



(51) МПК  
*C12N 15/63* (2006.01)  
*C12N 15/83* (2006.01)  
*C12N 15/12* (2006.01)  
*C12N 5/16* (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК  
*C12N 15/63 (2019.05); C12N 15/85 (2019.05)*

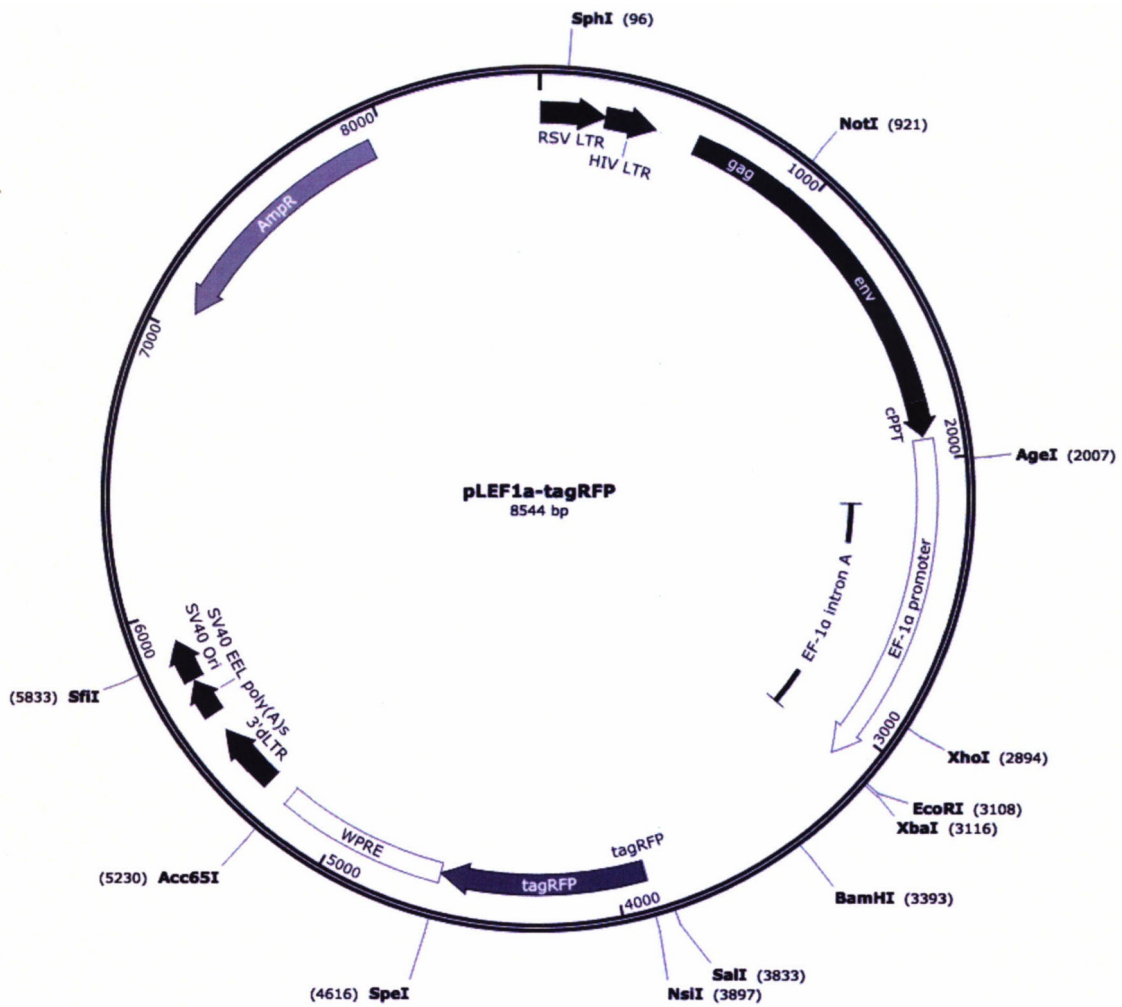
(21)(22) Заявка: 2017146645, 28.12.2017  
 (24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
 28.12.2017  
 Дата регистрации:  
 19.08.2019  
 Приоритет(ы):  
 (22) Дата подачи заявки: 28.12.2017  
 (43) Дата публикации заявки: 01.07.2019 Бюл. № 19  
 (45) Опубликовано: 19.08.2019 Бюл. № 23  
 Адрес для переписки:  
 117997, Москва, В-437, ГСП-7, ул. Миклухо-  
 Маклая, 16/10, ИБХ РАН, патентный отдел

(72) Автор(ы):  
 Чумаков Степан Петрович (RU),  
 Кравченко Юлия Евгеньевна (RU),  
 Фролова Елена Ивановна (RU)  
 (73) Патентообладатель(и):  
 Федеральное государственное бюджетное  
 учреждение науки Институт  
 биоорганической химии им. академиков  
 М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова  
 Российской академии наук (ИБХ РАН) (RU)  
 (56) Список документов, цитированных в отчете  
 о поиске: HARUTA M. ET AL. Generation of  
 a large number of functional dendritic cells from  
 human monocytes expanded by forced expression  
 of cMYC plus BMI1. Human Immunology, 74  
 (2013), pp. 1400-1408. LEZHININ Y.N. ET AL.  
 Construction of an Optimized Helper Plasmid  
 Containing VPX for Lentiviral-Mediated  
 Transduction of Dendritic Cells/ Biomedical &  
 (см. прод.)

(54) ГЕНЕТИЧЕСКАЯ КОНСТРУКЦИЯ ДЛЯ ИНДУКЦИИ ПРОЛИФЕРАЦИИ ПЕРИФЕРИЧЕСКИХ  
 МОНОЦИТОВ IN VITRO

(57) Реферат:  
 Изобретение относится к области биотехнологии. Предложена генетическая конструкция для индукции пролиферации периферических моноцитов и дендритных клеток in vitro, полученных из крови человека, включающая последовательности, кодирующие транскрипционные факторы с-Мус и BMI1, а также их связывающую саморасщепляющуюся пептидную последовательность из вируса Thossea asigna T2A, обеспечивающую полицистронную экспрессию транскрипционных факторов под контролем одного промотора EF1alpha. Указанная конструкция получена на основе экспрессионного плазмидного лентивирусного вектора pLEF1a-tagRFP, включающего ряд

регуляторных последовательностей: 5' и 3' LTR длинные концевые повторы, Rev зависимый элемент (RRE или Rev-response element), Env - регуляторную последовательность, обеспечивающую упаковку вирусного генома в структуру вирусной частицы с образованием вириона, сРРТ - центральный полипуриновый тракт, посттранскрипционный регуляторный элемент WPRE, промотор EF1alpha. Изобретение обеспечивает эффективную конститутивную экспрессию транскрипционных факторов с-Мус и BMI1 при введении указанной конструкции в периферические моноциты и дендритные клетки. 3 ил., 3 пр.



Фиг.1

(56) (продолжение):

Pharmacology Journal, 2017, Vol. 10(1), pp. 105-110. RU 2305708 C2, 10.09.2007. RU 2426788 C1, 20.08.2011. US 20080254008 A1, 16.10.2008.

R U 2 6 9 7 7 9 7 C 2

R U 2 6 9 7 7 9 7 C 2



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.  
*C12N 15/63* (2006.01)  
*C12N 15/83* (2006.01)  
*C12N 15/12* (2006.01)  
*C12N 5/16* (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC  
*C12N 15/63 (2019.05); C12N 15/85 (2019.05)*

(21)(22) Application: **2017146645, 28.12.2017**

(24) Effective date for property rights:  
**28.12.2017**

Registration date:  
**19.08.2019**

Priority:

(22) Date of filing: **28.12.2017**

(43) Application published: **01.07.2019 Bull. № 19**

(45) Date of publication: **19.08.2019 Bull. № 23**

Mail address:

**117997, Moskva, V-437, GSP-7, ul. Miklukho-Maklaya, 16/10, IBKH RAN, patentnyj otdel**

(72) Inventor(s):

**Chumakov Stepan Petrovich (RU),  
Kravchenko Yuliya Evgenevna (RU),  
Frolova Elena Ivanovna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federalnoe gosudarstvennoe byudzhetnoe  
uchrezhdenie nauki Institut bioorganicheskoy  
khimii im. akademikov M.M. Shemyakina i  
YU.A. Ovchinnikova Rossijskoj akademii nauk  
(IBKH RAN) (RU)**

(54) **GENETIC CONSTRUCT FOR INDUCING PROLIFERATION OF PERIPHERAL MONOCYTES IN VITRO**

(57) Abstract:

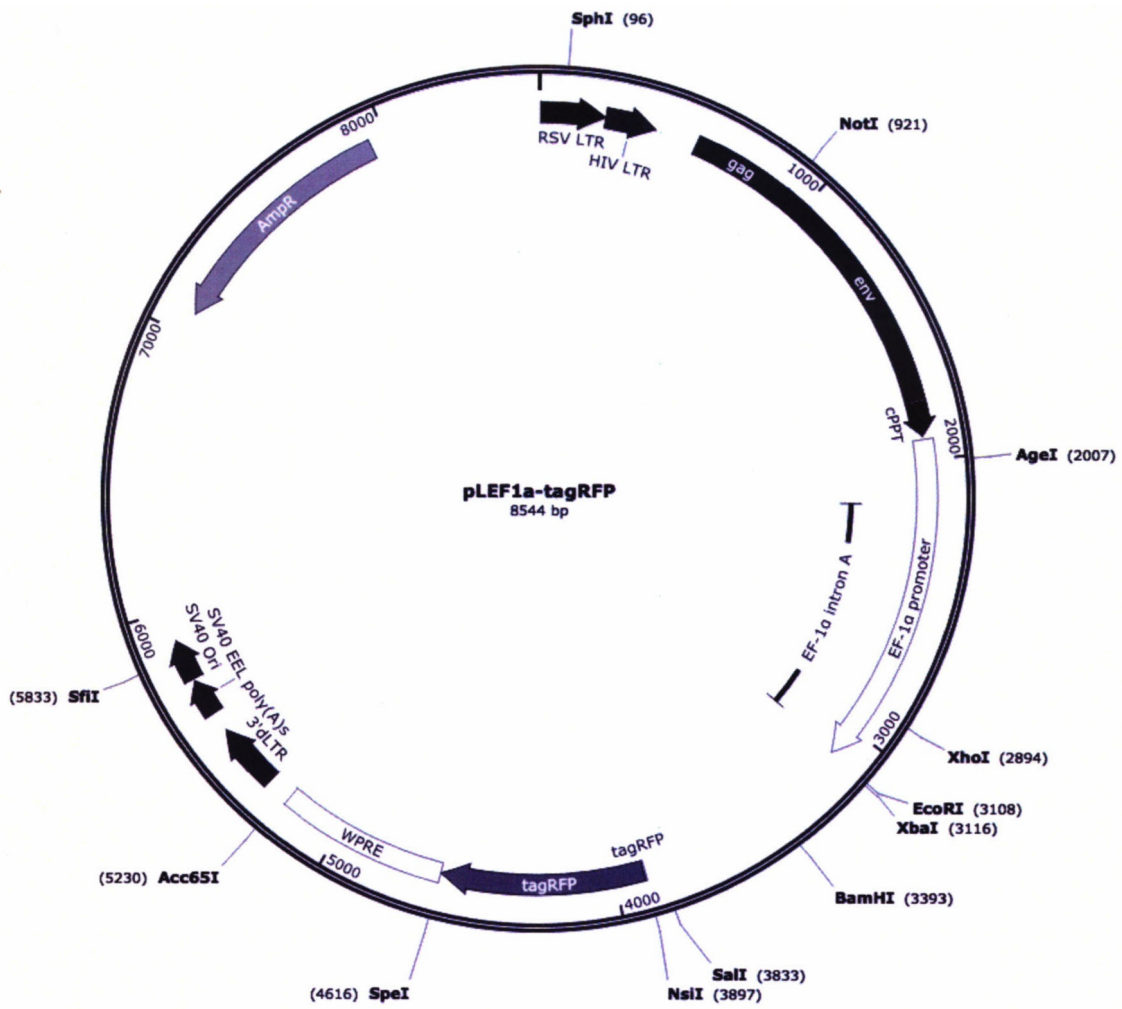
FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: disclosed is a genetic construct for inducing the proliferation of peripheral monocytes and dendrite cells in vitro derived from human blood, comprising sequences coding transcription factors c-Mus and BMI1, as well as their binding self-splitting peptide sequence of *Thosea asigna* T2A virus, providing polycistronic expression of transcription factors under the control of one EF1alpha promoter. Said construct is derived from expression plasmid lentiviral vector pLEF1a-tagRFP, including a number of regulatory sequences: 5' and 3' LTR long end repeats, Rev

dependent element (RRE or Rev-response element), Env is a regulatory sequence providing packaging of a viral genome into a viral particle structure with formation of a virion, cPRT - central polypurine path, a post-transcriptional regulatory element WPRE, an EF1alpha promoter.

EFFECT: invention provides effective constitutive expression of transcription factors s-Mus and BMI1 when introducing said construct into peripheral monocytes and dendritic cells.

1 cl, 3 dwg, 3 ex



Фиг.1

R U 2 6 9 7 7 9 7 C 2

R U 2 6 9 7 7 9 7 C 2

Изобретение относится к области биотехнологии и может быть использовано для увеличения эффективности приготовления дендритноклеточных и Т-клеточных вакцин для терапии злокачественных новообразований.

Успехи в изучении природы злокачественных опухолей, выявление молекулярных и генетических признаков опухоли определяют поиск принципиально новых методов лечения, в основе которых лежит избирательное поражение клеток, генетически отличных от нормальных клеток организма. Одним из таких методов является иммунотерапия, которая основывается на активации и усилении процессов специфического иммунного ответа организма на развитие опухоли.

Этот метод заключается в активации *ex vivo* опухолевыми антигенами элементов иммунной системы с получением опухолеспецифических антител или эффекторных клеток с последующим их введением в организм больного.

На сегодняшний день существует большое количество препаратов антител, некоторые из которых уже прошли успешно клинические испытания. Однако значимого роста выживаемости пациентов не выявлено.

Еще одним потенциально эффективным направлением иммунотерапии является использование дендритных клеток (ДК). Дендритные клетки играют ключевую роль в регуляции приобретенного иммунитета, обеспечивая эффективную защиту организма против множества инфекций и различных патологий. Основная функция дендритных клеток заключается в поглощении чужеродных антигенов, их процессирование и презентация антигенных детерминант эффекторным клеткам иммунной системы. В контексте онкологических заболеваний дендритные клетки являются крайне перспективными терапевтическими агентами, благодаря возможности презентации специфических опухолевых антигенов и активации противоопухолевого ответа в организме пациента.

В связи с этим получение функционально-активных ДК *in vitro* и активация их опухоль-ассоциированными антигенами для стимуляции цитотоксического ответа является одним из приоритетных направлений при разработке противоопухолевых вакцин на основе дендритных клеток, поскольку позволяет мобилизовать защитные системы организма больного, используя естественные пути распознавания опухолевых антигенов и их последующую элиминацию.

В виду низкого содержания дендритных клеток в крови человека, стандартная схема приготовления дендритно-клеточных вакцин предполагает дифференцировку моноцитов периферической крови пациента в дендритные клетки под воздействием набора цитокинов (Адаптирование методики культивирования дендритных клеток человека из моноцитов периферической крови для клинического применения, Чкадуа Г.З. и др., Российский биотерапевтический журнал, т. 1, №3, 2002, стр 56-62. В дальнейшем полученные подобным образом дендритные клетки нагружаются очищенным препаратом специфического опухолевого антигена или тотальным лизатом опухолевых клеток.

Наиболее оптимальным способом загрузки опухолевых антигенов является трансдукция дендритных клеток антиген-содержащими вирусными векторами, обеспечивающими высокоэффективную презентацию антигенов молекулами главного комплекса гистосовместимости первого класса (МНСI). Как правило, для трансдукции используют лентивирусные векторы на основе вируса иммунодефицита человека 1 типа HIV1, которые позволяют интегрировать целевую последовательность в геномную ДНК клетки, тем самым обеспечивая постоянный и стабильный уровень экспрессии антигена.

В частности, из уровня техники известны клетки, сконструированные для экспрессии, по меньшей мере, одного цитокина и, по меньшей мере, одного антигена, который индуцирует самодифференцирование клеток-предшественников дендритной клетки (DC) в функциональные антигенпрезентативные индуцированные DC (iDC). Как особо предпочтительный указан лентивирусный вектор, который имеет мутантную интегразу с последовательностью нуклеиновой кислоты (заявка WO 2014122035 (A2)).

Однако применение лентивирусных векторов для создания дендритно-клеточных вакцин ограничено низкой эффективностью трансдукции дендритных клеток.

Известна рекомбинантная плазмидная ДНК pCI-UB-POLYEP1, - прототип настоящего изобретения, содержащая эпитопы опухоль-ассоциированных антигенов для колоректального рака, и способ ее применения для стимуляции специфического противоопухолевого иммунного ответа против клеток колоректального рака. Также известно использование дендритных клеток, трансфицированных ДНК-конструкцией, кодирующей иммуногенные эпитопы опухоль-ассоциированных антигенов SEA, EpCAM и MUC4, что является эффективным способом стимуляции цитотоксического потенциала мононуклеарных клеток (патент РФ №2507265).

Задачей настоящего изобретения является создание генетической конструкции, позволяющей более эффективно приготовить на ее основе дендритноклеточные и Т-клеточные вакцины для терапии злокачественных новообразований.

Задача решается новой плазмидной конструкцией, содержащей регуляторные элементы лентивирусного вектора для трансдукции периферических моноцитов и дендритных клеток, а также экспрессионную кассету, обеспечивающую полицистронную экспрессию транскрипционных факторов с-Мус и ВМ11 под контролем клеточного промотора EF1 alpha.

Таким образом объектом изобретения является генетическая конструкция на основе экспрессионного плазмидного лентивирусного вектора, кодирующая последовательность транскрипционного фактора с-Мус, саморасщепляющийся пептид T2A и последовательность транскрипционного фактора ВМ11, а также ряд регуляторных элементов: 5' и 3' LTR (long terminal repeat), Rev (RRE или Rev-response element), Env - регуляторную последовательность, обеспечивающую упаковку вирусного генома в структуру вирусной частицы с образованием вириона, cPPT - центральный полипуриновый тракт, WPRE (woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element) и промотор EF1 alpha, предназначенная для индукции пролиферации моноцитов и дендритных клеток, полученных из периферической крови человека. Изобретение иллюстрируют следующие графические материалы:

Фиг. 1 - Лентивирусный вектор pLEF1a-tagRFP

Фиг. 2 - Схематичное изображение генетической конструкции, содержащей последовательности транскрипционных факторов с-Мус и ВМ11 для экспрессии под контролем клеточного промотора EF1a

Фиг. 3 - Динамика изменения численности дендритных клеток, трансдуцированных экспрессионным конструктором pLEF1a-cMyc-T2A-ВМ11 и контрольных образцов, в ходе культивации *ex vivo*.

Техническим результатом изобретения является обеспечение эффективной конститутивной экспрессии транскрипционных факторов с-Мус и ВМ11 конструкцией, при введении которой в периферические моноциты и дендритные клетки, эти клеточные популяции начинают проявлять пролиферативную активность, и могут быть экспансированы при культивации *ex vivo*. Изобретение иллюстрируют следующие примеры:

## Пример 1. Получение генетической конструкции

В качестве основы для создания генетической конструкции, содержащей последовательности транскрипционных факторов с-Мус и ВМ11, используют лентивирусный вектор pLEF1a-tagRFP структуры указанной на Фиг. 1.

5 В представленный вектор методом клонирования по сайтам рестрикции редкощеплящими эндонуклеазами встраивают следующие нуклеотидные последовательности:

- Последовательность, кодирующая транскрипционный фактор с-Мус

5'-

10 ATGGATTTTTTCGGGTAGTGGAAAACCAGCAGCCTCCCGCGACGATGCCCTCA  
 ACGTTAGCTTCACCAACAGGAACTATGACCTCGACTACGACTCGGTGCAGCCGTA  
 TTTCTACTGCGACGAGGAGGAGAACTTCTACCAGCAGCAGCAGCAGAGCGAGCT  
 15 GCAGCCCCCGGCGCCCAGCGAGGATATCTGGAAGAAATTCGAGCTGCTGCCAC  
 CCCGCCCTGTCCCCTAGCCGCCGCTCCGGGCTCTGCTCGCCCTCCTACGTTGCGG  
 TCACACCCTTCTCCCTTCGGGGAGACAACGACGGCGGTGGCGGGAGCTTCTCCAC  
 GGCCGACCAGCTGGAGATGGTGACCGAGCTGCTGGGAGGAGACATGGTGAACCA  
 20 GAGTTTCATCTGCGACCCGGACGACGAGACCTTCATCAAAAACATCATCATCCAG  
 GACTGTATGTGGAGCGGCTTCTCGGCCGCCCAAGCTCGTCTCAGAGAAGCTGG  
 CCTCCTACCAGGCTGCGCGCAAAGACAGCGGCAGCCCGAACCCCGCCCGCGGCC  
 ACAGCGTCTGCTCCACCTCCAGCTTGTACCTGCAGGATCTGAGCGCCGCCGCTC  
 25 AGAGTGCATCGACCCCTCGGTGGTCTTCCCCTACCCTCTCAACGACAGCAGCTCG  
 CCCAAGTCCTGCGCCTCGCAAGACTCCAGCGCCTTCTCTCCGTCCTCGGATTCTCT  
 GCTCTCCTCGACGGAGTCCTCCCCGCAGGGCAGCCCCGAGCCCCTGGTGCTCCAT  
 GAGGAGACACCGCCCACCACCAGCAGCGACTCTGAGGAGGAACAAGAAGATGA  
 30 GGAAGAAATCGATGTTGTTTCTGTGGAAAAGAGGCAGGCTCCTGGCAAAGGTC  
 AGAGTCTGGATCACCTTCTGCTGGAGGCCACAGCAAACCTCCTCACAGCCCCTG  
 GTCCTCAAGAGGTGCCACGTCTCCACACATCAGCACAACTACGCAGCGCCTCCCT  
 35 CCACTCGGAAGGACTATCCTGCTGCCAAGAGGGTCAAGTTGGACAGTGTGAGAG  
 TCCTGAGACAGATCAGCAACAACCGAAAATGCACCAGCCCCAGGTCCTCGGACA  
 CCGAGGAGAATGTCAAGAGGCGAACACACAACGTCTTGGAGCGCCAGAGGAGG  
 AACGAGCTAAAACGGAGCTTTTTTGCCCTGCGTGACCAGATCCCGGAGTTGGAA  
 40 AACAATGAAAAGGCCCCCAAGGTAGTTATCCTTAAAAAAGCCACAGCATACATC  
 CTGTCCGTCCAAGCAGAGGAGCAAAAGCTCATTTCTGAAGAGGACTTGTTGCGG  
 AAACGACGAGAACAGTTGAAACACAACCTTGAACAGCTACGGAACCTTTGTGCG

45 -3'

SEQ ID №1

- Последовательность саморасщепляющегося пептида T2A

5'-

GGAAGCGGAGAGGGCAGAGGAAGTCTTCTAACATGCGGTGACGTGGAGGAGAA  
TCCCGGCCCT-3'

5 SEQ ID №2

- Последовательность, кодирующая транскрипционный фактор BMI1

5'-

ATGCATCGAACAACGAGAATCAAGATCACTGAGCTAAATCCCCACCTGATGTGT  
10 GTGCTTTGTGGAGGGTACTTCATTGATGCCACAACCATAATAGAATGTCTACATT  
CCTTCTGTAAAACGTGTATTGTTCTGTTACCTGGAGACCAGCAAGTATTGTCCTATT  
TGTGATGTCCAAGTTCACAAGACCAGACCACTACTGAATATAAGGTCAGATAAA  
ACTCTCCAAGATATTGTATACAAATTAGTTCCAGGGCTTTTCAAAAATGAAATGA  
15 AGAGAAGAAGGGATTTTTATGCAGCTCATCCTTCTGCTGATGCTGCCAATGGCTC  
TAATGAAGATAGAGGAGAGGTTGCAGATGAAGATAAGAGAATTATAACTGATGA  
TGAGATAATAAGCTTATCCATTGAATTCTTTGACCAGAACAGATTGGATCGGAAA  
20 GTAAACAAAGACAAAGAGAAATCTAAGGAGGAGGTGAATGATAAAAGATACTT  
ACGATGCCCAGCAGCAATGACTGTGATGCACTTAAGAAAGTTTCTCAGAAGTAA  
AATGGACATACCTAATACTTTCCAGATTGATGTCATGTATGAGGAGGAACCTTTA  
AAGGATTATTATACACTAATGGATATTGCCTACATTTATACCTGGAGAAGGAATG  
25 GTCCACTTCCATTGAAATACAGAGTTCGACCTACTTGTAAGAAGATGAAGATCAG  
TCACCAGAGAGATGGACTGACAAATGCTGGAGAACTGGAAAGTGA CTCTGGGAG  
TGACAAGGCCAACAGCCCAGCAGGAGGTATTCCCTCCACCTCTTCTTGTGTTGCCT  
AGCCCAGTACTCCAGTGCAGTCTCCTCATCCACAGTTTCCTCACATTTCCAGTAC  
30 TATGAATGGAACCAGCAACAGCCCCAGCGGTAACCACCAATCTTCTTTTGCCAAT  
AGACCTCGAAAATCATCAGTAAATGGGTCATCAGCAACTTCTTCTGGT -3'

SEQ ID № 3

35 Указанные последовательности вводят с 3'-конца от промоторной области фактора элонгации 1 альфа (EF1alpha).

Вводимые последовательности нарабатывают методом ПЦР из кДНК, полученной путем обратной транскрипции мРНК, выделенной из периферических мононуклеарных клеток здорового донора. После амплификации последовательностей, кодирующих транскрипционные факторы, проводят бридж-ПЦР для получения слитого конструктора, состоящего из последовательности с-Мус, следующего за ней саморасщепляющегося пептида T2A и следующей за ним последовательности транскрипционного фактора BMI1. Разделение амплифицированных фрагментов проводят в ходе горизонтального электрофореза в агарозном геле. Для очистки ДНК-фрагментов используют набор Clean Up Mini (Евроген, Россия). Очищенный слитой фрагмент ДНК и лентивирусный вектор pLEF1a-tagRFP обрабатывают эндонуклеазами рестрикции XbaI и SpeI, в результате чего из лентивирусного вектора вырезают последовательность красного флуоресцентного белка tagRFP, после чего проводят еще один этап очистки рестрикционных смесей в агарозном геле. На завершающем этапе проводят лигирование



полученных генетических последовательностей и экспрессионного вектора.

Правильность ориентации вставки в итоговом векторе контролируют при помощи диагностической ПЦР с праймерами EF1a seq dir и ВМ1 Spe stop rev. Анализ нуклеотидной последовательности полученной генетической конструкции проводят методом секвенирования, доказавшим успешность проведенного клонирования. Результатом работы стало получение генетической конструкции, содержащей последовательности транскрипционных факторов с-Мус и ВМ1 для экспрессии под контролем клеточного промотора EF1a; структура генетической конструкции представлена на фиг. 2.

Пример 2. Структура генетической конструкции, содержащей последовательности транскрипционных факторов с-Мус и ВМ1 для экспрессии под контролем клеточного промотора EF1a

В состав заявленной генетической конструкции входят последовательности, кодирующие транскрипционные факторы с-Мус и ВМ1 а также саморасщепляющуюся пептидную последовательность, обеспечивающую полицистронную экспрессию транскрипционных факторов под контролем одного промотора; и ряд регуляторных последовательностей, обеспечивающих эффективную сборку лентивирусного вектора в псевдовирусные частицы и необходимых для успешной интеграции экспрессионной кассеты в геном клетки.

Регуляторные последовательности

- 5' и 3' LTR (long terminal repeat) - длинные концевые повторы, последовательности ДНК, обеспечивающие внедрение вирусного генома в геном клетки-хозяина при участии фермента интегразы.

- Rev (RRE или Rev-response element) - регуляторная последовательность, обеспечивающая транспортировку молекулы вирусной мРНК из ядра в цитоплазму, где происходит ее экспрессия.

- Env - регуляторная последовательность, обеспечивающая упаковку вирусного генома в структуру вирусной частицы с образованием вириона.

- сРРТ - центральный полипуриновый тракт - последовательность, которая способствует проникновению обратно-транскрибируемой вирусной ДНК в ядро клетки, обеспечивая тем самым заражение митотически неактивных клеток.

- WPRE (woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element) - энхансер - последовательность, обеспечивающая формирование особой пространственной структуры трангена и увеличивающая вероятность распознавания промоторного региона факторами транскрипции. Кроме того, увеличивает стабильность мРНК трангена.

- Промотор EF1 alpha. Эффективный промотор, обеспечивающий высокий уровень экспрессии во многих типах клеток.

Экспрессируемые последовательности

- с-Мус - последовательность транскрипционного фактора Мус, кодируемого человеческим геном МУС.

- T2A - 2A последовательность из вируса *Thosea asigna*, саморасщепляющийся пептид, необходимый для разделения аминокислотных последовательностей транскрипционных факторов сразу после трансляции.

- ВМ1 - последовательность транскрипционного фактора ВМ1 из белков группы Polycomb.

Пример 3. Сравнение динамики численности дендритных клеток в ходе культивации после введения экспрессионного конструкта pLEF1a-сМус-T2A-ВМН относительно нетрансдуцированных ДК

Для определения влияния введения экспрессионного конструкта pLEF1a-cMyc-T2A-  
BMP1 на активацию пролиферации дендритных клеток, полученных из периферических  
моноцитов путем дифференцировки путем культивации в присутствии ростовых факторов  
интерлейкина-4 и гранулоцит-макрофагального колониестимулирующего фактора,  
5 дендритные клетки, трансдуцированные pLEF1a-cMyc-T2A-BMP1, культивируют в  
течение 4 недель. В качестве контроля, в параллели проводят культивирование  
дендритных клеток, не подвергавшихся лентивирусной трансдукции, в таком же  
количестве и плотности. Раз в неделю проводят подсчет количества клеток при помощи  
люминесцентного субстрата Celltiter-Glo 2.0. Динамика численности дендритных клеток,  
10 трансдуцированных экспрессионным конструктом pLEF1a-cMyc-T2A-BMP1 и  
контрольных образцов, представлена на фиг. 3.

Полученные результаты свидетельствуют о высокой эффективности действия  
экспрессионного конструкта pLEF1a-cMyc-T2A-BMP1 на стимуляцию пролиферации  
периферических дендритных клеток, что указывает на высокую практическую ценность  
15 pLEF1a-cMyc-T2A-BMP1 для получения больших количеств функционально-активных  
дендритных клеток, что может быть востребовано для приготовления  
дендритноклеточных и Т-клеточных вакцин, использующихся для клеточной  
иммунотерапии.

#### 20 (57) Формула изобретения

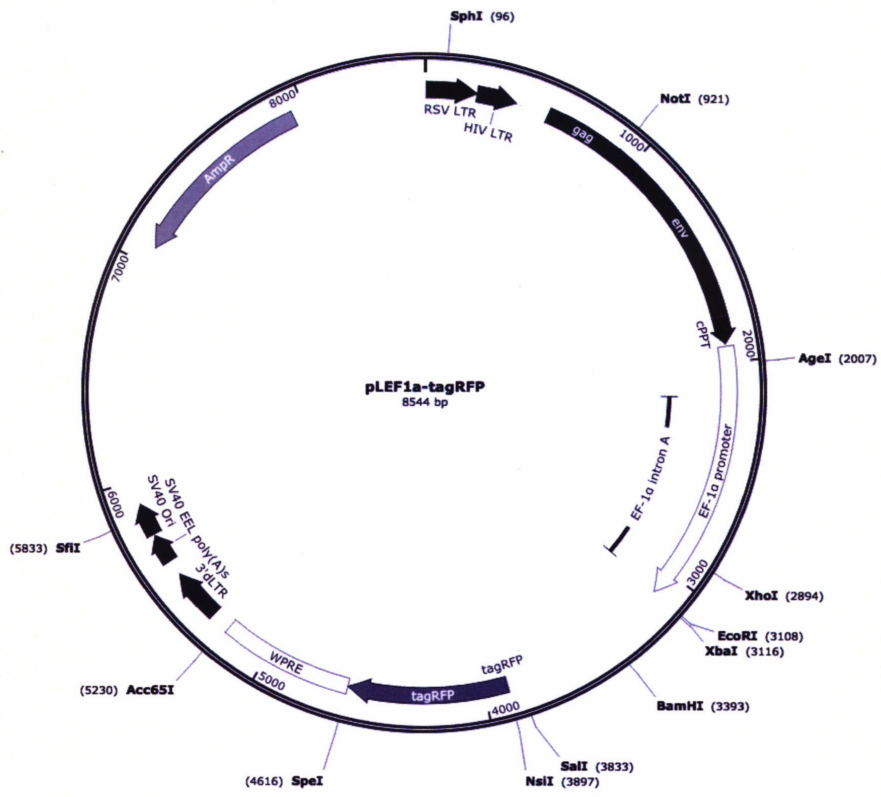
Генетическая конструкция для индукции пролиферации периферических моноцитов  
и дендритных клеток *in vitro*, полученных из крови человека, включающая  
последовательности, кодирующие транскрипционные факторы c-Myc и BMP1, а также  
их связывающую саморасщепляющуюся пептидную последовательность из вируса  
25 *Thosea asigna* T2A, обеспечивающую полицистронную экспрессию транскрипционных  
факторов под контролем одного промотора EF1alpha; полученная на основе  
экспрессионного плазмидного лентивирусного вектора pLEF1a-tagRFP структуры,  
указанной на Фиг. 1, включающего ряд регуляторных последовательностей: 5' и 3'  
LTR длинные концевые повторы, Rev зависимый элемент (RRE или Rev-response element),  
30 Env - регуляторную последовательность, обеспечивающую упаковку вирусного генома  
в структуру вирусной частицы с образованием вириона, cPPT - центральный  
полипуриновый тракт, посттранскрипционный регуляторный элемент WPRE, промотор  
EF1alpha.

35

40

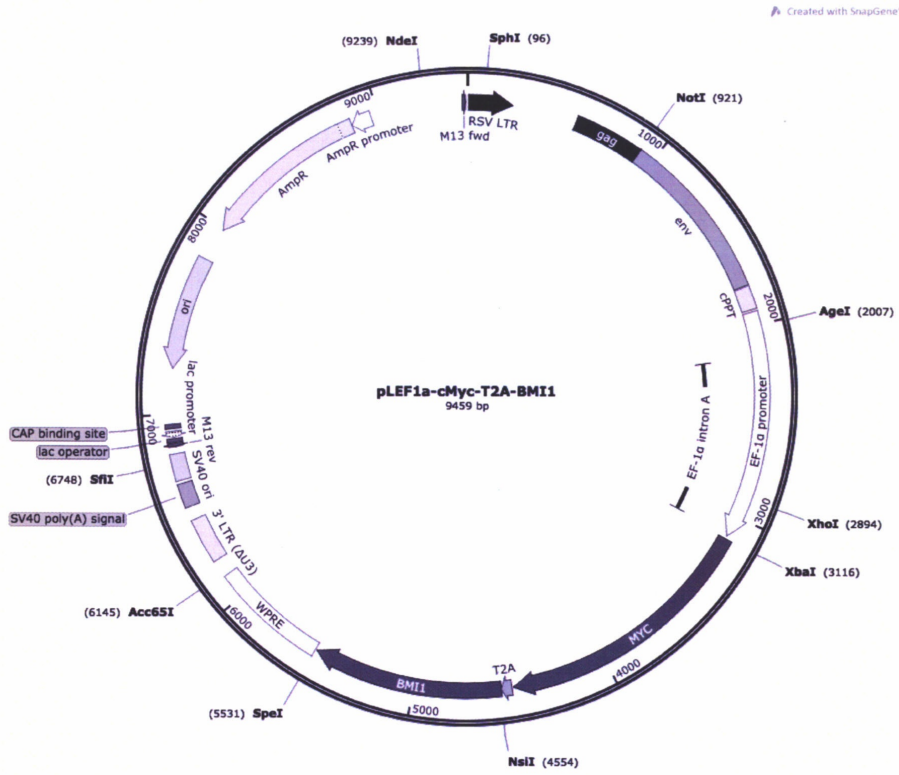
45

1

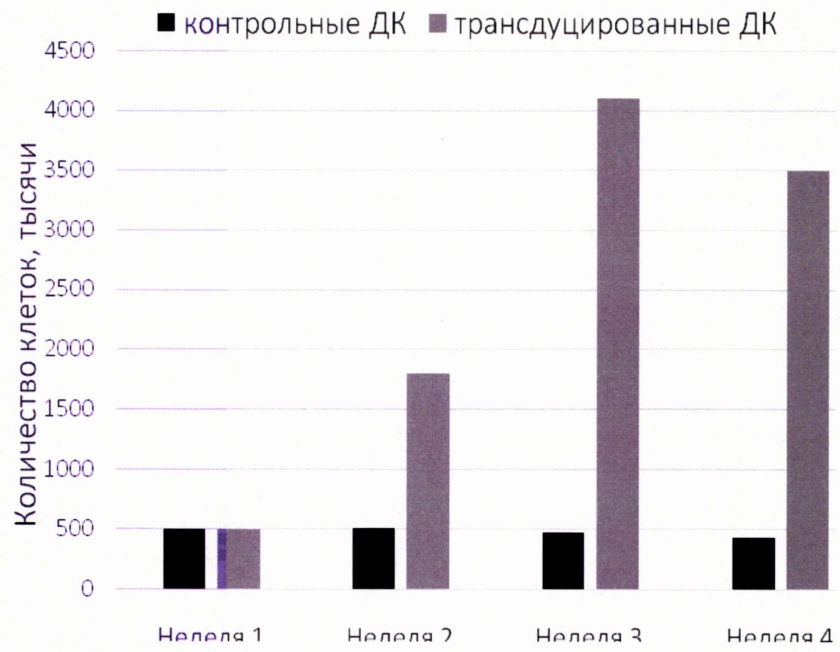


Фиг.1

2



Фиг.2



Фиг.3