leu Ala Pro Pro  
20 25 30

Ile Met Leu Leu Val Asp Gly Lys Gln Gln Met Val Val Val Cys Leu  
35 40 45

Val Leu Asp Val Ala Pro Pro Gly Leu Asp Ser Pro Ile Trp Phe Ser  
50 55 60

Ala Gly Asn Gly Ser Ala Leu Asp Ala Phe Thr Tyr Gly Pro Ser Pro  
65 70 75 80

Ala Thr Asp Gly Thr Trp Thr Asn Leu Ala His Leu Ser Leu Pro Ser  
85 90 95

Glu Glu Leu Ala Ser Trp Glu Pro Leu Val Cys His Thr Gly Pro Gly  
100 105 110

Ala Glu Gly His Ser Arg Ser Thr Gln Pro Met His Leu Ser Gly Glu  
115 120 125

Ala Ser Thr Ala Arg Thr Cys Pro Gln Glu Pro Leu Arg Gly Thr Pro  
130 135 140

Gly Gly Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val Ala  
145 150 155 160

Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser  
165 170

<210> 123

<211> 233

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> pТальфа.ЕС-Дельта48-1хMUT

<400> 123

Met Ala Gly Thr Trp Leu Leu Leu Leu Leu Ala Leu Gly Cys Pro Ala  
1 5 10 15

Leu Pro Thr Gly Val Gly Gly Thr Pro Phe Pro Ser Leu Ala Pro Pro  
20 25 30

Ile Met Leu Leu Val Asp Gly Lys Gln Gln Met Val Val Val Cys Leu  
35 40 45

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

Ala Gly Asn Gly Ser Ala Leu Asp Ala Phe Thr Tyr Gly Pro Ser Pro  
65 70 75 80

Ala Thr Asp Gly Thr Trp Thr Asn Leu Ala His Leu Ser Leu Pro Ser  
85 90 95

Glu Glu Leu Ala Ser Trp Glu Pro Leu Val Cys His Thr Gly Pro Gly  
100 105 110

Ala Glu Gly His Ser Arg Ser Thr Gln Pro Met His Leu Ser Gly Glu  
115 120 125

Ala Ser Thr Ala Arg Thr Cys Pro Gln Glu Pro Leu Arg Gly Thr Pro  
130 135 140

Gly Gly Ala Leu Trp Leu Gly Val Leu Arg Leu Leu Leu Phe Lys Leu  
145 150 155 160

Leu Leu Phe Asp Leu Leu Leu Thr Cys Ser Cys Leu Cys Asp Pro Ala  
165 170 175

Gly Pro Leu Pro Ser Pro Ala Thr Thr Thr Arg Leu Arg Ala Leu Gly  
180 185 190

Ser His Arg Leu His Pro Ala Thr Glu Thr Gly Gly Arg Glu Ala Thr  
195 200 205

Ser Ser Pro Arg Pro Gln Pro Arg Asp Arg Arg Trp Gly Asp Thr Pro  
210 215 220

Pro Gly Arg Lys Pro Gly Ser Pro Val  
225 230

<210> 124

<211> 233

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> pТальфа.ЕС-Дельта48-4хMUT

<400> 124

Met Ala Gly Thr Trp Leu Leu Leu Leu Leu Ala Leu Gly Cys Pro Ala  
1 5 10 15

Leu Pro Thr Gly Val Gly Gly Thr Pro Phe Pro Ser Leu Ala Pro Pro  
20 25 30

Ile Met Leu Leu Val Ala Gly Ala Gln Gln Met Val Val Val Cys Leu  
35 40 45

Val Leu Asp Val Ala Pro Pro Gly Leu Asp Ser Pro Ile Trp Phe Ser  
50 55 60

Ala Gly Asn Gly Ser Ala Leu Asp Ala Phe Thr Tyr Gly Pro Ser Pro  
65 70 75 80

Ala Thr Asp Gly Thr Trp Thr Asn Leu Ala His Leu Ser Leu Pro Ser  
85 90 95

Glu Glu Leu Ala Ser Trp Glu Pro Leu Val Cys His Thr Gly Pro Gly  
100 105 110

Ala Glu Gly His Ser Ala Ser Thr Gln Pro Met His Leu Ser Gly Glu  
115 120 125

Ala Ser Thr Ala Ala Thr Cys Pro Gln Glu Pro Leu Arg Gly Thr Pro  
130 135 140

Gly Gly Ala Leu Trp Leu Gly Val Leu Arg Leu Leu Leu Phe Lys Leu  
145 150 155 160

Leu Leu Phe Asp Leu Leu Leu Thr Cys Ser Cys Leu Cys Asp Pro Ala  
165 170 175

Gly Pro Leu Pro Ser Pro Ala Thr Thr Thr Arg Leu Arg Ala Leu Gly  
180 185 190

Ser His Arg Leu His Pro Ala Thr Glu Thr Gly Gly Arg Glu Ala Thr  
195 200 205

Ser Ser Pro Arg Pro Gln Pro Arg Asp Arg Arg Trp Gly Asp Thr Pro  
210 215 220

Pro Gly Arg Lys Pro Gly Ser Pro Val  
225 230

<210> 125

<211> 848

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> мультиланцюговий CAR

<400> 125

Met Ala Pro Ala Met Glu Ser Pro Thr Leu Leu Cys Val Ala Leu Leu  
1 5 10 15

Phe Phe Ala Pro Asp Gly Val Leu Ala Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser  
20 25 30

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



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

Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn  
65 70 75 80

Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr  
85 90 95

Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr  
100 105 110

Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Thr Tyr Tyr Tyr  
115 120 125

Gly Ser Arg Val Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val  
130 135 140

Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly  
145 150 155 160

Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Pro Ser Ile Pro Val Thr Pro  
165 170 175

Gly Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu Asn  
180 185 190

Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln  
195 200 205

Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val  
210 215 220

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr Leu Arg  
225 230 235 240

Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln  
245 250 255

His Leu Glu Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu  
260 265 270

Lys Arg Ala Asp Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala

275	280	285
Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg	Pro Glu Ala Cys Arg	
290	295	300
Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys		
305	310	315 320
Asp Phe Phe Ile Pro Leu Leu Val Val Ile Leu Phe Ala Val Asp Thr		
325	330	335
Gly Leu Phe Ile Ser Thr Gln Gln Gln Val Thr Phe Leu Leu Lys Ile		
340	345	350
Lys Arg Thr Arg Lys Gly Phe Arg Leu Leu Asn Pro His Pro Lys Pro		
355	360	365
Asn Pro Lys Asn Asn Arg Ala Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys		
370	375	380
Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Met Asp Thr Glu Ser Asn Arg		
385	390	395 400
Arg Ala Asn Leu Ala Leu Pro Gln Glu Pro Ser Ser Val Pro Ala Phe		
405	410	415
Glu Val Leu Glu Ile Ser Pro Gln Glu Val Ser Ser Gly Arg Leu Leu		
420	425	430
Lys Ser Ala Ser Ser Pro Pro Leu His Thr Trp Leu Thr Val Leu Lys		
435	440	445
Lys Glu Gln Glu Phe Leu Gly Val Thr Gln Ile Leu Thr Ala Met Ile		
450	455	460
Cys Leu Cys Phe Gly Thr Val Val Cys Ser Val Leu Asp Ile Ser His		
465	470	475 480
Ile Glu Gly Asp Ile Phe Ser Ser Phe Lys Ala Gly Tyr Pro Phe Trp		
485	490	495
Gly Ala Ile Phe Phe Ser Ile Ser Gly Met Leu Ser Ile Ile Ser Glu		
500	505	510

Arg Arg Asn Ala Thr Tyr Leu Val Arg Gly Ser Leu Gly Ala Asn Thr  
515 520 525

Ala Ser Ser Ile Ala Gly Gly Thr Gly Ile Thr Ile Leu Ile Ile Asn  
530 535 540

Leu Lys Lys Ser Leu Ala Tyr Ile His Ile His Ser Cys Gln Lys Phe  
545 550 555 560

Phe Glu Thr Lys Cys Phe Met Ala Ser Phe Ser Thr Glu Ile Val Val  
565 570 575

Met Met Leu Phe Leu Thr Ile Leu Gly Leu Gly Ser Ala Val Ser Leu  
580 585 590

Thr Ile Cys Gly Ala Gly Glu Glu Leu Lys Gly Asn Lys Val Pro Glu  
595 600 605

Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met  
610 615 620

Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe  
625 630 635 640

Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Gly Ser Gly Val Lys Gln  
645 650 655

Thr Leu Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val Glu Ser Asn  
660 665 670

Pro Gly Pro Met Ile Pro Ala Val Val Leu Leu Leu Leu Leu Val  
675 680 685

Glu Gln Ala Ala Ala Leu Gly Glu Pro Gln Leu Cys Tyr Ile Leu Asp  
690 695 700

Ala Ile Leu Phe Leu Tyr Gly Ile Val Leu Thr Leu Leu Tyr Cys Arg  
705 710 715 720

Leu Lys Ile Gln Val Arg Lys Ala Ala Ile Thr Ser Tyr Glu Lys Ser  
725 730 735

Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly

740 745 750

Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr  
755 760 765

Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys  
770 775 780

Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys  
785 790 795 800

Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg  
805 810 815

Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala  
820 825 830

Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg  
835 840 845

<210> 126  
<211> 2547  
<212> ДНК  
<213> штучна послідовність

<220>  
<223> мультиланцюговий CAR

<400> 126  
atggctcctg ccatggaatc cctactctta ctgtgtgtag ccttactgtt cttcgtctcca 60  
gatggcgtgt tagcagaggt gcagttgcag cagtcagggc cagagttgat taagcccgga 120  
gcctccgtca agatgtcctg caaggccagc gggtagactt tcaccagcta cgtcatgcat 180  
tggtgtgaagc agaagccagg ccaggggcctt gagtggattg ggtacatcaa cccctacaac 240  
gacgggacca aatacaacga gaaattcaag ggcaagcca cactcacctc cgataagtcc 300  
tcctctaccg cctacatgga gctcagctcc ctgacctccg aggatagcgc tgtgtattac 360  
tcgcgaaggg gcacatacta ctatggctct aggggtgttc actactgggg gcagggcact 420  
actctcacag tgagctcagg cggaggaggc agtggcggag ggggaagtgg gggcggcggc 480  
agcgatattg tcatgaccca gccagccctt agtatccctg tgactccagg cgagagcgtg 540  
agcatcagct gccggtccag caagagcctg ctgaacagta acggaaacac atacctctac 600  
tggtttctgc agaggcccg ccagagccct cagctgctga ttaccgcat gtcaaatctt 660  
gcctctgggg tgcccgatag atttagtggg agcggatccg gcacagcttt tacattgcgg 720  
atctccagag tcgaggccga agacgtgggg gtctattact gtatgcaaca cctggaatac 780  
ccctttacct tcggagccgg cacaagactg gagctgaagc gggctgacac cacaaccccc 840  
gctccaaggg cccctacccc cgcaccaact attgcctccc agccactctc actgcggcct 900  
gaggcctgtc gggccgctgc tggaggcgca gtgcatacaa ggggcctcga ttctgcctgc 960  
gattttttta tcccattggt ggtggtgatt ctgtttgctg tggacacagg attatttacc 1020  
tcaactcagc agcaggtcac atttctcttg aagattaaga gaaccaggaa aggcttcaga 1080  
cttctgaacc cacatcctaa gccaaacccc aaaaaaaca gagccgaggg cagagggcagc 1140  
ctgctgacct gcggcgacgt ggaggagaac ccaggcccca tggacacaga aagtaatagg 1200  
agagcaaatc ttgctctccc acaggagcct tccagtgtgc ctgcatttga agtcttgga 1260

atatctcccc aggaagtatc ttcaggcaga ctattgaagt cggcctcatc cccaccactg 1320  
catacatggc tgacagtttt gaaaaaagag caggagtctc tgggggtaac acaaatctctg 1380  
actgctatga tatgcctttt ttttggaaaca gttgtctgct ctgtacttga tatttcacac 1440  
attgagggag acattttttt atcattttaa gcaggttatc cattctgggg agccatattt 1500  
ttttctattt ctggaatggt gtcaattata tctgaaagga gaaatgcaac atatctgggtg 1560  
agagggaagc tgggagcaaa cactgccagc agcatagctg ggggaacggg aattaccatc 1620  
ctgatcatca acctgaagaa gagcttgccc tatatccaca tcacagttg ccagaaatctt 1680  
tttgagacca agtgctttat ggcttccttt tccactgaaa ttgtagtgat gatgctgttt 1740  
ctcaccatct tgggaacttg tagtgctgtg tcactcacia tctgtggagc tggggaagaa 1800  
ctcaaaggaa acaaggttcc agagaaacgg ggccggaaga agctcctcta catttttaag 1860  
cagcctttca tgcggccagt gcagacaacc caagaggagg atgggtgttc ctgcagattc 1920  
cctgagggaag aggaaggcgg gtgcgagctg ggttctggcg tgaacagac ttggaatttt 1980  
gaccttctca agttggcggg agacgtggag tccaacccag ggcccatgat tccagcagtg 2040  
gtcttgctct tactcctttt ggttgaacaa gcagcggccc tgggagagcc tcagctctgc 2100  
tatatcctgg atgccatcct gtttctgtat ggaattgtcc tcacctcctc ctactgtcga 2160  
ctgaagatcc aagtgcgaaa gccagctata accagctatg agaaatcaag agtgaagttc 2220  
tccaggagcg cagatgcccc cgcctatcaa cagggccaga accagctcta caacgagctt 2280  
aacctcggga ggcgcgaaga atacgacgtg ttggataaga gaagggggcg ggaccccgag 2340  
atgggaggaa agccccggag gaagaacctt caggaggggc tgtacaacga gctgcagaag 2400  
gataagatgg ccgaggccta ctccagatc gggatgaagg gggagcggcg ccgagggaag 2460  
gggcacgatg ggctctacca ggggctgagc acagccacaa aggacacata cgacgccttg 2520  
cacatgcagg cccttcacac ccggtga 2547

## ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

5

1. Спосіб одержання Т-клітин для імунотерапії, який включає:  
(а) модифікацію Т-клітин шляхом інактивації щонайменше:  
першого гена, який експресує мішень імуносупресорного засобу, і

другого гена, що кодує TCR-альфа або TCR-бета,

(b) експансію вказаних клітин.

2. Спосіб одержання Т-клітин для імунотерапії за п. 1, який включає наступні стадії:

(a) забезпечення Т-клітини;

5 (b) вибір гена у вказаній Т-клітині, який експресує мішень імуносупресорного засобу;

(c) введення у вказану Т-клітину рідкорозщеплювальних ендонуклеаз, здатних селективно інактивувати шляхом розщеплення ДНК, відповідно:

вказаний ген, що кодує мішень вказаного імуносупресорного засобу, і

щонайменше один ген, що кодує TCR-альфа або TCR-бета;

10 (d) експансія вказаних клітин.

3. Спосіб за п. 1 або 2, де вказана мішень імуносупресорного засобу являє собою рецептор імуносупресорного засобу.

4. Спосіб за будь-яким з пп. 1-3, де вказані трансформовані Т-клітини здійснюють експансію в крові пацієнта.

15 5. Спосіб за будь-яким з пп. 1-4, де вказані трансформовані Т-клітини здійснюють експансію *in vivo*.

6. Спосіб за будь-яким з пп. 1-5, де вказані трансформовані Т-клітини здійснюють експансію в присутності вказаного імуносупресорного засобу.

20 7. Спосіб за будь-яким з пп. 1-6, де вказаний ген експресує мішень імуносупресорного засобу, що являє собою CD52, і вказаний імуносупресорний засіб являє собою антитіло, спрямоване на антиген CD52.

8. Спосіб за будь-яким з пп. 1-6, де вказаний ген експресує глюкокортикоїдний рецептор (GR), і вказаний специфічний імуносупресорний засіб являє собою кортикостероїд, такий як дексаметазон.

25 9. Спосіб за будь-яким з пп. 1-6, де щонайменше два інактивовані гени вибрані з групи, яка складається з CD52 і TCR-альфа, CD52 і TCR-бета, GR і TCR-альфа, GR і TCR-бета.

10. Спосіб за будь-яким з пп. 2-9, де вказані рідкорозщеплювальні ендонуклеази котрансфікують на стадії с).

30 11. Спосіб за будь-яким з пп. 2-10, де вказані рідкорозщеплювальні ендонуклеази кодуються мРНК.

12. Спосіб за будь-яким з пп. 2-11, де вказані рідкорозщеплювальні ендонуклеази вводять у вказану клітину на стадії (с) шляхом електропорації РНК.

35 13. Спосіб за п. 12, який включає на стадії (с) контакт вказаної Т-клітини з РНК, що кодує рідкорозщеплювальну ендонуклеазу, і застосування гнучкої послідовності імпульсів, що складається з:

(a) одного електричного імпульсу з діапазоном напруги від 2250 до 3000 В на сантиметр, із шириною імпульсу 0,1 мсек і інтервалом імпульсів 0,2-10 мсек між електричними імпульсами стадій (a) і (b);

40 (b) одного електричного імпульсу з діапазоном напруги від 2250 до 3000 В з шириною імпульсу 100 мсек і інтервалом імпульсів 100 мсек між електричним імпульсом на стадії (b) і першим електричним імпульсом на стадії (с); і

(c) 4 електричних імпульсів з напругою 325 В з шириною імпульсу 0,2 мсек і інтервалом імпульсів 2 мсек між кожним з 4 електричних імпульсів.

45 14. Спосіб за будь-яким з пп. 2-13, де вказані рідкорозщеплювальні ендонуклеази являють собою TALE-нуклеази.

15. Спосіб за п. 14, де щонайменше одна з цих TALE-нуклеаз спрямована проти однієї з послідовностей-мішеней гена TCR-альфа, вибраних з SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:57-SEQ ID NO:60.

50 16. Спосіб за п. 14, де щонайменше одна з цих TALE-нуклеаз спрямована проти однієї з послідовностей-мішеней гена TCR-бета, вибраних з SEQ ID NO:38 і SEQ ID NO:39.

17. Спосіб за п. 14, де щонайменше одна з цих TALE-нуклеаз спрямована проти однієї з послідовностей-мішеней гена GR, вибраних з SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:6.

18. Спосіб за п. 14, де щонайменше одна з цих TALE-нуклеаз спрямована проти однієї з послідовностей-мішеней гена CD52, вибраних з SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:61-SEQ ID NO:65.

55 19. Спосіб за будь-яким з пп. 1-18, що включає введення у вказані Т-клітини химерного рецептора антигену (CAR).

20. Спосіб за п. 19, де вказана послідовність химерного рецептора антигену являє собою SEQ ID NO:73.

60 21. Спосіб за п. 19, де вказаний химерний рецептор антигену являє собою мультиланцюговий химерний рецептор антигену.

22. Спосіб за будь-яким з пп. 1-21, що включає введення у вказану Т-клітину поліпептиду рТ-альфа або його функціонального варіанта.
23. Спосіб за будь-яким з пп. 1-22, що включає введення в вказану Т-клітину TALE-нуклеази, здатної селективно інактивувати шляхом розщеплення ДНК ген PDCD1 або CTLA-4.
- 5 24. Спосіб за будь-яким з пп. 1-23, де вказані Т-клітини на стадії а) отримані з Т-лімфоцитів зони запалення, цитотоксичних Т-лімфоцитів, регуляторних Т-лімфоцитів або хелперних Т-лімфоцитів.
25. Спосіб за будь-яким з пп. 1-23, де вказані Т-клітини на стадії а) отримані з CD4+ Т-лімфоцитів і/або CD8+ Т-лімфоцитів.
- 10 26. Виділена Т-клітина людини або клітинна лінія людини, отримана способом за будь-яким з пп. 1-25.
27. Виділена Т-клітина, у якій щонайменше два гени, вибрані з групи, яка складається з: CD52 і TCR-альфа, CD52 і TCR-бета, GR і TCR-альфа, GR і TCR-бета, інактивовані.
28. Виділена Т-клітина за п. 26 або 27, яка додатково включає екзогенну полінуклеотидну послідовність, що кодує химерний рецептор антигену.
- 15 29. Виділена Т-клітина за п. 28, де вказаний химерний рецептор антигену являє собою мультиланцюговий химерний рецептор антигену.
30. Виділена Т-клітина за будь-яким з пп. 26-29, яка додатково включає екзогенну нуклеїнову кислоту, що включає щонайменше фрагмент транскена рТ-альфа для підтримки поверхневої експресії CD3.
- 20 31. Виділена Т-клітина за будь-яким з пп. 26-30 для застосування як лікарського засобу.
32. Виділена Т-клітина за будь-яким з пп. 26-30 для лікування раку або вірусної інфекції.
33. Виділена Т-клітина за будь-яким з пп. 26-30 для лікування лімфоми.
34. Фармацевтична композиція, що містить щонайменше одну виділену Т-клітину за будь-яким з пп. 26-33.
- 25 35. Спосіб лікування пацієнта, у якого діагностований рак або вірусна інфекція, що включає:  
(а) одержання популяції Т-клітин відповідно до способу за будь-яким з пп. 1-25;  
(б) введення вказаних трансформованих Т-клітин вказаному пацієнту.
36. Спосіб за п. 35, де вказаному пацієнту надають лікування з вказаним імуносупресорним засобом, використовуваним у способі за пп. 1-25.
- 30 37. Виділена Т-клітина, що включає щонайменше два полінуклеотиди, причому вказані полінуклеотиди кодують щонайменше першу і другу TALEN, причому перша TALEN спрямована проти гена TCR-альфа або TCR-бета, і друга спрямована проти гена, що кодує мішень імуносупресорного засобу.
- 35 38. Виділена Т-клітина за п. 37, де вказана друга TALEN спрямована проти гена, що кодує CD52 або GR.
39. Виділена Т-клітина за будь-яким з пп. 37 або 38, де вона додатково включає полінуклеотидну послідовність, що кодує химерний рецептор антигену.
- 40 40. Виділена Т-клітина за будь-яким з пп. 37-39, де вона додатково включає полінуклеотид, що включає щонайменше фрагмент рТ-альфа для підтримки поверхневої експресії CD3.

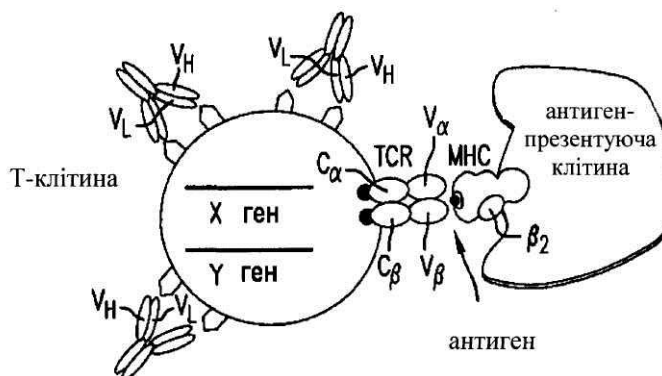
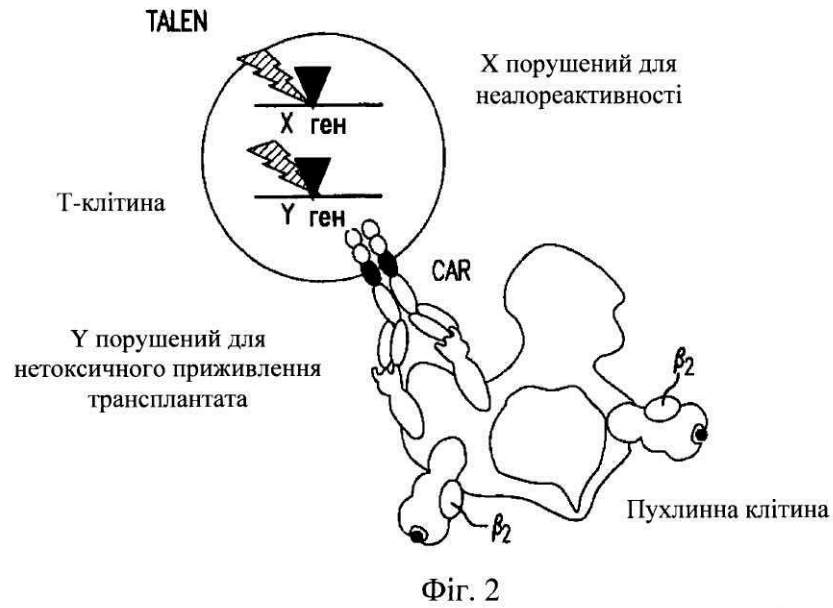
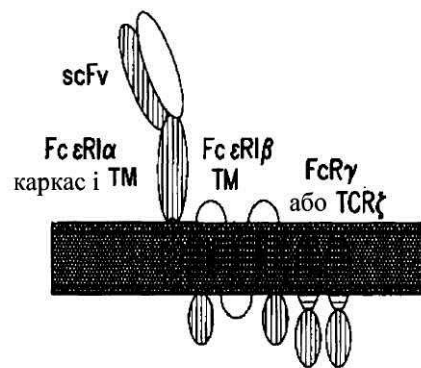


Fig. 1



#### Мультиланцюговий CAR



активуючі сигнальні домени  
 - бета-ланцюг дозволяє всім  
 сигнальним доменам знаходитися в  
 природному навколомембранному  
 положенні  
 - бета-ланцюг уже розташований для  
 взаємодії сигналів від FcRg або TCR-  
 дзета

Фіг. 3

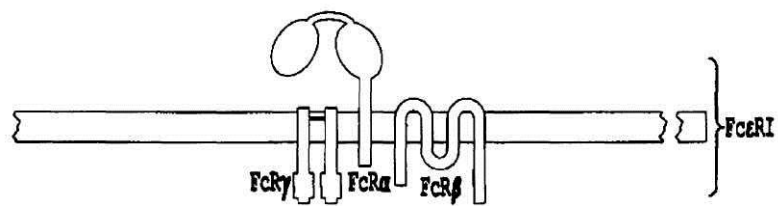


Fig. 4A

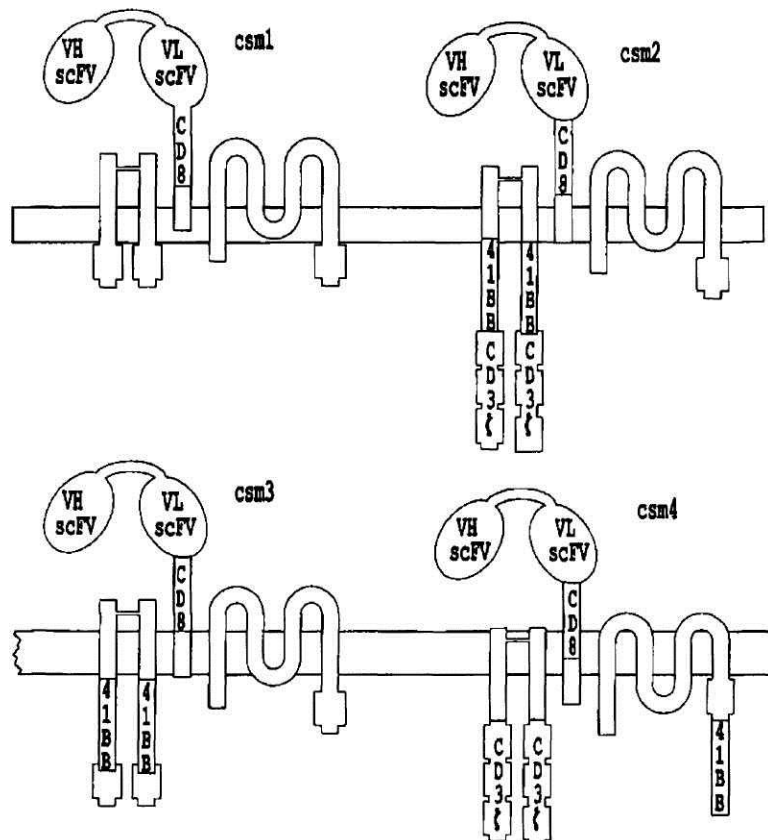


Fig. 4B



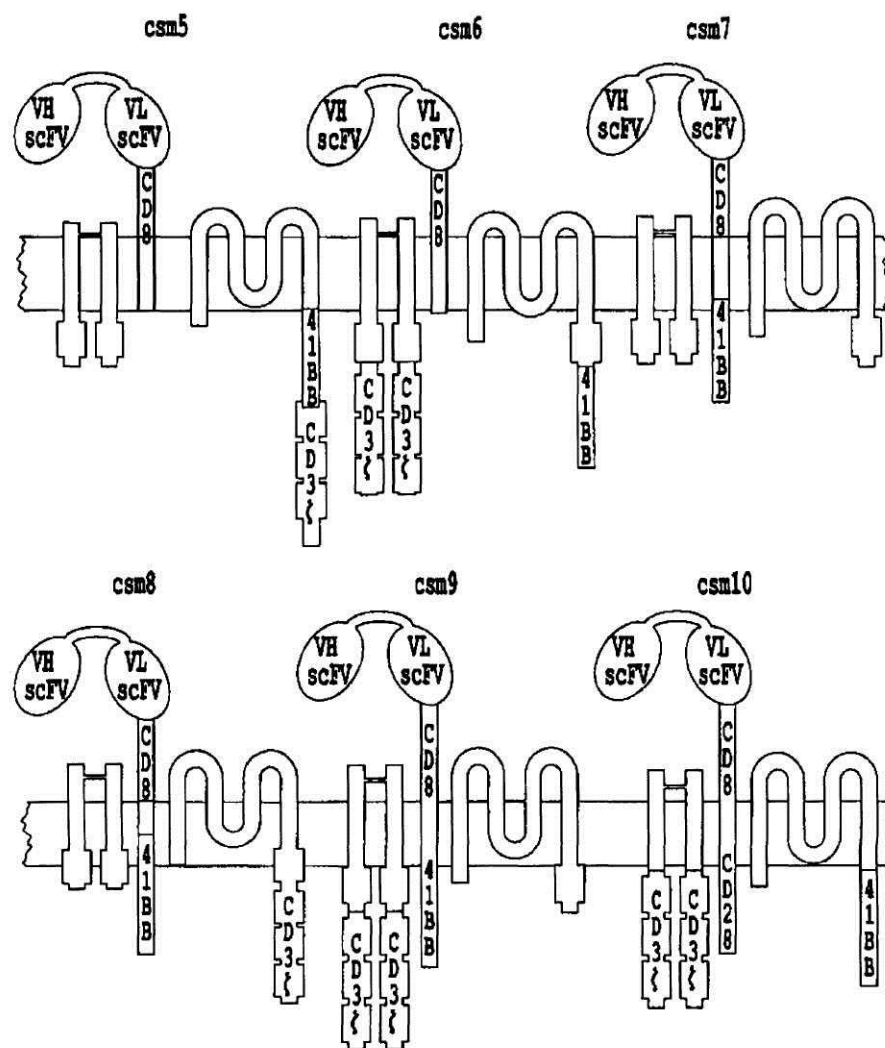
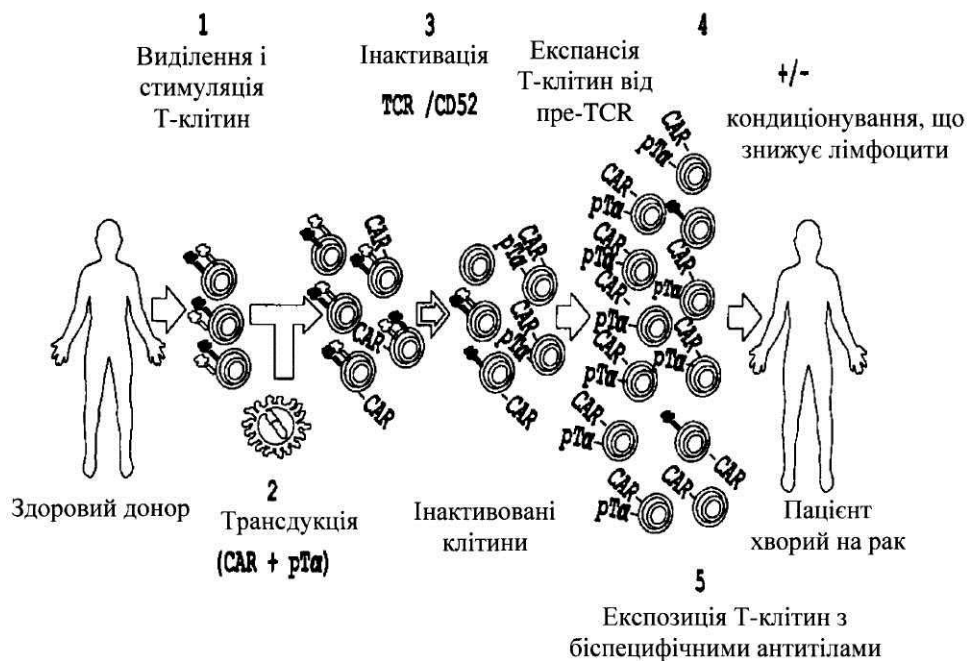
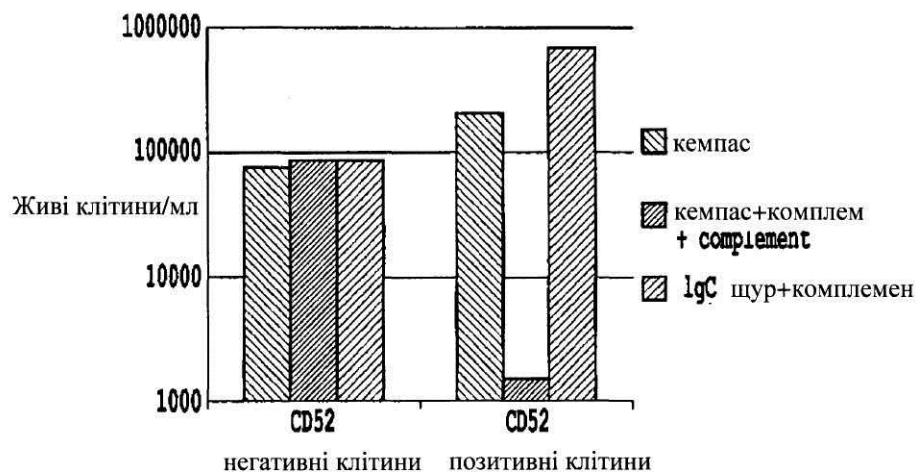


Fig. 4C

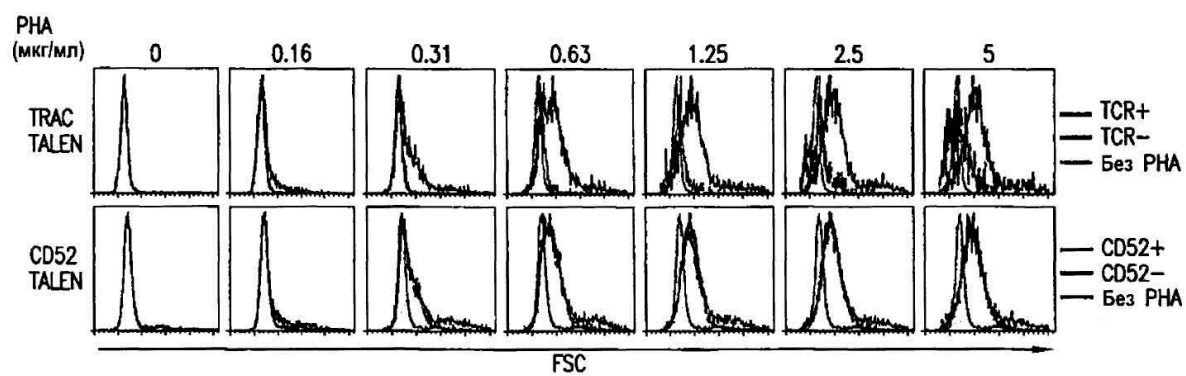


- CD52 руйнування CD52 забезпечує стійкість до хіміотерапії
- TCR руйнування TCR $\alpha$  знімає алореактивність (GvHD)
- CAR переспрямування Т-клітин/розпізнавання пухлини
- pTa пре-TCR $\alpha$ (pTa) керує клітинною проліферацією

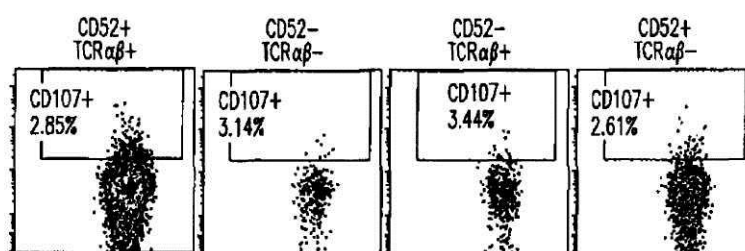
Фіг. 5



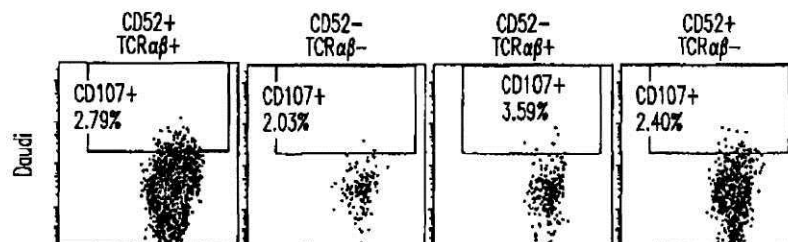
Фіг. 6



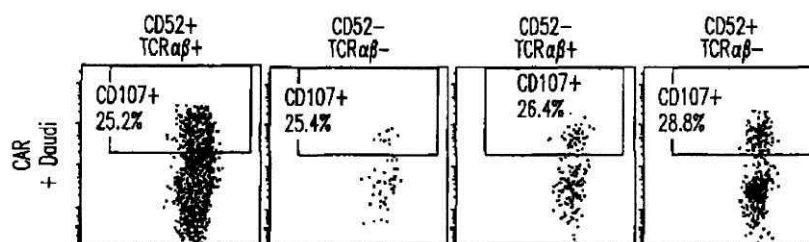
Фиг. 7



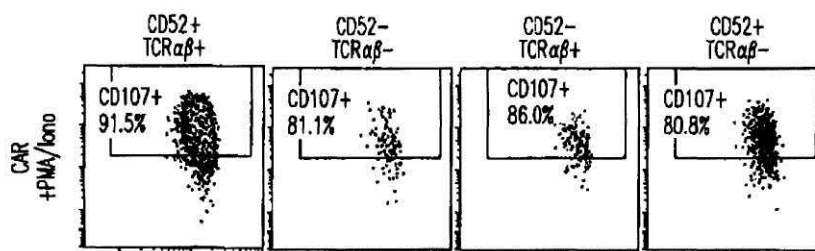
Фиг. 8A



Фиг. 8B



Фиг. 8C



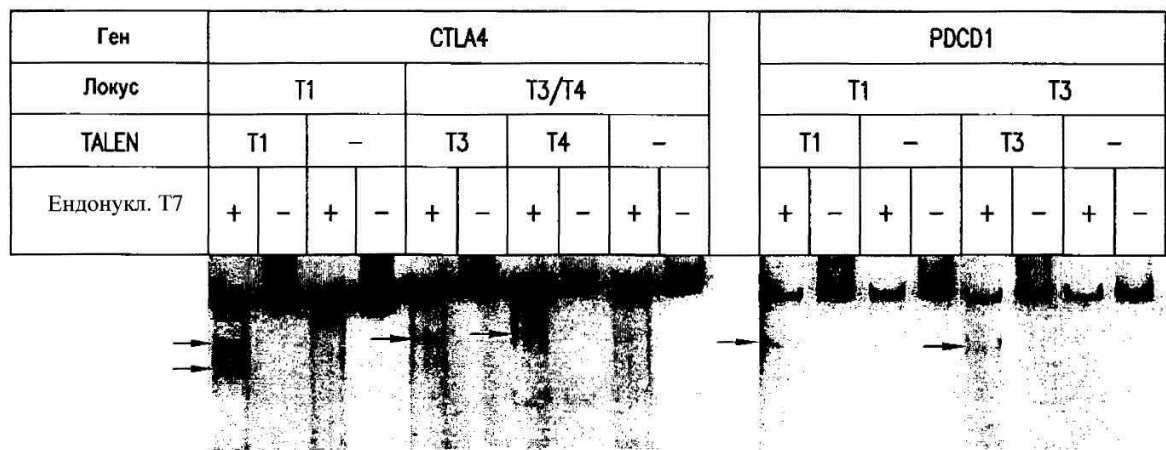
Фіг. 8Е

	ЛІВА ПОЛОВИНА МІШЕНІ	Розмір спайсера (п.о.)	ПРАВА ПОЛОВИНА МІШЕНІ	
TRAC	TTGTCCACAGATATCC	15	CCGTGTACCCAGCTGAGA	
CD52	TTCCTCCTACTCACCAT	15	GGTACAGGTAAGAGCA A	
Потенційна будова мішеней	Ліва вирівняна послідовність	Розмір спайсера (п.о.)	Права вирівняна послідовність	Помилкове спарювання
1	ttgtctcCaccAgtaTA	25	TTtTcaggtaagTgcaa	8
2	tCActcttacctgGacc	19	CCtacaggtaagGgcCa	7
3	tctcagAtgAtacacCC	24	AgtaCaggCaTgagcCa	8
4	tGAtccacagaAatAc	18	gCatTtctgtgggaTca	8
5	ttCctctAacctgtaTT	25	gAtCcaggtaagGTcaa	8
6	tAgtoCCcagatatGA	19	aAggtgTgGaTgaggaa	8
7	ttgtcAcacATataCcG	21	TgGtatTtgtgTgacaa	8
8	tAActcttacctgtaGT	16	AgatTtctCtgggGcaa	8
9	ttActccAactAacTat	16	ccgtTtaccGgctTaga	7
10	tGgtcAtacctgtaGT	14	aGgAtgagGTggaggaa	8
11	ttgtcAtacAtgtGcA	21	atgCtgTgtaggTggTa	8
12	ttgtccacagaCatTc	18	ccACgtaGcagctgGga	6
13	tcAcaCctggtacaTAg	27	GtgTtTagtaggGggaa	8
14	ttgtccacagCtaCcc	29	gAgTctTtgtAggacaa	6
15	tctcaActgAAacaAgg	23	TgtaAtgTcaagagcaa	8

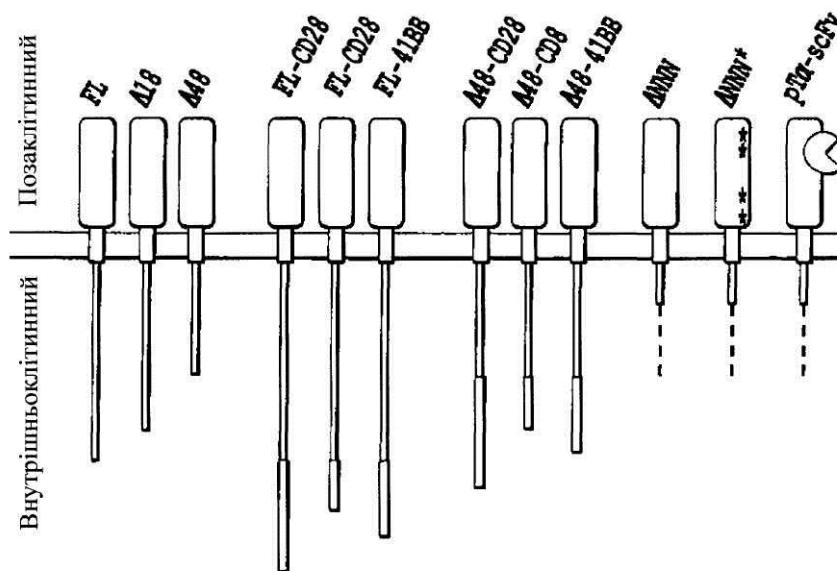
Фіг. 9А

	Контрольна трансфекція (без РНК)			Трансфекція CD52-TALEN+TRAC+TALEN		
	п. о. аналізованих послідовностей	п. о. вставок/делецій	Частота вставок/делецій (менше ніж)	п. о. аналізованих послідовностей	п. о. вставок/делецій	Частота вставок/делецій (менше ніж)
	3965	0	2.52E-04	7560	3371	0.44
	1046	0	9.56E-04	2266	1056	0.47
Вирівняна послідовність						
CD52-R_TRAC-R	7132	0	1.4E-04	7644	1	1.3E-04
CD52-R_TRAC-R	6431	0	1.6E-04	7377	2	2.7E-04
CD52-R_TRAC-R	2771	0	3.6E-04	2704	80	3.7E-04
TRAC-L_CD52-L	5525	0	1.8E-04	4739	0	2.1E-04
CD52-R_TRAC-R	27958	0	3.6E-05	16646	0	6.0E-05
TRAC-L_CD52-L	22456	0	4.5E-05	32912	10	3.0E-04
TRAC-L_CD52-L	8275	0	1.2E-04	5629	0	1.8E-04
TRAC-L_CD52-R	23253	0	4.3E-05	22054	16	7.3E-04
CD52-L_TRAC-R	13371	0	7.5E-05	13688	1	7.3E-05
CD52	22856	0	4.4E-05	31292	0	3.2E-05
CD52	3238	1	3.1E-04	3064	0	3.3E-04
TRAC	4530	0	2.2E-04	4652	0	2.1E-04
CD52-L_TRAC-R	17361	0	5.8E-05	14454	0	6.9E-05
TRAC-L_CD52-L	32823	0	3.0E-05	33911	1	2.9E-05
CD52-R_TRAC-R	6479	0	1.5E-04	6088	0	1.6E-04

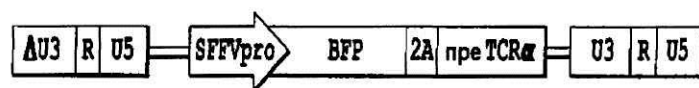
Фіг. 9В



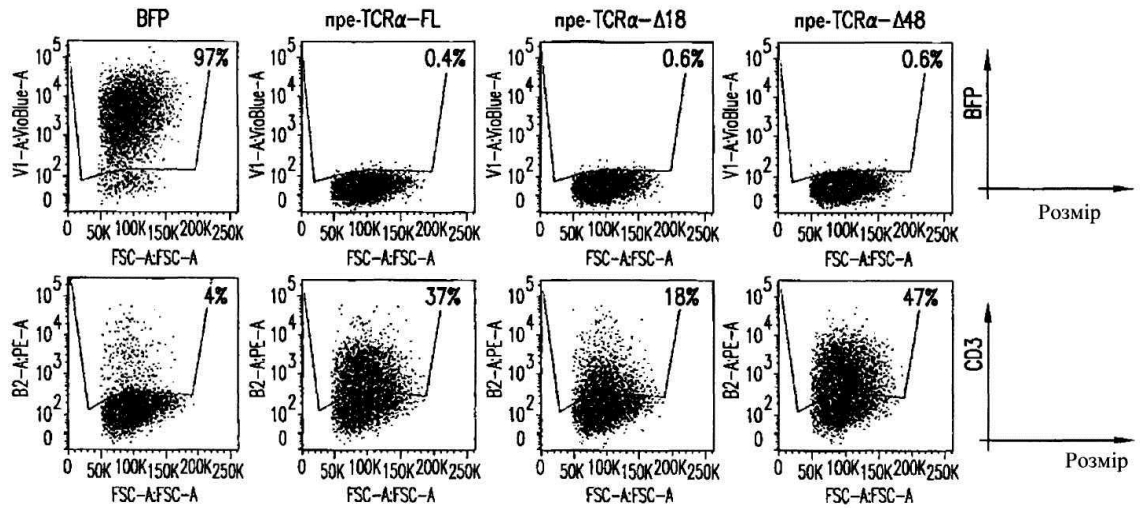
Фіг. 10



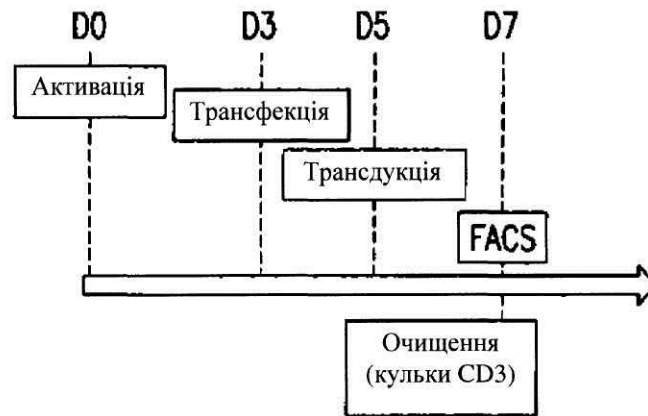
Фіг. 11



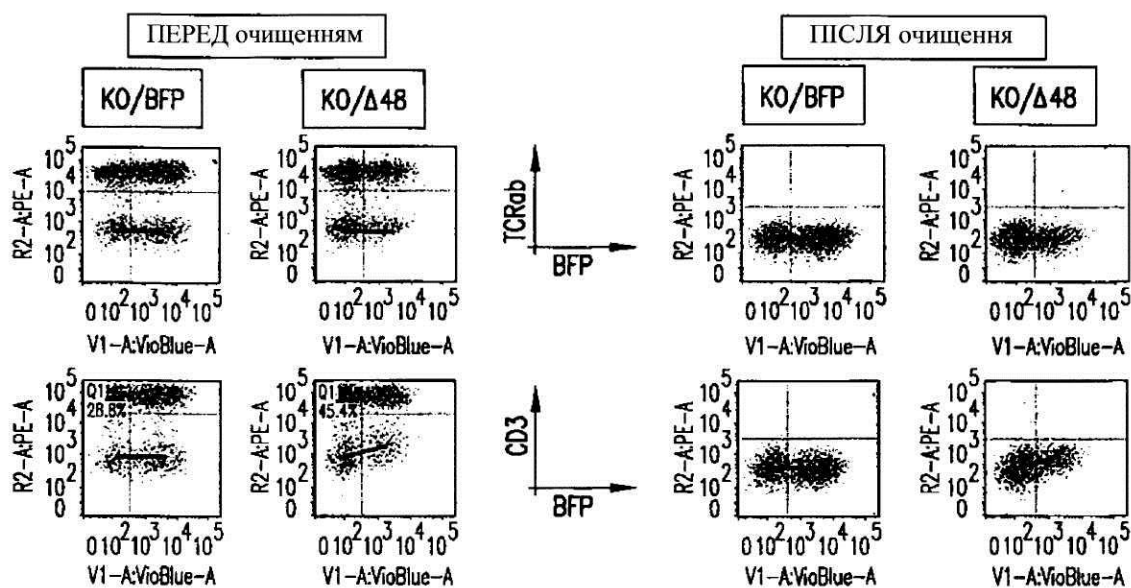
Фіг. 13



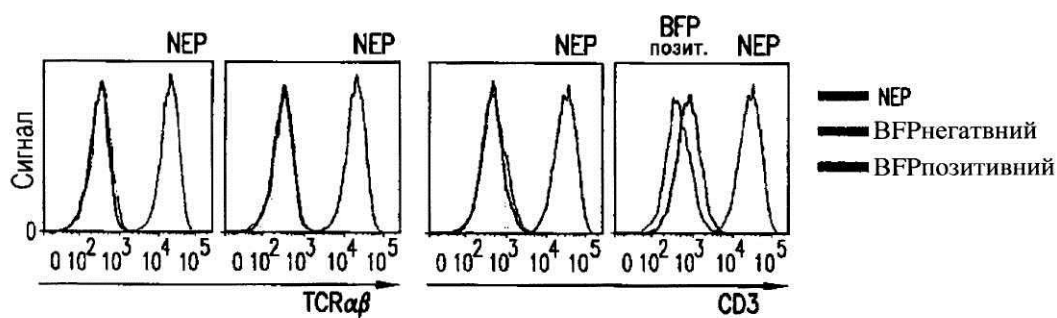
Фіг. 12



Фіг. 14А



Фиг. 14В



Фиг. 14С

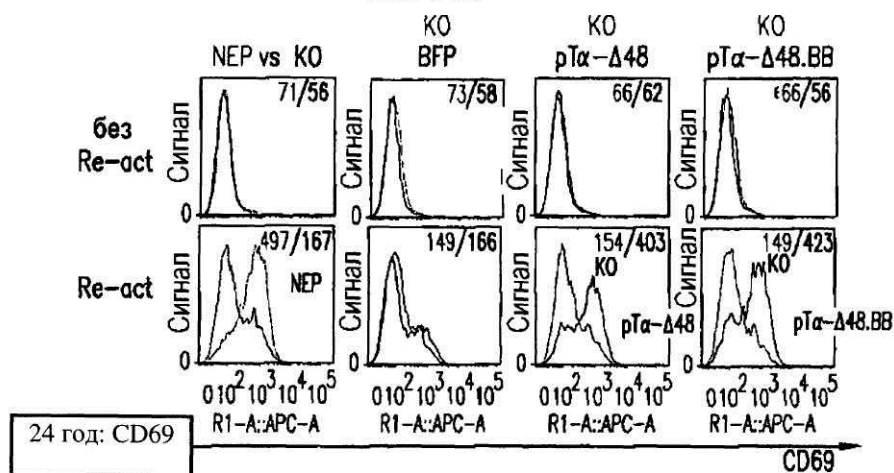
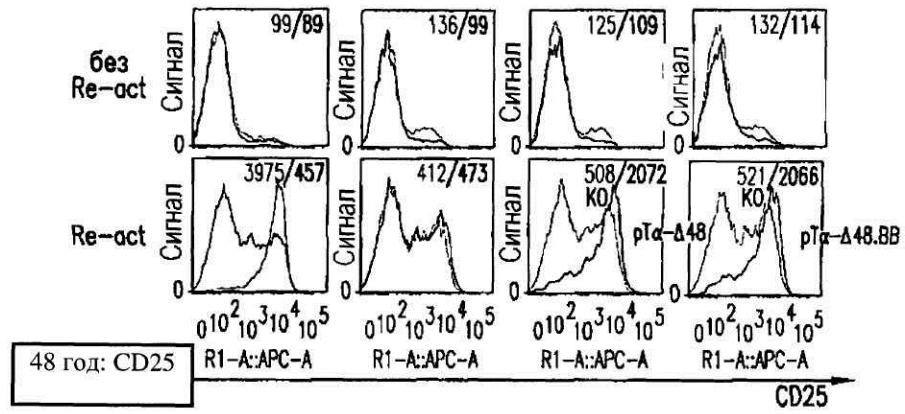
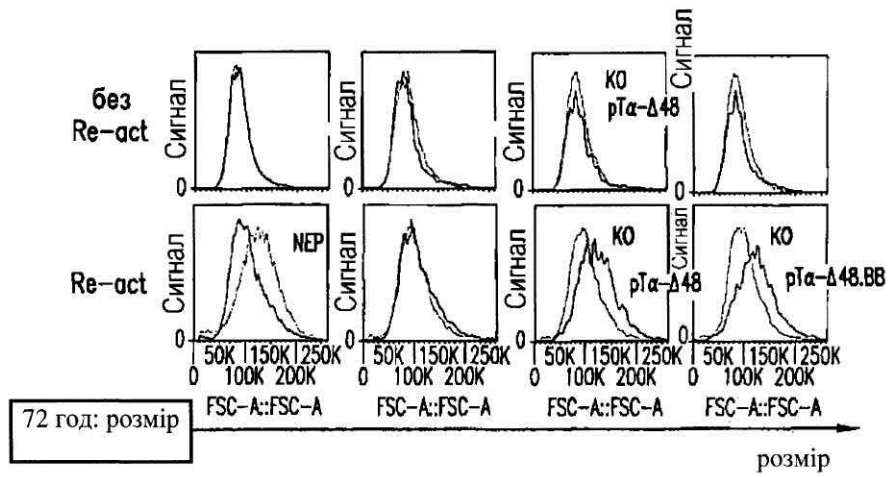


Fig. 15A

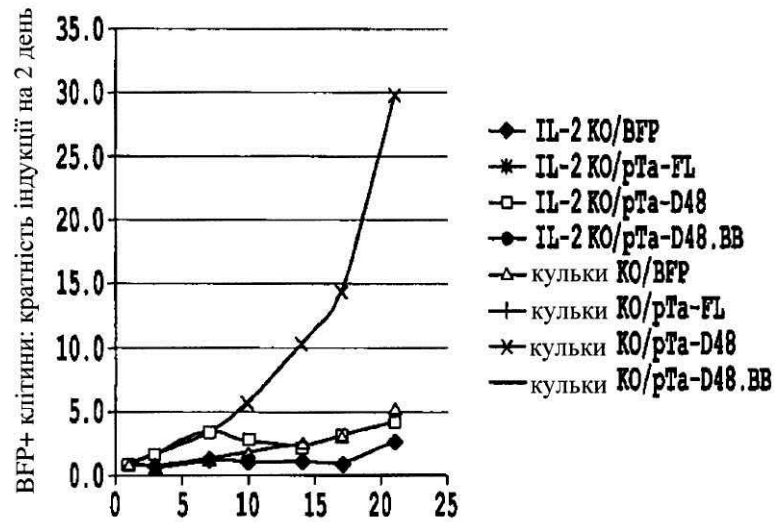




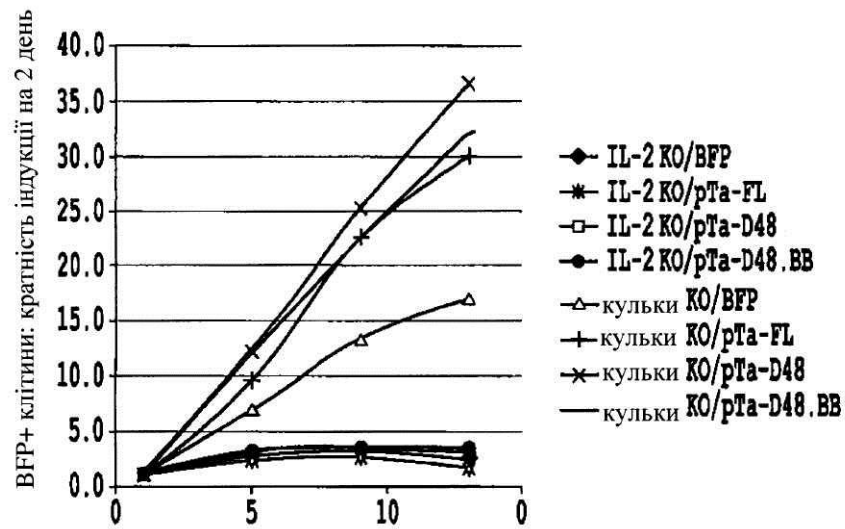
Фиг. 15B



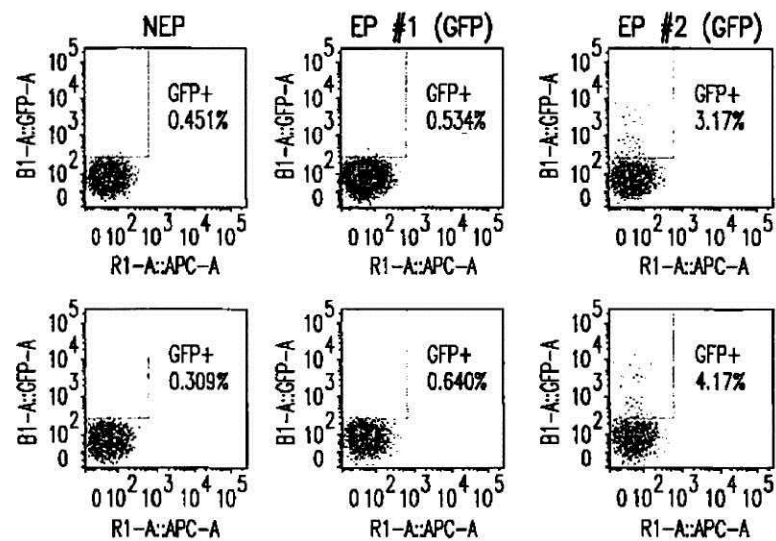
Фиг. 15C



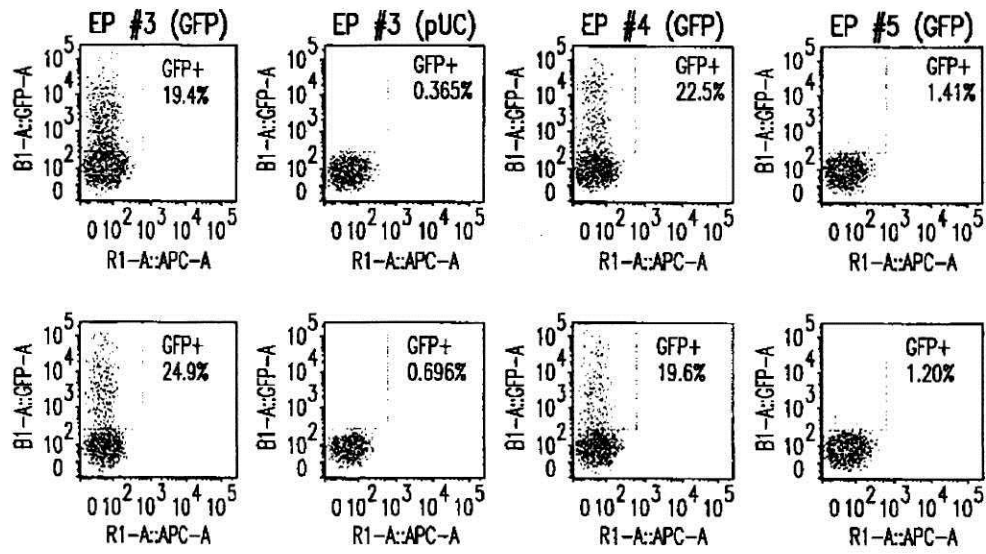
Фіг. 16А



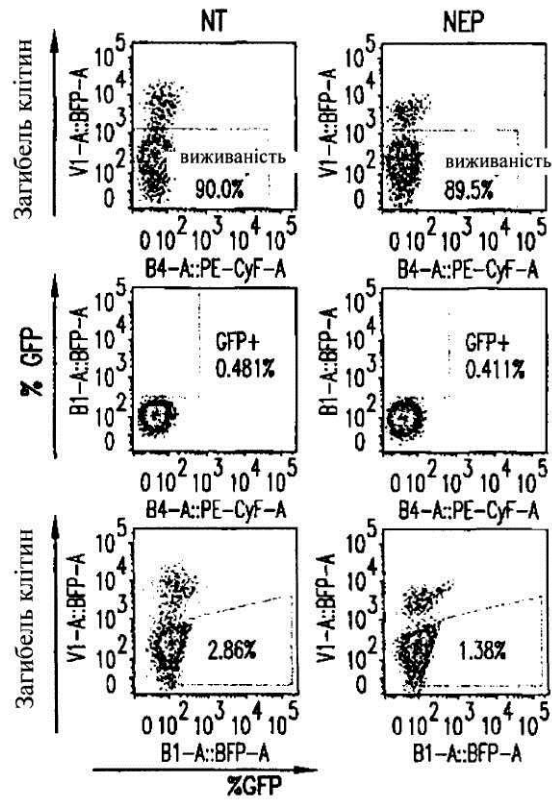
Фіг. 16В



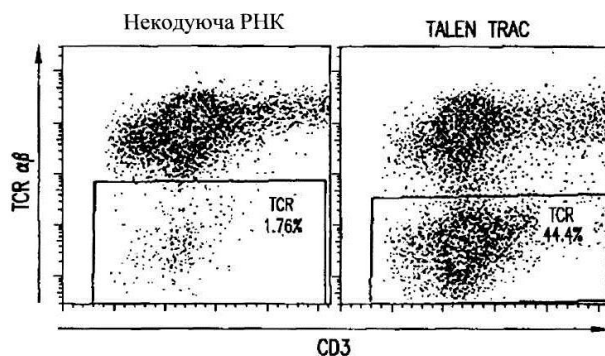
Фіг. 17



Фіг. 17-1



Фіг. 18



Послідовність дикої  
типу

Високопродуктивне  
секвенування

CATGTCTCAACCTGATCCTCTTGTCCACAGATATCCGAAACCTGACCTGCCGTGTACCAAGCTGAGAGACTCTAAATCCAGTGACAAGCTGTGTGCCATTACACGAGATTTTG

CATGTCTCAACCTGATCCTCTTGTCCACAGATAT-----CCGTGTACCAAGCTGAGAGACTCTAAATCCAGTGACAAGCTGTGTGCCATTACACGAGATTTTG

CATGTCTCAACCTGATCCTCTTGTCCACAGATATCCAGAA-----TATCGCTTACCAGCTGAGAGACTCTAAATCCAGTGACAAGCTGTGTGCCATTACACGAGATTTTG

CATGTCTCAACCT-----CAGCTCGTCCAGCTGACACTCTAAATCCAGTGACAAGCTGTGTGCCATTACACGAGATTTTG

CATGTCTCAACCTGATCCTCTTGTCCACAGATATCCAGAA-----TATCGTCCGTGTACCAAGCTGAGAGACTCTAAATCCAGTGACAAGCTGTGTGCCATTACACGAGATTTTG

CATGTCTCAACCTGATCCTCTTGTCCACAGATATCCGAAACCTG-----ACCAGCTGAGAGACTCTAAATCCAGTGACAAGCTGTGTGCCATTACACGAGATTTTG

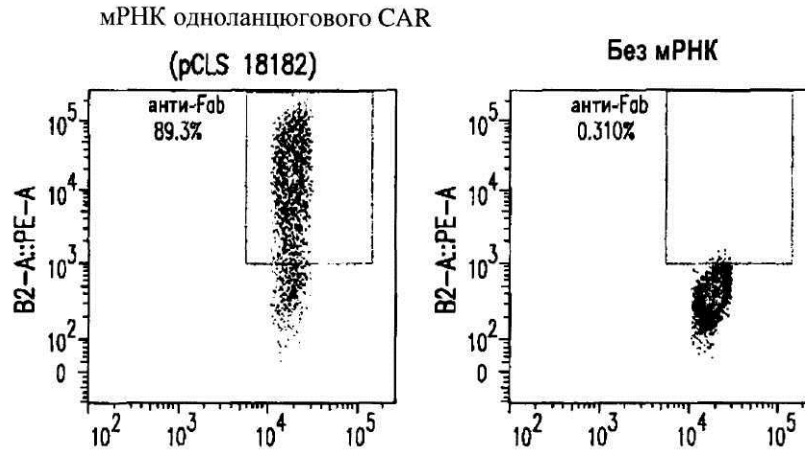
CATGTCTCAACCTGATCCTCTTGTCCACAGAT-----CGATTTTG

CATGTCTCAACCTGATCCTCTTGTCCAC-----GAGACTCTAAATCCAGTGACAAGCTGTGTGCCATTACACGAGATTTTG

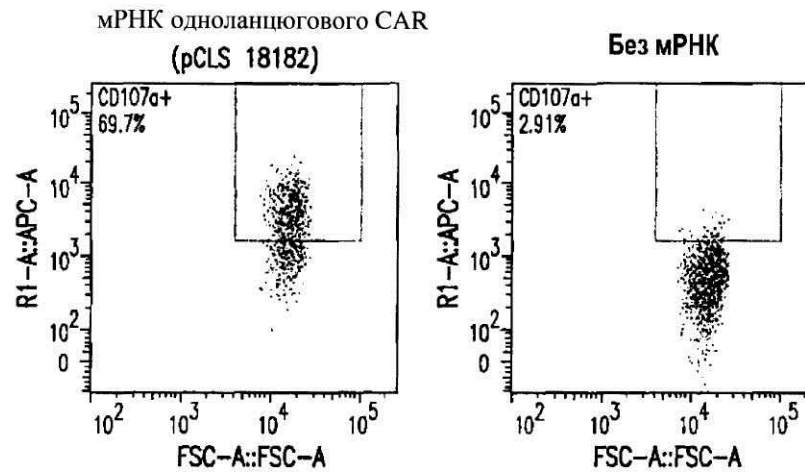
CATGTCTCAACCTGATCCTCTTGTCCACAGATATCCAGAA-----CCTGCCGTGTACCAAGCTGAGAGACTCTAAATCCAGTGACAAGCTGTGTGCCATTACACGAGATTTTG

CATGTCTCAACCTGATCCTCTTGTCCACAG-----ACCAGCTGAGAGACTCTAAATCCAGTGACAAGCTGTGTGCCATTACACGAGATTTTG

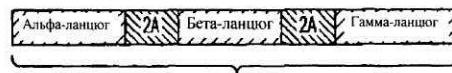
Fig. 19



Фіг. 20А

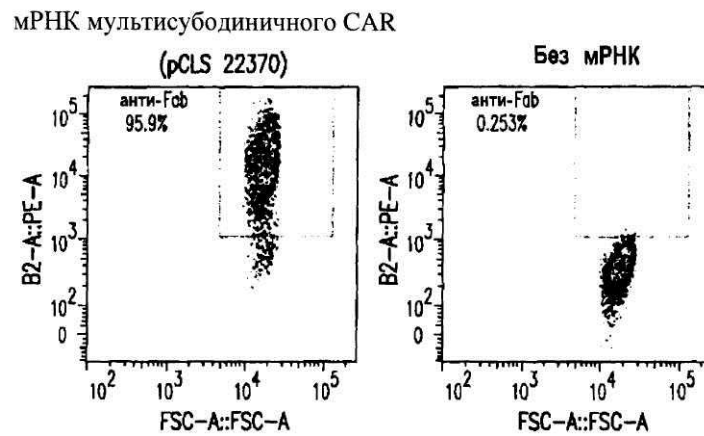


Фіг. 20В



Мультисубдиничний CAR анти-CD19

Фіг. 21А



Фіг. 21В

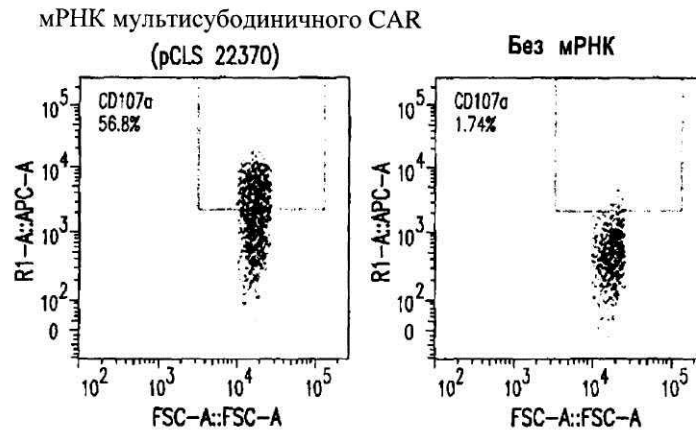


Fig. 21C

---

Комп'ютерна верстка В. Мацело

---

Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

---

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601