

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202392196** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2024.03.22

(51) Int. Cl. *C07K 16/28* (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)
C07K 14/725 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2022.02.01

(54) **СИСТЕМА НАПРАВЛЕННОЙ ДЕГРАДАЦИИ БЕЛКОВ И ЕЕ ПРИМЕНЕНИЕ**

(31) 17/164,834; 63/150,577; 202110877843.X

(72) Изобретатель:

(32) 2021.02.01; 2021.02.17; 2021.07.30

Лю Линфэн, Чжун Вэньтин, Лю
Лилин (CN)

(33) US; US; CN

(86) PCT/CN2022/075302

(74) Представитель:

(87) WO 2022/161502 2022.08.04

Фелицына С.Б. (RU)

(71) Заявитель:

СТ ФИ ТЕРАПЬЮТИКС КО., ЛТД.
(CN)

(57) Химерная белковая конструкция, базирующаяся в эндоплазматическом ретикулуме, для направленной деградации белка и ее применение, где химерная белковая конструкция используется для лечения онкологических заболеваний, вирусных инфекционных заболеваний, аутоиммунных заболеваний, нейродегенеративных заболеваний и т.п. Химерная белковая конструкция включает белок-связывающий домен, основанный на механизме деградации, связанной с эндоплазматическим ретикулумом, и нацеливающий домен. Белок-связывающий домен химерной белковой конструкции, основанный на механизме ERAD, может представлять собой трансмембранный домен вирусного белка, резидентного в эндоплазматическом ретикулуме, или его функциональный вариант и домен, резидентный в эндоплазматическом ретикулуме, или его функциональный вариант. Нацеливающий домен химерной белковой конструкции может нацеливаться на любые представляющие интерес белки-мишени и может представлять собой природный лиганд белка-мишени, антитело, которое специфически распознает белок-мишень, или его антигенсвязывающий фрагмент. Нацеливающий домен химерной белковой конструкции также может представлять собой антиген, который может специфически распознаваться антителом.

A1

202392196

202392196

A1

СИСТЕМА НАПРАВЛЕННОЙ ДЕГРАДАЦИИ БЕЛКОВ И ЕЕ ПРИМЕНЕНИЕ

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

Настоящее раскрытие относится к системе направленной деградации белков и ее применению, и, в частности, к ее применению при лечении заболеваний (включая, без ограничения указанным, рак, вирусные инфекционные заболевания, аутоиммунные заболевания, нейродегенеративные заболевания).

ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Целенаправленное удаление белка желательно по меньшей мере по следующим причинам: 1) для определения функции белка в фундаментальных исследованиях; 2) для подтверждения терапевтической цели; 3) для блокады действия патогенного белка (например, опухолевых белков или белков, вызывающих нейродегенерацию); 4) для усиления деградации белков, накопленных при старении; и 5) для уменьшения побочных эффектов клеточной терапии (например, предотвращения экспрессии иммуногенных белков). Однако все существующие технологии целевого удаления белка имеют присущие им технические проблемы.

Технологии редактирования генов (например, технологии CRISPR) способны выводить из строя гены, кодирующие любой белок-мишень на генном уровне, но существуют побочные проблемы, в том числе низкая специфичность в идентификации и разрезании желаемых участков ДНК, хромосомная нестабильность и другие побочные эффекты.

Малая интерферирующая РНК (миРНК) может препятствовать синтезу белка-мишени на уровне РНК. Однако миРНК также имеет потенциальные ненаправленные эффекты. Например, смысловая цепь миРНК может опосредовать сайленсинг когнатного гена, вызывая нецелевые эффекты, опосредованные смысловой цепью. Кроме того, небольшие несоответствия в малых последовательностях нуклеиновых кислот могут также привести к сайленсингу других генов, что приводит к нецелевым эффектам и токсическим побочным эффектам.

Химерные технологии для направленной деградации белков (Protein degradation targeting chimera technologies, PROTAC), способны разрушать белки-мишени на уровне белков и обычно добавляются в клетки или вводятся животным или людям в качестве биохимического реагента, чтобы вызвать деградацию белков-мишеней в клетках. Ранние PROTAC основаны на молекулах полипептидных лигандов, связанных E3-лигазой, но

PROTAC, полученные с использованием молекул полипептидных лигандов, имеют низкую проницаемость для клеток и нестабильны, что приводит к низкой эффективности деградации. Хотя PROTAC, использующие небольшие молекулы в качестве лигандов E3-лигазы, показали замечательную эффективность, их мембранная проницаемость и биодоступность являются плохими.

Таким образом, существует острая необходимость в новой системе направленной деградации белка, чтобы преодолеть по меньшей мере одну проблему, существующую в различных предшествующих областях техники, связанную с направленным удалением белка-мишени.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В одном аспекте в настоящей заявке предлагается химерная белковая конструкция, которая разрушает белок-мишень посредством механизма деградации, ассоциированной с эндоплазматическим ретикуломом (ЭПР-ассоциированная деградация, ER-associated degradation, ERAD), включает домен, связывающий белок механизма ERAD, и нацеливающий домен. В некоторых воплощениях в настоящей заявке предлагается общий компонент деградации белка-мишени, который может взламывать механизм ERAD для предотвращения транспорта белков-мишеней в ЭПР и облегчения их транслокации в цитоплазму, для проведения лизосомного эндоцитоза и деградации белка-мишени посредством протеасомного механизма на основе убиквитина (UPS), протеасомного убиквитинирования и деградации белка-мишени и/или ALP-механизма аутофагальной лизосомы. Эта конструкция может быть нацелена на любой белок, включая эндогенные или экзогенные белки, для эффективного ингибирования экспрессии и быстрой деградации в терапевтических целях. Настоящая заявка нацелена на различные эндогенные белки-мишени или экзогенные белки-мишени путем перепроектирования вирусных элементов для достижения удержания и направленной деградации белков-мишеней в эндоплазматическом ретикуле.

В другом аспекте в настоящей заявке предлагается химерная белковая конструкция, синергически разрушающая белок-мишень посредством механизма ERAD и механизма убиквитинирования, включающая домен, связывающий белок механизма ERAD, нацеливающий домен, а также дополнительный домен, связывающий участника пути деградации белка. Эта конструкция может значительно повысить эффективность деградации белка-мишени и подходит для многих мишеней, которые не могут быть разрушены с помощью технологий PROTAC.

Вышеуказанные две химерные белковые конструкции в настоящей заявке также называются химерными белковыми конструкциями TPD (Targeted Protein Degradation,

направленной деградации белка). В настоящей заявке также предлагаются нуклеиновая кислота, нуклеотидный вектор, онколитический вирус, которые кодируют вышеупомянутую химерную белковую конструкцию, и клетки, экспрессирующие вышеупомянутую химерную белковую конструкцию, и их применение для лечения заболеваний.

Воплощение 1. Химерная белковая конструкция, содержащая домен связывающий белок механизма деградации, ассоциированной с эндоплазматическим ретикулумом (ЭПР-ассоциированной деградации, ERAD), и нацеливающий домен.

Воплощение 2. Химерная белковая конструкция по воплощению 1, где домен, связывающий белок механизма ERAD, содержит: трансмембранный домен вирусного белка, резидентного в эндоплазматическом ретикулуме, или его функциональный вариант и домен, резидентный в эндоплазматическом ретикулуме, или его функциональный вариант.

Воплощение 3. Химерная белковая конструкция по воплощению 1 или 2, где вирусный белок, резидентный в эндоплазматическом ретикулуме, представляет собой E3-19K аденовируса.

Воплощение 4. Химерная белковая конструкция по воплощению 1 или 2, где вирусный белок, резидентный в эндоплазматическом ретикулуме, не является E3-19K аденовируса.

Воплощение 5. Химерная белковая конструкция по воплощению 4, где вирусный белок, резидентный в эндоплазматическом ретикулуме, выбран по меньшей мере из одного из группы, состоящей из: гликопротеина US2, US11, US3, US10, US6 из HCMV, ICP47 HSV, CPXV12, UL49.5 BHV, BNFL2a EBV, UL16, UL141, UL142 из HCMV, Nef HIV, Vpr HIV, U21 HHV-7, KK3 HHV-8, KK5 HHV-8, MK3 MHV-68, p12 HTLV-1 и белка CPXV203 вируса коровьей оспы.

Воплощение 6. Химерная белковая конструкция по любому из предыдущих воплощений, дополнительно содержащая домен, связывающий участника пути деградации белков (например, убиквитинлигазы E3, протеасомы, лизосомы) и, необязательно, домен, связывающий участника пути деградации белков, связанный с доменом, связывающим белок механизма ERAD.

Воплощение 7. Химерная белковая конструкция по любому из предыдущих воплощений, где нацеливающий домен содержит антитело, специфически нацеленное на белок-мишень или его функциональный фрагмент (например, Fd, Fv, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv(scFv), одноцепочечные антитела (scFv), нанотела, диатела, триатела или тетратела).

Воплощение 8. Химерная белковая конструкция по воплощению 7, где белок-

мишень представляет собой патогенный белок, необязательно представляющий собой опухолеассоциированный белок, вирусассоциированный белок, белок, связанный с иммунной функцией (включая иммуносупрессивные и иммуностимулирующие белки), аутоантигенный белок или белок, связанный с нейродегенеративными заболеваниями.

Воплощение 9. Химерная белковая конструкция по воплощению 8, где аутоантигенный белок выбран из группы, состоящей из: аутоантигена, связанного с диабетом 1 типа, например, антигена островковых клеток (ICA), инсулина (IAA), декарбоксилазы глутаминовой кислоты 65 (GAD65), антигена инсулиномы-2 (IA-2); аутоантигена, связанного с ревматоидным артритом (РА), например, цитруллинированного белка/пептидного антитела, гетерорибонуклеопротеина (гетерогенного ядерного рибонуклеопротеина A2/B1), альдолазы, альфа-енолазы, кальретикулина, термоактивируемого белка (HSP60), ViP, PGK1, стресс-индуцированного фосфопротеина 1, FUSE-BP1/2; аутоантигена, связанного с системной красной волчанкой (SLE), например, дезоксирибонуклеопротеина, SmD1, SmD3, Clq, воспалительного антикоагулянта (LA), кардиолипина (CL), β 2-гликопротеина I (β 2 GPI), протромбина (PT) и фосфатидилсерина (PS); аутоантигена, связанного с системным склерозом (SSc)/склеродермией (SD), например, Scl-70, SSA, Ro52; антигена, связанного с аутоиммунными заболеваниями печени, например, митохондриального антигена, Spl00, PML, gp210, p62; аутоантигена, связанного с тяжелой миастенией, например, рецептора ацетилхолина; аутоантигена, связанного с аутоиммунным заболеванием центральной нервной системы (лимбического энцефалита, энцефаломиелита, мозжечковой атаксии), например, комплекса потенциалзависимых калиевых каналов (VGKC), рецептора потенциалзависимых кальциевых каналов, рецептора α -амино-3-гидрокси-5-метилизоксазол-4-пропионовой кислоты (AMPA), рецепторов γ -аминомасляной кислоты-B (GABAB), глициновых рецепторов; аутоантигена, связанного с рассеянным склерозом, например, основного белка миелина (MBP), гликопротеина миелиновых олигодендроцитов (MOG); аутоантигена, связанного с полимиозитом (ПМ) и дерматомиозитом (ДМ), например, Jo-1, Mi-2, PM-Scl, Ro-52; аутоантигена, связанного с глютеночувствительной энтеропатией, например, эндомизиального антитела (EMA), тканевой трансглутаминазы (tTG); аутоантигена, связанного с энцефалитом с анти-NMDAR антителом, например, рецептора N-метил-D-аспартата; аутоантигена, связанного с оптикомиелитом (NMO), например, аквапорина 4 (AQP4); и аутоантигена, связанного с репродукцией, например, антигена яичников, антигена сперматозоидов.

Воплощение 10. Химерная белковая конструкция по воплощению 9, где опухолеассоциированный белок кодируется онкогеном, выбранным из группы, состоящей

из: BCL-2, c-MYC, Ras, HER2, BCR/ABL, ABL1/BCR, TGFB1, TLX1, P53, WNT1, WNT2, WT1, α v- β 3, PKCa, ABL, BCL1, CD24, CDK4, EGFR/ERBB-1, HSTF1, INT1/WNT1, INT2, MDM2, MET, MYB, MYC, MYCN, MYCL1, RAFI, NRAS, REL, AKT2, APC, BCL2-ALPHA, BCL2-BETA, BCL3, BCR, BRCA1, BRCA2, CBL, CCND1, CDKN1A, CDKN1C, CDKN2A, CDKN2B, CRK, CRK-II, CSF1R/FMS, DBL, DDOST, PMS-2, PRAD-1, RAF, RHOM-1, RHOM-2, SIS, TAL2, TANI, TIAM1, TSC2, TRK, TSC1, STK11, PTCH, MEN1, MEN2, P57/KIP2, PTEN, HPC1, ATM, XPA/XPG, BCL6, DEK, AKAP13, CDH1, BLM, EWSR1/FLI1, FES, FGF3, FER, FGR, FLI1/ERGB2, FOS, FPS/FES, FRA1, FRA2, FYN, HCK, HEK, HER3/ERBB-2, ERBB-3, HER4/ERBB-4, HST2, INK4A, INK4B, JUN, JUNB, JUND, KIP2, KIT, KRAS2A, KRAS2B, LCK, LYN, MAS, MAX, MCC, MLH1, MOS, MSH2, MYBA, MYBB, NF1, NF2, P53, PDGFB, PIM1, PTC, RBI, RET, ROS1, SKI, SRC1, TALI, TGFB2, THRA1, THRB, TIAM1, TRK, VAV, VHL, WAF1, WNT2, WT1, YES1, ALK/NPM1, AMI1, AXL, FMS, GIP, GLI, GSP, HOX11, HST, IL3, INT2, KS3, K-SAM, LBC, DCC, DPC4/SMAD4, E-CAD, E2F1/RBAP, ELK1, ELK3, EPH, EPHA1, E2F1, EPHA3, ERG, ETS1, ETS2, LMO-1, LMO-2, L-MYC, LYL1, LYT-10, MDM-2, MLH1, MLL, MLM, N-MYC, OST, PAX-5, PMS-1, FGF4, FGF6, FANCA, FLI1/ERGB2, FOSL1, FOSL2, GLI, HRAS1, HRX/MLLT1, HRX/MLLT2, KRAS2, MADH4, MASI, MCF2, MLLT1/MLL, MLLT2/HRX, MTG8/RUNX1, MYCLK1, MYH11/CBFB, NFKB2, NOTCH1, NPM1/ALK, NRG/REL, NTRK1, PBX1/TCF3, PML/RARA, PRCA1, RUNX1, RUNX1/CBFA2T1, SET, SHP2, TCF3/PBX1, TNFa, кластерина, сурвивина, TOE β , c-fos, c-SRC, гена рецептора эстрогена (рецептор эстрогена ER- α), гена рецептора андрогена (рецептора андрогена, AR) и INT-1, необязательно, опухолеассоциированного белка выбранного из группы, состоящей из: представителей семейства Bcl-2 (таких как: Bcl-2, Bcl-xL и Bcl-w), VEGF/VEGFR, PDGFR β , EGFR, мутантов EGFR, IGF-1R, HDAC, HER2, MYC, KRAS, AFP, CEA, CA199, рецептора эстрогена (рецептора эстрогена ER- α), рецептора андрогена (рецептора андрогена, AR), тирозинкиназы (c-ABL, BCR-ABL, BTK, FAK, PTK6, Wee1, трансмембранных рецепторов TRK), серин/треониновых киназных рецепторов (IRAK4, LRRK2, B-Raf, RIPK2, CDK4/6, CDK7, CDK8, CDK8/19, CDK9, TBK1), протеинкиназы II (CK2), эпигенетически родственных белков (BRD2, BRD3, BRD4, BRDT, TRIM24, BRD9, PBRM1, SMARCA2, SMARCA4, EP300, EZH2, WDR5), аденомедулина (ADM), DPP3.

Воплощение 11. Химерная белковая конструкция по воплощению 8, где патогенный белок представляет собой вирус-ассоциированный белок, выбранный из группы, состоящей из: поверхностного антигена HBV, капсидного гликопротеина HBV, HBeAg, ДНК-полимеразы HBV, белка X, кодируемого HBV (HBx), белка Gag HIV, белка Env HIV, gp120 HIV, обратной транскриптазы HIV-1, gp120 HIV, протеазы NS3-4A HCV, РНК-

полимеразы HCV, белка оболочки HCV, ДНК-полимеразы EBV, EBNA1 EBV, РНК-синтетазы коронавируса, шиповидного белка коронавируса, белка оболочки коронавируса, мембранного белка коронавируса, нуклеокапсидного белка коронавируса, РНК-зависимой РНК-полимеразы (RdRp), такой как новая РНК-зависимая РНК-полимераза коронавируса, ДНК и РНК-полимераз герпесвирусов, капсидного гликопротеина герпесвируса, ДНК-полимеразы CMV, капсидного гликопротеина CMV, белка оболочки RSV, белка капсида RSV, РНК-полимеразы RSV, РНК-полимеразы вируса гриппа, белка оболочки вируса гриппа, ДНК-полимеразы HPV или белка капсида HPV.

Воплощение 12. Химерная белковая конструкция по воплощению 7, где белок-мишень представляет собой белок, связанный с иммунной функцией, выбранный из группы, состоящей из: антигенпрезентирующей молекулы (например, молекулы МНС класса I, молекулы МНС класса II, молекулы MICA/B и т.п.), молекулы распознавания антигена (например, TCR, CD123, NKG2D и т.п.), молекулы иммунной контрольной точки (например, PD-1, PD-L1, CTLA4, TIM3, TIGIT, LAG3, A2AR, BTLA, IDO1, IDO2, TDO, KIR, NOX2, VISTA, SIGLEC7, PVR и т.п.), иммуностимулирующей/костимулирующей молекулы (например, CD3, CD80/86, CD28 и т.п.).

Воплощение 13. Химерная белковая конструкция по воплощению 7, где белок-мишень представляет собой белок-мишень, связанный с заболеванием нервной системы, и выбран из группы, состоящей из: Тау, β -амилоидного белка (β -амилоида (A β)), α -синуклеина, мутантного хантингтина (mHTT), α -синуклеина, РНК-связывающего белка TAR (TARDBP) и РНК-связывающего белка FUS (FUS).

Воплощение 14. Химерная белковая конструкция по воплощению 2, 4 или 5, где нацеливающий домен специфически не связывает TCR.

Воплощение 15. Химерная белковая конструкция по воплощению 14, где нацеливающий домен специфически связывает МНС I, МНС II, MICA, MICB, ULBP1, ULBP2, ULBP3, ULBP4, ULBP5 и/или ULBP6; и где МНС I предпочтительно представляет собой HLA I; и где МНС II предпочтительно представляет собой HLA II.

Воплощение 16. Химерная белковая конструкция по воплощению 4, где нацеливающий домен специфически связывает TCR.

Воплощение 17. Химерная белковая конструкция по воплощению 16, где вирусный белок, резидентный в эндоплазматическом ретикулуме, выбран по меньшей мере из одного из группы, состоящей из: гликопротеина US2, US11, US3, US10, US6 из HCMV, ICP47 HSV, CPXV12, UL49.5 BHV, BNFL2a EBV, UL16, UL141, UL142 из HCMV, Nef HIV, Vpru HIV, U21 HHV-7, KK3 HHV-8, KK5 HHV-8, MK3 MHV-68, p12 HTLV-1 и белка CPXV203 вируса коровьей оспы.

Воплощение 18. Химерная белковая конструкция по любому из предыдущих воплощений, которая связана по меньшей мере с одним фрагментом коэкспрессии.

Воплощение 19. Химерная белковая конструкция по воплощению 18, где по меньшей мере один фрагмент коэкспрессии независимо выбран из группы, состоящей из: интактного вирусного гликопротеина, резидентного в ЭПР (например, US2, US3, US11, US10 из HCMV, E3-K19 аденовируса, US6 HCMV, ICP47 HSV), химерного антигенного рецептора (CAR), функционального Т-клеточного рецептора (TCR), хемокинового рецептора или рецептора, активирующего НК-клетки.

Воплощение 20. Химерная белковая конструкция по воплощению 19, где хемокиновый рецептор выбран из группы, состоящей из: CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR9, CCR2b, CXCR1, CXCR2 или CXCR4.

Воплощение 21. Химерная белковая конструкция по воплощению 20, где рецептор, активирующий НК-клетки, содержит: (а) внеклеточный домен (extracellular domain, ED) рецептора, активирующего НК-клетки, или его функциональный вариант, (b) трансмембранный домен (transmembrane domain, TMD) рецептора, активирующего НК-клетки, или его функциональный вариант, и (с) внутриклеточный домен (intracellular domain, ICD) рецептора, активирующего НК-клетки, или его функциональный вариант; и где, необязательно, шарнир или линкер включен между внеклеточным доменом рецептора, активирующего НК-клетки, или его функциональным вариантом, трансмембранным доменом рецептора, активирующего НК-клетки, или его функциональным вариантом, и/или внутриклеточным доменом рецептора, активирующего НК-клетки, или его функциональным вариантом.

Воплощение 22. Химерная белковая конструкция по воплощению 21, где рецептор, активирующий НК-клетки, выбран из NKG2D, NKG2C, NKG2E, NKG2F, NKG2H, CD94, KIR2DL4, KIR2DS1, KIR2DS2, KIR2DS4, KIR3DS1, натурального цитотоксического рецептора, TRAIL, DNAM-1, CD16a, 2B4, NTB-A, CRACC или NKp80.

Воплощение 23. Химерная белковая конструкция по воплощению 21 или 22, где рецептор, активирующий НК-клетки, находится в комплексе с модулем передачи сигнала CNK.

Воплощение 24. Химерная белковая конструкция по любому из воплощений 18-23, где по меньшей мере один фрагмент коэкспрессии связан с химерной белковой конструкцией расщепляемым линкером.

Воплощение 25. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая химерную белковую конструкцию по любому из воплощений 1-24.

Воплощение 26. Молекула нуклеиновой кислоты по воплощению 25, где молекула

нуклеиновой кислоты представляет собой дезоксирибонуклеиновую кислоту (ДНК), рибонуклеиновую кислоту (РНК) (например, мРНК, кольцевую РНК, ссRNA), треозонуклеиновую кислоту (ТНК), гликолевую нуклеиновую кислоту (ГНК), пептидную нуклеиновую кислоту (ПНК), закрытую нуклеиновую кислоту (ЗНК, в том числе ЗНК с конфигурацией β -D-рибозы, α -ЗНК с конфигурацией α -L-рибозы (диастереоизомеры ЗНК), с 2'-аминофункционализированной 2'-амино-ЗНК и 2'-амино- α -ЗНК с 2'-аминофункционализацией), этиленнуклеиновую кислоту (ЭНК), циклогексенилнуклеиновую кислоту (CeNA) и/или химеры и/или их комбинации.

Воплощение 27. Вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по воплощению 25 или 26, где молекула нуклеиновой кислоты функционально связана по меньшей мере с одним полинуклеотидным регуляторным элементом для экспрессии химерной белковой конструкции, кодируемой молекулой нуклеиновой кислоты.

Воплощение 28. Вектор по воплощению 27, где вектор выбран из группы, состоящей из: плазмиды, наноплазмиды, космиды, вирусного вектора (например, онколитических вирусных векторов), миникольца, РНК-вектора или линейной или кольцевой ДНК (например, транспозонной ДНК) или молекул РНК.

Воплощение 29. Вектор по воплощению 28, где вектор представляет собой вирусный вектор, выбранный из группы, состоящей из ретровируса, лентивирусного вектора, аденовируса, парвовируса (например, аденоассоциированного вируса), вектора на основе аденоассоциированного вируса (AAV), коронавируса, РНК-вируса с отрицательной цепью, такого как ортомиксовирус (например, вирус гриппа), рабдовируса (например, вирусов бешенства и везикулярного стоматита), парамиксовируса (например, Мачи и Сендай), РНК-вируса с положительной цепью, такого как пикорнавирус и альфавирус, и вируса с двухцепочечной ДНК, при этом вирус с двухцепочечной ДНК включает аденовирус, вирус герпеса (например, вирус простого герпеса типов I и II, вирус Эпштейна-Барр, цитомегаловирус) и вируса оспы (например, осповакцины, оспы кур и оспы канареек), вируса Норвалка, тогавируса, флавивируса, реовируса, паповавируса, гепаднавируса, бакуловируса и вируса гепатита, вирусоподобной частицы (VLP).

Воплощение 30. Вектор по воплощению 29, отличающийся тем, что вирусный вектор представляет собой ретровирусный вектор.

Воплощение 31. Вектор по воплощению 30, где ретровирусный вектор выбран из: вируса лейкопролиферативной саркомы птиц, вируса С-типа млекопитающих, вируса В-типа, вируса D-типа, коллекции HTLV-BLV, лентивируса, спумавируса.

Воплощение 32. Вектор по воплощению 29, где вирусный вектор представляет собой лентивирусный вектор.

Воплощение 33. Вектор по воплощению 32, где лентивирусный вектор выбран из HIV-1, HIV-2, SIV, FIV, BIV, EIAV, CAEV или лентивируса демиелинизирующего лейкоэнцефалита овец.

Воплощение 34. Вектор по любому из воплощений 27-33, где вектор дополнительно комбинируют с другими векторами, содержащими другие молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие по меньшей мере один фрагмент коэкспрессии.

Воплощение 35. Сконструированная клетка, экспрессирующая химерную белковую конструкцию по любому из воплощений 1-25, или содержащая молекулу нуклеиновой кислоты по воплощению 26, или содержащая вектор по любому из воплощений 27-33.

Воплощение 36. Сконструированная клетка по воплощению 35, экспрессирующая химерную белковую конструкцию любого из воплощений 1-18 и фрагмент коэкспрессии.

Воплощение 37. Сконструированная клетка по воплощению 35 или 36, где клетка представляет собой иммунную клетку, выбранную из: Т-клетки, естественной клетки-киллера (NK), В-клетки, макрофага, моноцита, дендритной клетки, нейтрофила или $\gamma\delta$ Т-клетки.

Воплощение 38. Сконструированная клетка по воплощению 37, где Т-клетка выбрана из группы, состоящей из: CD8+ Т-клетки, CD4+ Т-клетки, цитотоксической Т-клетки, терминальной эффекторной Т-клетки, Т-клетки памяти, наивной Т-клетки, группы клеток, состоящей из регуляторной Т-клетки, Т-клетки натурального киллера, гамма-дельта Т-клетки, Т-клетки-киллера, индуцированной цитокинами (CIK), и лимфоцита, инфильтрирующего опухоль.

Воплощение 39. Способ получения сконструированной клетки по любому из воплощений 35-38, включающий введение вектора по любому из воплощений 27-34 в исходную клетку в условиях, подходящих для экспрессии молекулы нуклеиновой кислоты по воплощению 25 или 26.

Воплощение 40. Способ по воплощению 39, где исходная клетка представляет собой стволовую клетку или клетку, дифференцированную из стволовой клетки.

Воплощение 41. Способ по воплощению 38, где стволовая клетка представляет собой гемопоэтическую клетку-предшественник (например, предшественник Т-клетки, предшественник NK-клетки, предшественник макрофага), гемопоэтическую стволовую клетку (HSC), CD34+ клетку, эмбриональную клеточную линию, мезенхимальную стволовую клетку или клетку iPSC.

Воплощение 42. Способ по воплощению 37, где клетка представляет собой иммунную клетку.

Воплощение 43. Способ по воплощению 40, где иммунная клетка представляет

собой Т-клетку, клетку натурального киллера (NK), В-клетку, макрофаг, моноцит или дендритную клетку.

Воплощение 44. Способ по воплощению 41, где клетка представляет собой Т-клетку, выбранную из группы, состоящей из: CD4+ Т-клетки, CD8+ Т-клетки, цитотоксической Т-клетки, терминальной эффекторной Т-клетки, Т-клетки памяти, наивной Т-клетки, группы клеток, состоящей из регуляторной Т-клетки, Т-клетки натурального киллера, гамма-дельта Т-клетки, Т-клетки-киллера, индуцированной цитокинами (СИК), и лимфоцита, инфильтрирующего опухоль.

Воплощение 45. Популяция клеток, полученная *ex vivo* способом по любому из воплощений 39-44.

Воплощение 46. Фармацевтическая композиция или набор, содержащие: (i) химерную белковую конструкцию по любому из воплощений 1-24, или молекулу нуклеиновой кислоты по воплощению 25 или 26, или вектор по любому из воплощений 27-34, или сконструированную клетку любого из воплощений 35-38 или популяцию клеток по воплощению 45, и (ii) фармацевтически приемлемую среду.

Воплощение 47. Способ деградации белка-мишени, включающий доставку вектора по любому из воплощений 27-34 в клетку, экспрессирующую белок-мишень.

Воплощение 48. Способ по воплощению 47, отличающийся тем, что клетка выбрана из: опухолевой клетки, инфицированной вирусом клетки, нервной клетки, трансплантированной клетки или иммунной клетки.

Воплощение 49. Способ по воплощению 47 или 48, где доставка включает доставку с помощью вирусного вектора (например, онколитического вируса).

Воплощение 50. Способ по воплощению 49, где вектор экспрессирует химерную белковую конструкцию любого из воплощений 1-24 в клетке.

Воплощение 51. Способ по воплощению 50, где химерная белковая конструкция способна одновременно связывать белок-мишень и белок механизма ERAD, тем самым разрушая белок-мишень.

Воплощение 52. Способ лечения состояния или заболевания у нуждающегося в этом субъекта, включающий:

введение субъекту терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции по воплощению 46.

Воплощение 53. Способ по воплощению 52, где заболевание включает различные солидные опухоли и гематологические опухоли, вирусные инфекционные заболевания, аутоиммунные заболевания, а также неврологические и дегенеративные заболевания (например, болезнь Альцгеймера), метаболические заболевания (например, диабет

(например, диабет II типа) заболевания, связанные с липидным обменом (например, опухолевый липидный обмен, неалкогольная жировая дистрофия печени), атеросклероз (АС), опухолевый метаболизм глюкозы;

предпочтительно солидную опухоль выбирают из опухолей нервной системы, опухолей головы и шеи, опухолей грудной клетки, опухолей пищеварительной системы, опухолей мочеполовой системы, опухолей мягких тканей и кожи, опухолей костей и т.п.;

предпочтительно опухоли нервной системы включают диффузную глиому, диффузную астроцитому и анапластическую астроцитому, глиобластому, олигодендроглиому, олигоастроцитому, диффузные глиомы, другие астроцитомы, эпендимомы, нейрональные и смешанные нейронально-глиальные опухоли, медуллобластому, другие эмбриональные опухоли, шванномы, менингиомы, солитарные фиброзные опухоли и гемангиоперицитомы и т.п.;

предпочтительно опухоли головы и шеи включают злокачественные опухоли полости и пазух носа, рак носоглотки, рак полости рта, рак гортани, опухоли слюнных желез, внутричерепные опухоли, рак щитовидной железы, рак языка и т.п.;

предпочтительно, опухоли грудной клетки включают рак легкого, рак пищевода, рак кардии, рак молочной железы, опухоли средостения и т.п.;

предпочтительно опухоли пищеварительной системы включают рак желудка, колоректальный рак, рак сигмовидной, ободочной и прямой кишки, рак печени, рак поджелудочной железы и периапулярный рак, рак желчевыводящих путей, злокачественные опухоли тонкого кишечника и т.п.;

предпочтительно опухоли мочеполовой системы включают рак почки, рак предстательной железы, рак мочевого пузыря, рак яичек, рак полового члена, рак шейки матки, рак эндометрия, рак яичника и т.п.;

предпочтительно опухоли мягких тканей и кожи включают злокачественную фиброзную гистиоцитому, рабдомиосаркому, синовиальную саркому, злокачественную меланому кожи и т.п.;

предпочтительно опухоли костей включают остеосаркому, саркому Юинга и т.п.;

предпочтительно рак ободочной кишки представляет собой аденому ободочной кишки;

предпочтительно рак молочной железы представляет собой клетку трижды негативного рака молочной железы;

предпочтительно рак печени представляет собой гепатоцеллюлярную карциному;

предпочтительно заболевание представляет собой гематологическую опухоль, выбранную из лейкоза, лимфомы (HL), множественной миеломы (MM),

миелодиспластического синдрома (MDS) и т.п.;

предпочтительно лейкоз представляет собой острый В-клеточный лимфобластный лейкоз, острый Т-клеточный лимфобластный лейкоз, острый миелоидный лейкоз и т.п.;

предпочтительно вирусные инфекционные заболевания включают: респираторные вирусные заболевания, желудочно-кишечные вирусные заболевания, вирусные заболевания печени, вирусные заболевания кожи и слизистых оболочек, вирусные заболевания глаз, вирусные заболевания центральной нервной системы, лимфоцитарные вирусные заболевания, вирусные заболевания, передаваемые насекомыми, лентивирусные инфекционные заболевания, и т.п.;

предпочтительно респираторные вирусные заболевания включают инфекции риновируса, аденовируса, респираторно-синцитиального вируса, вируса парагриппа и коронавируса; гриппа; свинки и т.п.;

предпочтительно желудочно-кишечные вирусные заболевания включают полиомиелит; инфекцию, вызванную вирусом Куксаки; эховирусную инфекцию; и вирусный гастроэнтерит, включая ротавирусный гастроэнтерит, вирусный гастроэнтерит Норуолка, аденовирусный гастроэнтерит, астровирусный гастроэнтерит, коронавирусный гастроэнтерит и калицивирусный гастроэнтерит и т.п.;

предпочтительно вирусные заболевания печени включают вирусный гепатит А, вирусный гепатит В, вирусный гепатит С, вирусный гепатит D, вирусный гепатит Е, вирусный гепатит Эпштейна-Барр и цитомегаловирусный гепатит и т.п.;

предпочтительно вирусные заболевания кожи и слизистых оболочек включают корь, краснуху, острую сыпь у детей, ветряную оспу и опоясывающий лишай, оспу, вирусную инфекцию простого герпеса, бешенство и ящур и т.п.;

предпочтительно глазные вирусные заболевания включают эпидемический кератоконъюнктивит, фолликулярный конъюнктивит и герпетический кератоконъюнктивит и т.п.;

предпочтительно вирусные заболевания центральной нервной системы включают японский энцефалит, западный лошадиный энцефалит, восточный лошадиный энцефалит, энцефалит Сент-Луиса, венесуэльский лошадиный энцефалит, энцефалит долины Мюррея, калифорнийский энцефалит, лесной энцефалит и лимфоцитарный хориоменингит и т.п.;

предпочтительно лимфоцитарные вирусные заболевания включают инфекционный мононуклеоз, цитомегаловирусную инфекцию и синдром приобретенного иммунодефицита и т.п.;

предпочтительно вирусные заболевания, передаваемые насекомыми, включают:

вирусные геморрагические лихорадки, в том числе эпидемическую геморрагическую лихорадку, желтую лихорадку, геморрагическую лихорадку Крым-Конго, лихорадку долины Рифт, аргентинскую геморрагическую лихорадку, боливийскую геморрагическую лихорадку, лихорадку Ласса, геморрагическую лихорадку Ому-Скраба, болезнь Марбурга, геморрагическую лихорадку Эбола и т.п.; лихорадку денге и геморрагическую лихорадку денге; лихорадку Западного Нила; колорадскую клещевую лихорадку; москитную лихорадку и т.п.;

предпочтительно лентивирусные инфекционные заболевания включают подострый склерозирующий панэнцефалит, болезнь Куру, прогрессирующую мультифокальную лейкоэнцефалопатию и подострую губчатую энцефалопатию (кортикостриарную дегенерацию спинного мозга) и т.п.;

предпочтительно аутоиммунные заболевания включают органоспецифические аутоиммунные заболевания и системные аутоиммунные заболевания;

предпочтительно органоспецифические аутоиммунные заболевания включают хронический лимфоцитарный тиреоидит, гипертиреоз, инсулинозависимый сахарный диабет, тяжёлую миастению, язвенный колит, пернициозную анемию с хроническим атрофическим гастритом, легочно-геморрагический нефритический синдром, вульгарную пузырчатку, пемфигоид, первичный билиарный цирроз печени, рассеянный склероз, острый идиопатический полиневрит и т.п.;

предпочтительно системные аутоиммунные заболевания включают системную красную волчанку, ревматоидный артрит, системный васкулит, склеродермию, пузырчатку, дерматомиозит, смешанное заболевание соединительной ткани, аутоиммунную гемолитическую анемию, аутоиммунные заболевания щитовидной железы, язвенный колит и т.п.;

предпочтительно неврологические заболевания включают заболевания нервной системы, заболевания периферических нервов, такие как невралгия тройничного нерва, паралич лицевого нерва, гемифациальный спазм, вестибулярный нейронит, языкоглоточную невралгию, заболевание мононерва, невралгию плечевого сплетения, множественную мононейропатию, множественную невропатию, острую воспалительную демиелинизирующую полинейропатию, хроническую воспалительную демиелинизирующую полинейропатию;

заболевания спинного мозга, например, миелит, компрессионную миелопатию, подострую комбинированную дегенерацию спинного мозга, сирингомиелию, сосудистое заболевание спинного мозга, арахноидит спинного мозга и т.п.;

цереброваскулярные заболевания, например, транзиторную ишемическую атаку,

инфаркт головного мозга, кровоизлияние в мозг, субарахноидальное кровоизлияние, тромбоз внутрисерепной венозной системы и т.п.;

инфекционные заболевания центральной нервной системы, например, менингит, энцефалит и т.п., вызванные инфекциями вирусов, бактерий, грибов или паразитов и т.п., и лентивирусный энцефалит, вызванный лентивирусными инфекциями;

демиелинизирующие заболевания центральной нервной системы, например, рассеянный склероз, оптикомиелит, острый рассеянный энцефаломиелит, лейкодистрофию и т.п.;

двигательные расстройства, например, болезнь Паркинсона, хорею, гепатолентикулярную дегенерацию, дистонию, эссенциальный тремор, позднюю дискинезию и т.п.;

эпилепсию;

головные боли, например, мигрень, головные боли напряжения, кластерные головные боли и т.п.;

дегенеративные заболевания нервной системы, например, болезнь двигательных нейронов, болезнь Альцгеймера, деменцию с тельцами Леви, лобно-височную деменцию, множественную системную атрофию и т.п.;

наследственные заболевания нервной системы, такие как наследственная атаксия, наследственная спастическая параплегия, болезнь Шарко-Мари-Тута, нейрофиброматоз, туберозный склероз, церебральный гемангиоматоз и т.п.;

нарушения неврологического развития, такие как врожденная гидроцефалия, церебральный паралич, базилярная депрессия, субтонзиллярное заболевание мозжечка и т.п.;

заболевания нервно-мышечного соединения и мышц, например, тяжелую миастению, периодический паралич, полимиозит, прогрессирующую мышечную дистрофию, миотоническую миопатию (миотоническую дистрофию, врожденную миотонию), метаболическую миопатию (митохондриальную миопатию, миопатию накопления липидов, гликогеноз) и т.п.;

заболевания вегетативной нервной системы, например, болезнь Рейно, эритромелалгию, гемифациальную атрофию, генерализованную вегетативную недостаточность, спонтанный гипергидроз, прогрессирующую липодистрофию и т.п.;

опухоли нервной системы, например, глиому, лимфому, менингиому и т.п.;

паранеопластические: паранеопластические синдромы нервной системы, например, паранеопластическую дегенерацию мозжечка, паранеопластический энцефаломиелит, подострую некротическую миелопатию, подострую болезнь двигательных нейронов,

паранеопластическую болезнь сенсорных нейронов и т.п.;

предпочтительно метаболические заболевания включают диабет, гиперлипидемию, подагру и т.д.

Воплощение 54. Способ стимуляции иммунного ответа у субъекта, причем указанный способ включает введение субъекту эффективного количества фармацевтической композиции по воплощению 46.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

Фиг.1 иллюстрирует химерную белковую конструкцию, основанную на технологиях направленной деградации белка на основе эндоплазматического ретикула, при этом Фиг. 1А демонстрирует линейную схематическую диаграмму и структурную схематическую диаграмму базовой химерной белковой (ER-TPD) конструкции TBD-TMD-ERD, а Фиг. 1В демонстрирует принцип работы химерной белковой (ER-TPD) конструкции TBD-TMD-ERD.

На Фиг. 2 показана химерная белковая (ER-TPD) конструкция TBD-TMD-ERD-E3L с доменом лиганда убиквитинлигазы E3, причем на Фиг. 2А показана ее линейная схематическая диаграмма, на Фиг. 2В показана ее структурная схематическая диаграмма, а Фиг. 2С демонстрирует принцип работы химерной белковой (ER-TPD) конструкции TBD-TMD-ERD-E3L.

На Фиг. 3 показана химерная белковая (ER-TPD) конструкция TBD-TMD-ERD-E2L с лигандным доменом убиквитин-связывающего фермента E2, причем на Фиг. 3А показана ее линейная схематическая диаграмма, на Фиг. 3В показана ее структурная схематическая диаграмма, а Фиг. 3С демонстрирует принцип работы химерной белковой (ER-TPD) конструкции TBD-TMD-ERD-E2L.

На Фиг. 4 показана химерная белковая (ER-TPD) конструкция TBD-TMD-ERD-LL с доменом лизосомного лиганда, причем на Фиг. 4А показана ее линейная схематическая диаграмма, на Фиг. 4В показана ее структурная схематическая диаграмма, а Фиг. 4С демонстрирует принцип работы химерной белковой (ER-TPD) конструкции TBD-TMD-ERD-LL.

На Фиг. 5 показана химерная белковая (ER-TPD) конструкция TBD-TMD-ERD-E3L-LL с комбинацией убиквитинированного лиганда лигазы E3 и лизосомного лиганда, причем на Фиг. 5А показана ее линейная схематическая диаграмма, на Фиг. 5В показана ее структурная схематическая диаграмма, а на Фиг. 5С рабочий структурный принцип химерной белковой (ER-TPD) конструкции TBD-TMD-ERD-E3L-LL.

На Фиг. 6 показана химерная нуклеотидная (ER-TPD) конструкция (TCR-ER-TPD), нацеленная на TCR, причем на Фиг. 6А показана химерная нуклеотидная конструкция

TCR-TPD1, а на Фиг. 6В показана химерная нуклеотидная конструкция TCR-TPD2.

На Фиг. 7 показаны результаты определения клеточного фенотипа клеток TCR ER-TPD Jurkat через 48 часов (А), 96 часов (В) и на 6-й день (С).

На Фиг. 8 показан экспрессирующий вектор, созданный с использованием одного лентивирусного экспрессирующего вектора и промотора EF1 α в качестве промотора, причем на Фиг. 8А показан экспрессирующий вектор CNK, на Фиг. 8В показана химерная белковая конструкция HLA-ER-TPD, а на Фиг. 8С показана химерная белковая конструкция CNK-HLA-ER-TPD.

На Фиг. 9 показаны результаты 48-часовой проточной цитометрии клеточного фенотипа клеток 293, трансфицированных химерной нуклеотидной конструкцией ER-TPD, нацеленной на HLA-abc, в сочетании с экспрессирующим вектором CNK.

На Фиг. 10 показана химерная нуклеотидная конструкция ER-TPD, нацеленная на CD123, причем на Фиг. 10А показан экспрессирующий вектор CNK, а на Фиг. 10В показана химерная белковая конструкция HLA-TPD.

На Фиг. 11 показаны результаты 48-часовой проточной цитометрии по клеточному фенотипу для клеточной линии острого миелолейкоза THP1, трансфицированной химерной нуклеотидной конструкцией scFv TPD, нацеленной на CD123.

На Фиг. 12 показано применение CAR-T-клеток ER-TPD-CD123, нацеленных на CD123, при этом на Фиг. 12А1 показан CD123 CAR, на Фиг. 12В1 показана экспрессия CD123 на активированных Т-клетках, а на Фиг. 12С1 показано, что CAR-T-клетки, нацеленные на CD123, могут вызывать эффект самоуничтожения в процессе активации, культивирования и уничтожения опухолевых клеток, на Фиг. 12А2 показана химерная белковая конструкция CD123 CAR-T-T2A-CD123 ER-TPD, а на Фиг. 12В2 показано, что экспрессия химерной белковой конструкции может разрушать самоэкспрессируемый CD123, а на Фиг. 12С2 показано уничтожающее действие на опухолевые клетки после экспрессии химерной белковой конструкции.

На Фиг. 13 показано применение химерной белковой конструкции ER-TPD, нацеленной на аутоантитела, при лечении аутоиммунных заболеваний, при этом Фиг. 13А показывает, что плазматические клетки у пациентов с диабетом 1 типа экспрессируют и высвобождают антитела к инсулину, которые связываются с инсулином, и очищают периферическую кровь от инсулина, что приводит к резкому снижению использования инсулина у пациентов; На Фиг. 13В показана доставка ДНК транспозона ER-TPD, нацеленная на антитела к инсулину, в плазматические клетки с использованием липосом, нацеленных на внутриклеточные плазматические клетки, что обеспечивает интеграцию и долговременную экспрессию химерной белковой конструкции IAA ER-TPD.

На Фиг. 14 показаны типичные химерные слитые белки, содержащие один или несколько трансмембранных и цитоплазматических доменов молекул, связывающих молекулы TCR $\alpha\beta$ или HLA, и вирусные белки, резидентные в ЭПР. На Фиг. 14А показана схематическая диаграмма и состав химерного мультидомена UT. Широкая структура вирусного гликопротеина, резидентного в ЭПР (viral ER-resident glycoprotein, VEP) состоит из люминального домена (luminal domain, LD), трансмембранного домена (TMD) и цитоплазматического функционального домена; химерный мультидомен UT состоит из TCR или HLA-связывающего домена, шарнира/спейсера, трансмембранного и цитоплазматического доменов VEP. На Фиг. 14В показана схематическая диаграмма и состав химерных мультидоменов UT. Широкая структура различных вирусных гликопротеинов, резидентных в ЭПР (VEP) состоит из отдельных люминальных доменов (LD), трансмембранных доменов (TMD) и цитоплазматических функциональных доменов; Химерный мультидомен UT состоит из домена TCR или HLA, шарнира/спейсера, который отличается от трансмембранного и цитоплазматического доменов VEP. На Фиг. 14С показана схематическая диаграмма и состав химерного мультидомена UT. Широкая структура различных вирусных гликопротеинов, резидентных в ЭПР (VEP), состоит из отдельных люминальных доменов (LD), трансмембранных доменов (TMD) и цитоплазматических функциональных доменов; химерные мультидомены UT состоят из TCR или HLA-связывающего домена, шарнира/спейсера, где разные трансмембранные и химерные цитоплазматические домены VEP происходят из разных VEP.

На Фиг. 15 показано, что принудительная экспрессия элементов UT может эффективно ингибировать экспрессию TCR в клетках Jurkat. Был сконструирован лентивирусный вектор с укороченным EGFR, кодирующий scFv против TCR, объединенный с различными вирусными белками, резидентными в ЭПР, доменами US2, US3, US11 из HCMV, E19 TM/CT аденовируса, и одновременно кодирующий антилентивирусный вектор TCR scFv, объединенный с US и E19 TM/CT аденовируса. Клетки Jurkat трансдуцировали этим лентивирусом, а нетрансдуцированные клетки Jurkat использовали в качестве контроля. Через сорок восемь часов после трансдукции клетки отправляли в проточный цитометр для обнаружения экспрессии TCR $\alpha\beta$ в трансдуцированных клетках (клетках EGFR+). Результаты показали, что все EGFR(+) Jurkat продемонстрировали значительное снижение экспрессии TCR $\alpha\beta$, а клетки, трансдуцированные комбинированными компонентами UT (US2/E19), могли эффективно блокировать экспрессию TCR $\alpha\beta$. Все протестированные химерные элементы UT (US2, US3, US11, E19) были способны блокировать экспрессию TCR $\alpha\beta$. Объединение элементов UT (US2 и E19) может значительно усилить ингибирующее действие на экспрессию

TCR $\alpha\beta$ на поверхности клеток Jurkat.

На Фиг. 16 показано, что принудительная экспрессия элементов UT может эффективно ингибировать экспрессию TCR в Т-клетках человека. На Фиг. 16А показано, что принудительная экспрессия элементов UT может эффективно ингибировать экспрессию TCR в Т-клетках человека. Lentiviralный вектор с кассетой экспрессии, включающей укороченный EGFR, кодирует анти-TCR scFv, объединенный с доменом US3 TM/CT HCMV (анти-TCR-US2 TM/CT-T2A-EGFRt). Т-клетки человека стимулировали и трансдуцировали этим лентивирусом, а нетрансдуцированные Т-клетки использовали в качестве контроля. После 5 дней трансдукции клетки отправляли в проточный цитометр для обнаружения экспрессии TCR $\alpha\beta$ в трансдуцированных Т-клетках (клетках EGFR+). Результаты показали, что EGFR(+) Т-клетки демонстрируют значительное снижение экспрессии TCR $\alpha\beta$ по сравнению с нетрансдуцированными Т-клетками. Это указывает на то, что элемент US, содержащий анти-TCR-US3 TM/CT, может эффективно ингибировать экспрессию TCR $\alpha\beta$ в Т-клетках человека. На Фиг. 16В показано, что принудительная экспрессия элементов UT может эффективно ингибировать экспрессию TCR в Т-клетках человека. Lentiviralный вектор с кассетой экспрессии, включающей укороченный EGFR, кодирует анти-TCR scFv, объединенный с доменом E19 TM/CT HCMV (анти-TCR-E19 TM/CT-T2A-EGFRt). Т-клетки человека стимулировали и трансдуцировали этим лентивирусом, а нетрансдуцированные Т-клетки использовали в качестве контроля. После 5 дней трансдукции клетки отправляли в проточный цитометр для обнаружения экспрессии TCR $\alpha\beta$ в трансдуцированных Т-клетках (клетках EGFR+). Результаты показали, что EGFR(+) Т-клетки демонстрируют значительное снижение экспрессии TCR $\alpha\beta$ по сравнению с нетрансдуцированными Т-клетками. Повышенная вирусная трансдукция может еще больше усилить ингибирование экспрессии TCR $\alpha\beta$ на поверхности Т-клеток. Это указывает на то, что элемент US, содержащий анти-TCR-E19 TM/CT, может эффективно экспрессировать TCR $\alpha\beta$ в Т-клетках человека.

На Фиг. 17 показано, что CNK-Т-клетки с элементами UT подавляют экспрессию TCR на клетках CD8/CD4. Lentiviralный вектор содержит кассету экспрессии (CNK-UT-E19), кодирующую химерный NK-рецептор и scFv против TCR, объединенный с доменом E19 TM/CT. Т-клетки человека были трансдуцированы этим лентивирусом. После пяти дней трансдукции клетки отправляли на проточную цитометрию для обнаружения экспрессии TCR $\alpha\beta$ в трансдуцированных клетках (клетках NKG2D+), обычных Т-клетках, трансдуцированных химерным NK-рецептором, и нетрансдуцированных Т-клетках. Результаты показывают, что введение элементов UT в кассету экспрессии CNK не влияет на экспрессию химерных NK-рецепторов. Кроме того, введение элементов UT может

значительно ингибировать экспрессию TCR на CD8+ и CD4+ CNK-T-клетках.

На Фиг. 18 показано, что CNK-T-клетки с элементами UT, подобно нормальным CNK-T-клеткам, проявляют сильную цитотоксичность в отношении опухолевых клеток. Нетрансгенные T-клетки, CNK-T-клетки и CNK-UT-клетки (E19) культивировали совместно с клетками HerG2 при соотношении E:T 1:5. После культивирования в течение 24 часов клетки собирали и анализировали с помощью проточной цитометрии для обнаружения лизиса опухоли и активации T-клеток. Данные показывают, что CNK-UT-клетки проявляют такую же сильную цитотоксичность, как и нормальные CNK-T-клетки, по сравнению с клетками HerG2. После совместного культивирования в течение 24 часов количество опухолевых клеток CD45(-) было значительно снижено как в совместных культурах CNK-T, так и CNK-UT. Кроме того, как CD8, так и CD4 CNK-UT-клетки могут повышать уровень CD25 и CD137 после совместного культивирования с клетками HerG2.

На Фиг. 19 показан многофункциональный комплекс CNK-UT из четырех структур, причем на Фиг. 19А показан базовый многофункциональный комплекс CNK-UT, на Фиг. 19В показан многофункциональный комплекс CNK-UT с молекулярным белковым доменом, связывающим мишень MHC I. На Фиг. 19С показан многофункциональный комплекс CNK-UT с молекулярным белковым доменом, связывающим мишень MHC I, и химерным адаптером, на Фиг. 19D показан многофункциональный комплекс CNK-UT с молекулярным белковым доменом, связывающим мишень MHC I, и рецептором, например, CAR или TCR и т.д., которые направлены и уничтожают опухолевую клетку.

На Фиг. 20 показаны структуры четырех элементов CNK-UT, экспрессирующих многофункциональные комплексы CNK-UT. Как показано на Фиг. 20А, одиночный экспрессирующий вектор лентивирусного промотора EF1 α способствует экспрессии одной из комбинаций элементов CNK-UT: DAP10-DAP12 ICD-T2A-NKG2D-p2A-анти-TCR-AdE3 ERAD; как показано на Фиг. 20В, одиночный лентивирусный экспрессирующий вектор промотора EF1 α используется для стимулирования экспрессии одной из комбинаций элементов CNK-UT: DAP10-DAP12 ICD-T2A-NKG2D-p2A-анти-TCR-US2 ERAD; как показано на Фиг. 20С, один лентивирусный экспрессирующий вектор и промоторы EF1 α и CMV используются для регуляции мультигенной экспрессии DAP10-CD3 ζ -T2A-NKG2D-p2A-ant-TAA scFv-DAP10 и анти-TCR-AdE3 ERAD-E2A-AdE3, соответственно, реализуя экспрессию множества функциональных элементов CNK-UT на одном векторе; как показано на Фиг. 20D, два разных лентивирусных экспрессирующего вектора используются для регулирования экспрессии анти-TAA scFv-CD28/4-1BB-CD3 ζ -T2A-CD3 ζ -p2A-NKG2D и анти-TCR-AdE3 ERAD-T2A-AdE3, соответственно, реализуя экспрессию множественных функциональных элементов CNK-UT на одной и той же T-

клетке после совместной трансфекции Т-клетками.

На Фиг. 21 показаны результаты обнаружения базового фенотипа клеток CNK-UT (DAP10-CD3 ζ -T2A-NKG2D-p2A-anti-TCR scFv-AdE3) проточной цитометрией.

На Фиг. 22 проиллюстрированы результаты распознавания и специфического уничтожения клеток CNK-UT на клеточной линии аденомы толстой кишки человека HT29, при этом на Фиг. 22А показана экспрессия различных белков-мишеней НК в клеточной линии аденомы толстой кишки человека HT29, а на Фиг. 22В показывает, что CNK-UT-клетки обладают эффективными функциями уничтожения и активации HT29.

На Фиг. 23 показано распознавание и специфическое уничтожение MDA-MB453 клетками CNK-UT, при этом на Фиг. 23А показана экспрессия различных белков-мишеней НК в клеточной линии трижды негативного рака молочной железы MDA-MB453, а на Фиг. 23В показано, что CNK-UT-клетки обладают эффективными функциями уничтожения и активации TNP1.

На Фиг. 24 показано, что клетки GPC3 CAR/CNK-UT обладают более эффективной способностью к удалению опухолей у мышей, чем клетки GPC3 CAR-T.

На Фиг. 25 показано, что клетки GPC3 CAR/CNK-UT обладают более эффективной способностью к удалению опухоли, чем клетки GPC3 CAR-T.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

Прежде чем настоящее раскрытие будет описано более подробно, следует понимать, что оно не ограничивается конкретными описанными воплощениями и, как таковое, может, конечно, варьировать. Также следует понимать, что используемая в данной заявке терминология предназначена только для целей описания конкретных воплощений и не предназначена для ограничения, поскольку объем настоящего раскрытия будет ограничен только прилагаемой формулой изобретения.

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящей заявке, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в области техники, к которой относится данное раскрытие. Хотя любые способы и материалы, аналогичные или эквивалентные описанным в данной заявке, также могут быть использованы при практическом осуществлении или при тестировании настоящего раскрытия, далее будут описаны предпочтительные способы и материалы.

Все публикации и патенты, процитированные в данном описании, включены в данную заявку ссылкой, как если бы каждая отдельная публикация или патент были специально и индивидуально указаны для включения ссылкой и включены сюда ссылкой для раскрытия и описания способов и/или материалов, в связи с которыми цитируются публикации. Цитирование любой публикации предназначено для ее раскрытия до даты

подачи заявки и не должно быть истолковано как признание того, что настоящее раскрытие не имеет права предшествовать такой публикации в силу предварительного раскрытия. Кроме того, предоставленные даты публикации могут отличаться от фактических дат публикации, которые, возможно, потребуются независимое подтверждение.

Как будет очевидно специалистам в данной области техники после прочтения настоящего раскрытия, каждый из отдельных воплощений, описанных и проиллюстрированных в данном документе, имеет отдельные компоненты и признаки, которые можно легко отделить или объединить с признаками любого из нескольких других воплощений, не выходя за рамки объема или сущности настоящего раскрытия. Любой описанный способ может быть реализован в порядке изложенных событий или в любом другом порядке, который логически возможен.

I. Определение

Следующие определения представлены для помощи читателю. Если не указано иное, все термины в области техники, обозначения и другие научные или медицинские термины или терминология, используемые в данном документе, имеют значения, обычно понятные специалистам в данной области. В некоторых случаях, термины с общепризнанно понимаемыми значениями определяются в данном документе для ясности и/или в качестве быстрой справки, и включение таких определений в данном документе не должно обязательно толковаться как представляющее существенное отличие от того, как оно обычно понимается в данной области техники.

Следует отметить, что в настоящем раскрытии такие термины, как «включать», «включает», «включающий», «содержит», «содержащий» и т.п., имеют значения, прописанные в Патентном законодательстве США; они являются инклюзивными или открытыми и не исключают дополнительных, неизложенных элементов или стадий способа. Такие термины, как «состоящий по существу из» и «состоит по существу из» имеют значение, указанное в Патентном законодательстве США; они позволяют включать дополнительные ингредиенты или стадии, которые существенно не влияют на основные и новые характеристики заявленного изобретения. Термины «состоит из» и «состоящий из» имеют значение, приписанное им в Патентном праве США; а именно, что эти термины являются закрытыми.

Используемые в данном документе формы единственного числа включают множественное число, если контекст явно не диктует иное.

В настоящем документе термин «около» относится к измеримой величине, такой как количество, продолжительность времени и т.п., и охватывает вариации $\pm 20\%$, $\pm 10\%$,

$\pm 5\%$, $\pm 1\%$, $\pm 0,5\%$. или $\pm 0,1\%$ от заданного значения.

«Антиген» относится к молекуле, способной специфически распознаваться и связываться антителом. В некоторых воплощениях антиген(ы), описанный в настоящем документе, может представлять собой молекулу, провоцирующую иммунный ответ. Этот иммунный ответ может быть либо гуморальным, либо клеточно-опосредованным, либо тем и другим. Специалист в данной области поймет, что любая макромолекула, включая практически все белки или пептиды, может служить антигеном. Совершенно очевидно, что настоящее раскрытие включает терапевтические антитела, действующие как антиген, вызывающий иммунный ответ.

«Антитело» относится к полипептиду семейства иммуноглобулинов (Ig), который связывается с антигеном. Например, встречающееся в природе «антитело» типа IgG представляет собой тетрамер, содержащий по меньшей мере две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, соединенные между собой дисульфидными связями. Каждая тяжелая цепь состоит из переменного участка тяжелой цепи (обозначенного в настоящем документе как VH) и константного участка тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи состоит из трех доменов, CH1, CH2 и CH3. Каждая легкая цепь содержит переменную область легкой цепи (сокращенно обозначенную в данном документе как VL) и константную область легкой цепи. Константная область легкой цепи состоит из одного домена (сокращенно CL). Области VH и VL можно дополнительно подразделить на области гипервариабельности, называемые областями, определяющими комплементарность (CDR) (CDR легкой цепи включает LCDR1, LCDR2 и LCDR3, а CDR тяжелой цепи включает HCDR1, HCDR2 и HCDR3), перемежающиеся более консервативные регионы называются каркасными регионами (FR). Границы, определяющие CDR антител, раскрытых в настоящем документе, могут быть определены или идентифицированы в соответствии с соглашениями Kabat, IMGT, Chothia или Al-Lazikani (Al-Lazikani, B., Chothia, C., Lesk, A.M., *J. Mol. Biol.*, 273(4), 927(1997); Chothia, C. et al., *Journal of Molecular Biology*, Dec. 5;186(3):651-63(1985); Chothia, C. and Lesk, A.M., *Journal of Molecular Biology*, 196, 901 (1987); Chothia, C. et al., *Nature*, Dec. 21-28;342(6252):877-83 (1989); Kabat E.A. et al., *National Institutes of Health*, Bethesda, Md. (1991); Marie-Paule Lefranc et al., *Developmental and Comparative Immunology*, 27: 55- 77 (2003); Marie-Paule Lefranc et al., *Immunome Research*, 1(3), (2005); Marie-Paule Lefranc, *Molecular Biology of B cells (Second Edition)*, Chapter 26, 481-514, (2015)). VH и VL состоят из трех CDR и четырех FR, соответственно, расположенных в следующем порядке от аминоконца к карбоксильному концу: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. Вариабельные области тяжелой и легкой цепей содержат связывающие домены, которые взаимодействуют с антигеном.

В настоящем документе «функциональный фрагмент» антитела используется взаимозаменяемо с «антигенсвязывающим фрагментом» и относится к фрагменту антитела, который включает один или несколько CDR, или к фрагменту антитела, образованному любой другой частью антитела, которая связывается с антигеном, а не включение полной структуры нативного антитела. Примеры антигенсвязывающих фрагментов включают, без ограничения указанным, диатела, Fab, Fab', F(ab')₂, Fd, фрагменты F_v, стабилизированные дисульфидной связью фрагменты F_v (dsF_v), (dsF_v)₂, биспецифические dsF_v (dsF_v) -dsF_v'), диатела, стабилизированные дисульфидной связью (ds-диатела), молекулы одноцепочечных антител (scF_v), димеры scF_v (бивалентные диатела), мультиспецифические антитела, верблюжьи однодоменные антитела, нанотела, доменные антитела и двухвалентные доменные антитела. Антигенсвязывающие фрагменты способны связывать тот же антиген, с которым связывается исходное антитело. В некоторых воплощениях антигенсвязывающий фрагмент может включать один или несколько CDR конкретного родительского антитела.

«Fab» в отношении антитела относится к моновалентному антигенсвязывающему фрагменту антитела, состоящему из одной легкой цепи (как переменной, так и константной области), связанной с переменной областью и первой константной областью одной тяжелой цепи дисульфидной связью. Fab можно получить расщеплением антитела папаином по остаткам, проксимальным к N-концу дисульфидной связи между тяжелыми цепями шарнирной области.

«Fab'» относится к Fab-фрагменту, который включает часть шарнирной области, который может быть получен расщеплением пепсином антитела по остаткам, проксимальным к C-концу дисульфидной связи между тяжелыми цепями шарнирной области и таким образом, он отличается от Fab небольшим количеством остатков (включая один или несколько цистеинов) в шарнирной области.

«F(ab)₂» относится к димеру Fab', который включает две легкие цепи и часть двух тяжелых цепей.

«F_v» в отношении антитела относится к наименьшему фрагменту антитела, несущему полный сайт связывания антигена. Фрагмент F_v состоит из переменной области одной легкой цепи, связанной с переменной областью одной тяжелой цепи. «dsF_v» относится к стабилизированному дисульфидом F_v-фрагменту, в котором связь между переменной областью одной легкой цепи и переменной областью одной тяжелой цепи представляет собой дисульфидную связь.

«Одноцепочечные антитела F_v» или «scF_v» относятся к сконструированному антителу, состоящему из переменной области легкой цепи и переменной области

тяжелой цепи, соединенных друг с другом напрямую или через последовательность пептидного линкера (Huston J S et al. Proc Natl Acad Sci USA, 85:5879(1988)). «Димер scFv» относится к одной цепи, содержащей две переменные области тяжелой цепи и две переменные области легкой цепи с линкером. В некоторых воплощениях «димер scFv» представляет собой двухвалентное диатело или двухвалентное ScFv (BsFv), содержащее VH-VL (связанный пептидным линкером), димеризованное с другим фрагментом VH-VL, так что VH одного фрагмента координируются с VL другого фрагмента и образуют два сайта связывания, которые могут нацеливать одни и те же антигены (или эпитопы) или разные антигены (или эпитопы). В других воплощениях «димер scFv» представляет собой биспецифическое диатело, содержащее VH1-VL2 (связанный пептидным линкером), связанный с VL1-VH2 (также связанный пептидным линкером), так что VH1 и VL1 координируют друг друга и VH2 и VL2 координируют друг друга, и каждая координированная пара имеет разную антигенную специфичность.

«Одноцепочечные антитела Fv-Fc» или «scFv-Fc» относятся к сконструированному антителу, состоящему из scFv, соединенного с Fc-областью антитела.

«Верблюжье однодоменное антитело», «антитело на основе тяжелой цепи», «нанотело» или «HCAb» относится к антителу, которое содержит два домена VH и не содержит легких цепей (Riechmann L. и Muyldermans S., J Immunol Methods. December 10; 231(1-2):25-38 (1999); Muyldermans S., J Biotechnol. June; 74(4):277-302 (2001); WO94/04678; WO94/25591; U.S. Pat. №6005079). Антитела на основе тяжелых цепей были первоначально получены от верблюдов (верблюдов, дромадеров и лам). Несмотря на отсутствие легких цепей, верблюжьи антитела обладают подлинным антигенсвязывающим репертуаром (Hamers-Casterman C. et al., Nature. June 3; 363(6428):446-8 (1993); Nguyen V K. et al. "Heavy-chain antibodies in Camelidae; a case of evolutionary innovation," Immunogenetics. April; 54(1):39-47 (2002); Nguyen V K. Et al. Immunology. May; 109(1):93-101 (2003)). Переменный домен антитела тяжелой цепи (домен VHH) представляет собой наименьшую известную антигенсвязывающую единицу, образующуюся в результате адаптивных иммунных ответов (Koch-Nolte F. et al., FASEB J. October; 21(13):3490-8. Epub 2007 Jun. 15 (2007)). «Диатела» включают небольшие фрагменты антител с двумя сайтами связывания антигена, причем фрагменты содержат домен VH, соединенный с доменом VL в одной полипептидной цепи (VH-VL или VL-VH) (см., например, Holliger P. et al., Proc Natl Acad Sci USA. July 15; 90(14):6444-8 (1993); EP404097; WO93/11161). Два домена в одной цепи не могут быть спарены, поскольку линкер слишком короткий, поэтому домены вынуждены спариваться с комплементарными доменами другой цепи, создавая тем самым два антигенсвязывающих сайта. Антигенсвязывающие сайты могут быть нацелены на

одни и те же или разные антигены (или эпитопы).

«Доменное антитела» относится к фрагменту антитела, содержащему только переменную область тяжелой цепи или переменную область легкой цепи. В некоторых воплощениях два или более домена VH ковалентно соединены с пептидным линкером с образованием двухвалентного или мультивалентного доменного антитела. Два домена VH двухвалентного доменного антитела могут быть нацелены на один и тот же или разные антигены.

В некоторых воплощениях «(dsFv)₂» включает три пептидные цепи: два фрагмента VH связаны пептидным линкером и связаны дисульфидными мостиками с двумя фрагментами VL.

В некоторых воплощениях «биспецифическое диатело» включает VH1-VL2 (связанный пептидным линкером), связанный с VL1-VH2 (также связанным пептидным линкером) через дисульфидный мостик между VH1 и VL1.

В некоторых воплощениях «биспецифический dsFv» или «dsFv-dsFv'» включает три пептидные цепи: фрагмент VH1-VH2, где тяжелые цепи связаны пептидным линкером (например, длинным гибким линкером) и спариваются через дисульфидные мостики с фрагментами VL1 и VL2, соответственно. Каждая дисульфидная пара тяжелой и легкой цепи имеет различную антигенную специфичность.

«Аутологичная клетка» относится к любой клетке, полученной от того же человека, что и реципиент клетки, т.е. от самого реципиента.

«Аллогенная клетка» представляет собой любую клетку, полученную от другого индивидуума того же вида, что и реципиент клетки (т.е. не от самого реципиента).

В настоящем документе термины «конструкция» и «белковая конструкция» используются взаимозаменяемо для обозначения белка или белкового комплекса. Термин «комплекс» относится к агрегату или компоненту, образованному путем агрегации или компоновки более чем одного белка (например, 2, 3, 4 или более белков). Предпочтительно комплекс способен выполнять функции, которые не могут выполнять отдельные белки в его составе. В комплексе составляющие белки могут контактировать или не контактировать друг с другом.

Термин «химерный», используемый в данном документе в отношении конструкции, означает, что часть конструкции получена из одного вида, а другая часть конструкции получена из другого вида.

Термин «вектор», используемый в данном документе, относится к носителю, в который может быть вставлен полинуклеотид, кодирующий белок таким функциональным образом, чтобы вызвать экспрессию этого белка. Вектор можно использовать для

трансформации, трансдукции или трансфекции клетки-хозяина, чтобы вызвать экспрессию генетического элемента, который он несет в клетке-хозяине. Примеры векторов включают плазмиды, фагмиды, космиды, искусственные хромосомы, такие как дрожжевая искусственная хромосома (YAC), бактериальная искусственная хромосома (BAC) или искусственная хромосома, полученная из P1 (PAC), бактериофаги, такие как фаг лямбда или фаг M13, и вирусы животных. Категории вирусов животных, используемых в качестве векторов, включают ретровирус (включая лентивирус), аденовирус, аденоассоциированный вирус, герпесвирус (например, вирус простого герпеса), поксвирус, бакуловирус, папилломавирус и паповавирус (например, SV40). Вектор может содержать множество элементов для контроля экспрессии, включая последовательности промотора, последовательности инициации транскрипции, энхансерные последовательности, селективируемые элементы и репортерные гены. Кроме того, вектор может содержать точку начала репликации. Вектор может также включать материалы, способствующие его проникновению в клетку, включая, без ограничения указанным, вирусную частицу, липосому или белковое покрытие. Вектор может представлять собой экспрессирующий вектор или клонирующий вектор. Настоящее раскрытие относится к векторам (например, экспрессирующим векторам), содержащим последовательность нуклеиновой кислоты, представленную в настоящем документе, кодирующую химерную белковую конструкцию, по меньшей мере один промотор (например, SV40, CMV, EF-1 α), функционально связанный с последовательностью нуклеиновой кислоты, и/или хотя бы один маркер для отбора. Примеры векторов включают, без ограничения указанным, ретровирус (включая лентивирус), аденовирус, аденоассоциированный вирус, герпесвирус (например, вирус простого герпеса), поксвирус, бакуловирус, папилломавирус, паповавирус (например, SV40), фаг лямбда и Фаг M13, плазида pcDNA3.3, pMD18-T, pOptivec, pCMV, pEGFP, pIRES, pQD-Hyg-GSeu, pALTER, pBAD, pcDNA, pCal, pL, pET, pGEMEX, pGEX, pCI, pEGFT, pSV2, pFUSE, pVITRO, pVIVO, pMAL, pMONO, pSELECT, pUNO, pDUO, Psg5L, pBABE, pWPXL, pBI, p15TV-L, pPro18, pTD, pRS10, plexA, pACT2.2, pCMV-SCRIPT®, pCDM8, pCDNA1.1/amp, pcDNA3.1, pRc/RSV, PCR 2.1, pEF-1, pFB, pSG5, pXT1, pCDEF3, pSVSPORT, pEF-Bos и т.п.

Фраза «клетка-хозяин», используемая в настоящем документе, относится к клетке, в которую был или будет введен экзогенный полинуклеотид и/или вектор.

Термин «функциональный вариант», используемый в данном документе, относится к полипептиду/белку, который имеет по меньшей мере 70% идентичности последовательности с родительским полипептидом/белком, но все же сохраняет функцию

родительского полипептида/белка. Вариант может отличаться от родительского полипептида/белка одним или несколькими аминокислотными остатками. Например, функциональный вариант может иметь замену, добавление, делецию, вставку или укорочение одного или нескольких аминокислотных остатков родительского полипептида/белка.

В настоящей заявке процент «идентичности» или «идентичности последовательности» в контексте полипептида или полинуклеотида определяется путем сравнения двух оптимально выровненных последовательностей в окне сравнения, при этом часть полинуклеотидной или полипептидной последовательности в окне сравнения может содержать добавления или делеции (т.е. пробелов) по сравнению с референсной последовательностью (которая не содержит добавлений или делеций) для оптимального выравнивания двух последовательностей. Процент рассчитывается путем определением количества положений, в которых идентичные нуклеотидные или аминокислотные остатки встречаются в обеих последовательностях с получением количества совпадающих положений, путем деления количества совпадающих положений на общее количество положений в окне сравнения; и путем умножения результата на 100 с получением процента идентичности последовательностей. Выравнивание с целью определения процентной идентичности последовательностей аминокислот (или нуклеиновых кислот) может быть достигнуто, например, с использованием общедоступных инструментов, таких как BLASTN, BLASTp (доступны на веб-сайте Национального центра биотехнологической информации США (NCBI), см. также Altschul S.F. et al, *J. Mol. Biol.*, 215: 403–410 (1990) ; Stephen F. et al, *Nucleic Acids Res.*, 25: 3389–3402 (1997)), ClustalW2 (доступно на веб-сайте Европейского института биоинформатики, см. также Higgins D.G. et al, *Methods in Enzymology*, 266: 383-402 (1996) ; Larkin M.A. et al, *Bioinformatics* (Oxford, England), 23 (21) : 2947-8 (2007)), и программное обеспечение ALIGN или Megalign (DNASTAR). Специалисты в данной области техники могут использовать параметры по умолчанию, предоставляемые инструментом, или могут настроить параметры, соответствующие выравниванию, например, путем выбора подходящего алгоритма. В некоторых воплощениях неидентичные положения остатков могут отличаться консервативными аминокислотными заменами. «Консервативная аминокислотная замена» представляет собой замену, при которой аминокислотный остаток заменяется другим аминокислотным остатком, имеющим боковую цепь (группу R) со схожими химическими свойствами (например, зарядом или гидрофобностью). В целом консервативные аминокислотные замены существенно не изменяют функциональные свойства белка. Если две или более аминокислотные последовательности отличаются друг от друга

консервативными заменами, процент или степень сходства можно увеличить, чтобы внести поправку на консервативный характер замен. Способ осуществления этой регуляции хорошо известен специалистам в данной области, см., например, Pearson (1994) *Methods Mol. Biol.* 24: 307-331, которая включена в данную заявку ссылкой.

«Функционально связанный» относится к функциональной взаимосвязи между двумя или более полинуклеотидными последовательностями. В контексте полинуклеотида, кодирующего слитый белок (такой как полипептидная цепь CAR по настоящему раскрытию), этот термин относится к соединению двух или нескольких полинуклеотидных последовательностей, так что два полинуклеотида экспрессируются в одной рамке считывания, что позволяет транслировать аминокислотную последовательность. В контексте регуляции транскрипции или трансляции этот термин относится к функциональной взаимосвязи регуляторных последовательностей с кодирующей последовательностью, например, промотор находится в правильном положении и ориентации кодирующей последовательности, чтобы регулировать транскрипцию.

«Полинуклеотид» или «нуклеиновая кислота» относится к цепи нуклеотидов. В контексте настоящего документа полинуклеотиды включают все полинуклеотидные последовательности, которые получены любыми способами, доступными в данной области техники, включая, без ограничения указанным, рекомбинантные способы и синтетические способы.

«Полипептид» и «белок» используются взаимозаменяемо и относятся к цепи аминокислотных остатков, ковалентно связанных пептидными связями. Полипептиды включают природные пептиды, рекомбинантные пептиды, синтетические пептиды или их комбинацию.

«Т-клеточный рецептор» или «TCR» относится к белковому комплексу на поверхности Т-клеток, который отвечает за распознавание фрагментов антигена в виде пептидов, связанных с молекулами МНС.

Термин «химерный рецептор натурального киллера» относится к композиции, содержащей химерный компонент НК-активирующего рецептора и химерный компонент передачи сигнала НК.

Термин «CNK Т-клетка» относится к Т-клетке, содержащей конструкцию CNK.

Термин «универсальная Т-клетка с химерным рецептором натурального киллера» (CNK-UT) относится к Т-клетке, экспрессирующей конструкции модуля НК-активирующего рецептора, конструкции модуля передачи сигнала CNK и конструкции модуля UT.

Термин «CAR/CNK-UT» относится к химерному антигенному рецептору и универсальной Т-клетке с химерным рецептором натурального киллера (CNK-UT), которая относится к Т-клетке, экспрессирующей структуру CAR, нацеленную на специфический опухолевый антиген, модульную конструкцию рецептора, активирующего НК, модульную конструкцию передачи сигнала CNK и модульную конструкцию UT.

Термин «костимулирующий лиганд», используемый в настоящем документе, включает молекулу на антигенпрезентирующей клетке (например, АПК, дендритной клетке, В-клетке и других иммунных клетках), которая специфически связывает родственную костимулирующую молекулу на Т-клетке. клетку, тем самым обеспечивая сигнал, который, в дополнение к первичному сигналу, обеспечиваемому, например, связыванием комплекса TCR/CD3 с молекулой МНС, нагруженной пептидом, опосредует Т-клеточный ответ, включая, без ограничения указанным, пролиферацию, активацию, дифференцировку и т.д. Костимулирующий лиганд может включать, без ограничения указанным, CD7, B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), PD-L1, PD-L2, 4-1BBL, OX40L, индуцибельный костимулирующий лиганд (ICOS-L), молекулу межклеточной адгезии (ICAM), CD30L, CD40, CD70, CD83, HLA-G, MICA, MICB, HVEM, бета-рецептор лимфотоксина, 3/TR6, ILT3, ILT4, HVEM, агонист или антитело, связывающее рецептор лиганда Toll и лиганд, который специфически связывается с B7-H3. Костимулирующий лиганд также включает, среди прочего, антитело, которое специфически связывается с костимулирующей молекулой, присутствующей на Т-клетке, такой как, без ограничения указанным, CD27, CD28, 4-1BB, OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, антиген-1, связанный с функцией лимфоцитов (LFA-1), CD2, CD7 LIGHT, NKG2C, B7-H3 и лиганд, который специфически связывается с CD83.

«Костимулирующая молекула» или «костимулирующий рецептор» относится к когнатному партнеру по связыванию на Т-клетке, который специфически связывается с костимулирующим лигандом, тем самым опосредуя костимулирующий ответ Т-клетки, например, без ограничения указанным, пролиферацию. Костимулирующие молекулы включают, без ограничения указанным, молекулу МНС класса I, BTLA, рецептор Toll-лиганда. Костимулирующие молекулы также включают неприродные сконструированные белки.

Термин «костимулирующий сигнал», используемый в данном документе, относится к сигналу, который в сочетании с первичным сигналом, таким как лигирование TCR/CD3, приводит к пролиферации Т-клеток и/или положительной или отрицательной регуляции ключевых молекул.

Термин «стимуляция» означает первичную реакцию, вызванную связыванием

стимулирующей молекулы (например, комплекс TCR/CD3) с ее когнатным лигандом, тем самым опосредуя событие передачи сигнала, такое как, без ограничения указанным, передачи сигнала через комплекс TCR/CD3. Стимуляция может вызывать изменение экспрессии определенных молекул, например, отрицательную регуляцию TGF-В и/или реорганизацию цитоскелетных структур и т.п.

Термин «стимулирующая молекула», используемый в настоящем документе, относится к молекуле на Т-клетке, которая специфически связывается с когнатным стимулирующим лигандом, присутствующим на антигенпрезентирующей клетке.

Термин «стимулирующий лиганд», используемый в настоящем документе, относится к лиганду, который, будучи присутствующим на антигенпрезентирующей клетке (например, APC, дендритной клетке, В-клетке и т.п.), может специфически связываться с когнатным партнером по связыванию (называемого в данной заявке «стимулирующей молекулой») на Т-клетке, тем самым опосредуя первичный ответ Т-клетки, включая, без ограничения указанным, активацию, инициацию иммунного ответа, пролиферацию и т.п. Стимулирующие лиганды хорошо известны в данной области и включают, среди прочего, молекулу МНС класса I, нагруженную пептидом, анти-CD3-антитело, суперагонистическое анти-CD28-антитело и суперагонистическое анти-CD2-антитело.

«Активация» в контексте настоящего документа относится к состоянию Т-клетки, которая была достаточно стимулирована для индукции обнаруживаемой клеточной пролиферации. Активация также может быть связана с индуцированной продукцией цитокинов и детектируемыми эффекторными функциями. Термин «активированные Т-клетки» относится, без ограничения указанным, к Т-клеткам, которые подвергаются клеточному делению.

«Эффективное количество» или «терапевтически эффективное количество» относится к количеству клетки, композиции, состава или любого материала, как описано в данном документе, эффективному для достижения желаемого биологического результата. Такие результаты могут включать, без ограничения указанным, устранение В-клеток, экспрессирующих специфический В-клеточный рецептор (BCR), и антител, продуцируемых из них.

В настоящем документе «субъект» представляет собой млекопитающее, такое как человек или другое животное, и обычно представляет собой человека. В некоторых воплощениях субъект, например, пациент, которому вводят клетки, популяции клеток или композиции, является млекопитающим, обычно приматом, таким как человек. В некоторых воплощениях примат представляет собой обезьяну или человекообразную

обезьяну. Субъектом может быть мужчиной или женщиной и может быть любого подходящего возраста, включая младенцев, несовершеннолетних, подростков, взрослых и пожилых субъектов. В некоторых воплощениях пациентом является млекопитающее, не являющимся приматом, такое как грызун.

Используемый в данной заявке термин «лечение» (и его грамматические вариации, такие как «лечить» или «лечащий») относится к полному или частичному ослаблению или уменьшению заболевания или состояния или расстройства, или симптома, неблагоприятного эффекта или исхода, или связанного с этим фенотипа. Желательные эффекты лечения включают, без ограничения указанным, предотвращение возникновения или рецидива заболевания, ослабление симптомов, уменьшение любых прямых или косвенных патологических последствий заболевания, предотвращение метастазирования, уменьшение скорости прогрессирования заболевания, улучшение или смягчение болезненного состояния и ремиссию или улучшение прогноза. Термины не подразумевают полное излечение заболевания или полное устранение какого-либо симптома или воздействия на все симптомы или исходы.

«Предотвращение» при использовании в данной заявке, включает обеспечение профилактики в отношении возникновения или рецидива заболевания у пациента, который может быть предрасположен к заболеванию, но еще не был диагностирован как имеющий заболевание. В некоторых воплощениях предложенные клетки и композиции используются для задержки развития заболевания или замедления прогрессирования заболевания.

В настоящем документе «ингибировать» функцию или активность означает снижение функции или активности по сравнению с теми же условиями, за исключением интересующего состояния или параметра, или, альтернативно, по сравнению с другим состоянием. Например, клетки, которые ингибируют рост опухоли, снижают скорость роста опухоли по сравнению со скоростью роста опухоли в отсутствие клеток.

«Эффективное количество» агента, например, химерного антигенного рецептора, полинуклеотида, вектора, фармацевтического препарата, клеток или композиции, в контексте введения относится к количеству, эффективному при необходимых дозировках/количествах и в течение необходимых периодов времени, для достижения желаемого результата, такого как терапевтический или профилактический результат.

«Терапевтически эффективное количество» агента, например, фармацевтического состава или клеток, относится к количеству, эффективному в дозировках и в течение периодов времени, необходимых для достижения желаемого терапевтического результата, например, для лечения заболевания, состояния, или расстройства, и/или

фармакокинетического или фармакодинамического эффекта лечения. Терапевтически эффективное количество может варьировать в зависимости от таких факторов, как болезненное состояние, возраст, пол и масса пациента и популяции вводимых клеток. В некоторых воплощениях предложенные способы включают введение клеток и/или композиций в эффективных количествах, например, терапевтически эффективных количествах.

«Профилактически эффективное количество» относится к количеству, эффективному в дозировках и в течение периодов времени, необходимых для достижения желаемого профилактического результата. Обычно, но не обязательно, поскольку профилактическая доза применяется у субъектов до или на более ранней стадии заболевания, профилактически эффективное количество будет меньше, чем терапевтически эффективное количество. В контексте более низкой опухолевой нагрузки профилактически эффективное количество в некоторых аспектах будет выше, чем терапевтически эффективное количество.

II. Деграция белка-мишени (Target Protein Degradation, TPD)

В настоящем раскрытии предлагается новая система деграции белка-мишени, используемая для нацеливания на конкретный белок (т.е. белок-мишень) для блокирования его экспрессии (например, поверхностной экспрессии) и ускорения опосредованной убиквитинированием деграции посредством механизма деграции, ассоциированной с эндоплазматическим ретикуломом (ERAD).

ERAD относится к клеточному пути, который нацелен на неправильно свернутый белок в эндоплазматическом ретикулеуме для его убиквитинирования и последующего разрушения с помощью протеасомы. Процесс ERAD может включать три стадии: (1) идентификация неправильно свернутых или мутировавших белков в эндоплазматическом ретикулеуме; (2) обратный транспорт идентифицированных неправильно свернутых или мутировавших белков из эндоплазматического ретикулула в цитоплазму, при этом неправильно свернутые на концах белки должны быть транспортированы из эндоплазматического ретикулула обратно в цитоплазму, которая содержит систему убиквитин-протеасома (UPS); (3) использование протеасомы для деграции зависимым от убиквитинирования образом идентифицированных неправильно свернутых или мутировавших белков (см. Annamaria et al., ER-associated degradation: Protein quality control and beyond. *J. Cell Biol.* Vol. 204 No. 6 869–879).

В настоящем документе в настоящей заявке представлена новая химерная стратегия, которая сочетает нацеливающий домен (например, специфический фрагмент антитела, нацеленного на белок (ScFv)) с функциональным мотивом ERAD (например,

TMD и ED вирусных ЭПР-резидентных белков, домен сигнала возврата), и продемонстрировали, что эта стратегия может эффективно ингибировать экспрессию определенного белка (например, экспрессию определенных белков на поверхности клетки).

По сравнению с существующими технологиями деградации/удаления белков (например, PROTAC, CRISPR и т.п.), технологическая платформа ER-TPD, представленная в настоящей заявке, имеет следующие преимущества: 1. химерные белковые конструкции ER-TPD доставляются в клетку через вектор (например, липосому, наночастицу, лентивирус, аденовирус, онколитический вирус и т.п.) и стабильно экспрессируются для функционирования. и по сравнению с PROTAC отсутствует проблема низкой клеточной проницаемости и короткого периода полужизни, что приводит к низкой эффективности деградации; 2. технология ER-TPD, основанная на принципе ERAD эндоплазматического ретикула, напрямую вмешивается в синтез белка и достигает эффективной деградации в процессе синтеза и сборки белка в эндоплазматическом ретикулуме и, следовательно, имеет более высокую эффективность деградации, чем экзогенная технология PROTAC; 3. экзогенная PROTAC неэффективна для деградации мембранных белков и секретируемых белков, тогда как ER-TPD может напрямую нацеливаться на мембранные белки и секретируемые белки и достигать деградации во время синтеза и сборки белков эндоплазматического ретикула и, следовательно, может воздействовать на большое количество белков-мишеней, связанных с важными заболеваниями, которые не могут быть устранены с помощью традиционных технологий TPD, обеспечивая совершенно новый подход к разработке лекарственных средств для лечения заболеваний; 4. в способе проектирования ER-TPD нацеливающий домен может использовать различные структуры одноцепочечного антитела или структуры искусственного аффинного лиганда, что значительно улучшает способность специфического нацеливания и точного распознавания, а также связывающую способность белков; в то время как традиционные технологии PROTAC используют химическую структуру малых молекул, что затрудняет обеспечение специфичности нацеливающей структуры, поэтому технология ER-TPD имеет большие преимущества в обеспечении точности и специфичности; 5. Технология ER-TPD может реализовать механизм на основе множества путей деградации белка-мишени через структуру лиганда, направляющую деградацию в нисходящем направлении, включая механизм UPS, основанный на убиквитине и протеасоме, и механизме ALP аутофагальной лизосомы, где дизайн через структуру лиганда, направляющую деградацию в нисходящем направлении может гибко подключать систему деградации в клетке с помощью методов геной инженерии для достижения эффективной целенаправленной

деградации, в то время как традиционные технологии PROTAC могут приводить к деградации только путем нацеливания на лигазу E3; 6. Технология ER-TPD разрушает белки-мишени на уровне белков, и, по сравнению с технологиями, которые блокируют экспрессию белков-мишеней на уровне генов (такими как технологии CRISPR), у данной технологии отсутствуют токсичные побочные эффекты, такие как нестабильность хромосом, вызванная нецелевым действием или процессами редактирования генов; 7. технология ER-TPD прекрасно сочетается с технологиями лечения генов и клеток, значительно расширяя текущие клинические показания генной и клеточной терапии и усиливая клинический эффект; и 8. разработка лекарств направленной деградации на основе технологии ER-TPD вполне осуществима, а цикл короткий, при этом нуклеиновую кислоту на основе клеточных лекарственных средств технологии ER-TPD легче получить в крупномасштабном и промышленном производстве, что делает данную технологию важной базовой платформенной технологией для разработки новых лекарственных средств.

В одном аспекте в настоящем раскрытии предлагается химерная белковая конструкция технологии направленной деградации белков на основе эндоплазматического ретикула (ER-TPD), которая включает домен связывающий белок механизма деградации, ассоциированной с эндоплазматическим ретикулом (ЭПР) (ERAD), и нацеливающий домен.

В некоторых воплощениях химерная белковая конструкция дополнительно включает домен, связывающий участника пути деградации белков (например, участника пути убиквитин-протеасомной системы, участника эндосомно-лизосомного пути, участника пути аутофагии). Домен связывающий участника пути деградации белка может быть связан с составляющими элементами химерной белковой конструкции любым подходящим способом, например, с доменом, связывающим белок механизма ERAD.

В другом аспекте в настоящем раскрытии также предлагается библиотека композиций, где каждая композиция включает вирусный белок или молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую его, содержащую белок, способный блокировать механизм ERAD для остановки и ускорения опосредованной протеасомами деградации внутри ЭПР. Функциональные мотивы и аффинные фрагменты, которые нацелены на деградацию конкретных белков, используются в терапевтических целях для модификации клеточного фенотипа, улучшения клеточной функции или индукции апоптоза или ингибирования репликации вируса.

1. Домен, связывающий белок механизма ERAD

Термин «белок механизма ERAD», используемый в настоящем документе,

относится к белку, участвующему в механизме или пути ERAD. Термин «домен, связывающий белок механизма ERAD», также известный как «домен деградации ERAD», относится к части или домену, способному связывать и/или использовать белок механизма ERAD, например, трансмембранный домен (или его функциональный вариант) и цитоплазматический домен (или его функциональный вариант) вирусного гликопротеина, резидентного в эндоплазматическом ретикулуме (ЭПР), который также называют «доменом, резидентным в эндоплазматическом ретикулуме» или «ЭПР-резидентным доменом».

В некоторых воплощениях домен, связывающий белок механизма ERAD, содержит: трансмембранный домен вирусного белка, резидентного в эндоплазматическом ретикулуме, или его функциональный вариант и домен, резидентный в эндоплазматическом ретикулуме, или его функциональный вариант. В некоторых воплощениях вирусный гликопротеин, может представлять собой любой вирусный ЭПР-резидентный белок, способный перехватывать механизм ERAD и способствовать убиквитинированию и опосредованной протеасомами деградации белка-мишени.

1. Домен, связывающий белок механизма ERAD, полученный из E3-19K аденовируса

В некоторых воплощениях вирусный белок, резидентный в эндоплазматическом ретикулуме, представляет собой E3-19K аденовируса. E3-19K аденовируса (также известный как «E19») содержит три функциональных модуля: люминальный домен для взаимодействия с молекулами MHC-I и MICA/B, трансмембранный домен и домен резидентный в эндоплазматическом ретикулуме, где ЭПР-резидентный домен содержит дилизиновый мотив в цитоплазматическом хвосте, который помогает осуществлять возврат из аппарата Гольджи в ЭПР, который также может называться «сигнальным мотивом возврата в ЭПР». Исследования показали, что трансмембранный домен и сигнальный мотив возврата в ЭПР необходимы для обеспечения эффективной локализации в ЭПР, ингибирования транспорта комплекса гистосовместимости класса I (MHC-I) и MHC-I-ассоциированных цепей A и B (молекулы MICA/B) и протеосомной деградации. Таким образом, E3-19K аденовируса может локализоваться с молекулами MHC класса I (например, молекулами MHC-I и MICA/B) на секреторном пути и препятствовать презентации антигена. В химерной белковой конструкции, предлагаемой в настоящем раскрытии, используется трансмембранный домен и домен, резидентный в эндоплазматическом ретикулуме (т.е. домен деградации ERAD) E3-19K аденовируса для объединения с нацеливающим белок-связывающим доменом, тем самым реализуя цель деградации белка-мишени.

В некоторых предпочтительных воплощениях домен деградации ERAD E3-19K аденовируса включает аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO. 60, предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, и еще более предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 98%, или 99% и более. Домен деградации EARD из E3-19K аденовируса имеет дилизиновый мотив в цитоплазматическом хвосте, способный осуществлять возврат из аппарата Гольджи в эндоплазматический ретикулум. В некоторых предпочтительных воплощениях аминокислотная последовательность домена деградации ERAD из E3-19K аденовируса показана в SEQ ID NO. 60.

ii. Домены, связывающие белок механизма ERAD, полученные из других вирусных гликопротеинов

В некоторых воплощениях вирусный белок, резидентный в эндоплазматическом ретикулуме, не является E3-19K аденовируса.

В некоторых воплощениях вирусный белок, резидентный в эндоплазматическом ретикулуме, выбран по меньшей мере из одного из группы, состоящей из: гликопротеина US2, US11, US3, US10, US6 из HCMV, ICP47 HSV, CPXV12, UL49.5 BHV, BNFL2a EBV, UL16, UL141, UL142 из HCMV, Nef HIV, Vpu HIV, U21 HHV-7, KK3 HHV-8, KK5 HHV-8, MK3 MHV-68, p12 HTLV-1 и белка CPXV203 вируса коровьей оспы. В некоторых воплощениях вирусный белок, резидентный в эндоплазматическом ретикулуме, включает гликопротеины US2 и US11 из HCMV.

В некоторых воплощениях вирусный белок, резидентный в эндоплазматическом ретикулуме включает E3-19K и выбран по меньшей мере из одного из группы, состоящей из: гликопротеина US2, US11, US3, US10, US6 из HCMV, ICP47 HSV, CPXV12, UL49.5 BHV, BNFL2a EBV, UL16, UL141, UL142 из HCMV, Nef HIV, Vpu HIV, U21 HHV-7, KK3 HHV-8, KK5 HHV-8, MK3 MHV-68, p12 HTLV-1 и белка CPXV203 вируса коровьей оспы.

Белок Vpu вируса HIV-1 представляет собой белок на мембране ЭПР и нацелен на вновь созданный CD4 в эндоплазматическом ретикулуме для деградации протеасомой в цитоплазме. Белок Vpu удерживает CD4 в ЭПР главным образом посредством SCF β -TrCP-зависимого убиквитинирования и взаимодействий трансмембранного домена (TMD).

а) US2 и US11 из HCMV

Оба белка US2 и US11 из HCMV представляют собой ЭПР-резидентные интегральные мембранные гликопротеины типа I, которые совместно используют этот путь ERAD, чтобы способствовать деградации тяжелых цепей MHC класса I, тем самым

ингибируя презентацию антигена МНС класса I. Экспрессия любого белка приводит к быстрой деградации вновь синтезированных тяжелых цепей МНС класса I. US2 и US11 связываются с тяжелыми цепями МНС класса I через свои просветные домены и рекрутируют белки клетки-хозяина, которые экстрагируют полипептиды из мембраны эндоплазматического ретикула путем «вытягивания» цитоплазматических хвостов тяжелых цепей. После транслокации в цитоплазму молекулы МНС класса I убиквитинируются и разрушаются протеасомой.

Помимо молекул класса I, US2 также приводит к деградации двух белков пути класса II, DR- α и DM- α , а также HFE, неканонического белка главного комплекса гистосовместимости (МНС) класса I, участвующего в регулировании железа.

Люминальный домен US2 отвечает за связывание молекул МНС класса I и II, трансмембранный домен (TM) и цитоплазматический домен (CT) взаимодействуют с клеточными компонентами механизмов или путей ERAD и способствуют транслокации и стимулированию ферментализации обоих белков МНС обоих классов I и II (Chevalier M S et al., 2002, 2003). Цитоплазматического хвоста US2 достаточно для взаимодействия с сигнальной пептидазой (SPP), важным компонентом US2-зависимого дислокационного комплекса МНС I (Loureiro J et al., 2006), который необходим для US2-зависимой транслокации тяжелой цепи МНС (см. Joana et al., Signal peptide peptidase is required for dislocation from the endoplasmic reticulum. Nature volume 441, pages 894–897 (2006)). Кроме того, US2 взаимодействует с резидентной в эндоплазматическом ретикулуме лигазой E3 RING-типа TRC8 через свой домен TM, что также способствует убиквитинированию и протеасомной деградации молекул МНС I и II, заякоренных в хвосте US2 (Stagg HR et al., 2009).

Напротив, для деградации молекул МНС-I, вызванной US11, требуется Derlin-1, а не SPP. Люминальный домен ER US11 взаимодействует с люминальным доменом тяжелой цепи МНС-I, тогда как домен TM US11 связывает Derlin-1. Следовательно, основная функция US11 может заключаться в доставке молекул МНС-I к Derlin-1 (Lilley B N et al., 2004; Cho S et al., 2013), а затем в индукции их транслокации в цитозоль для протеасомной деградации. Более того, US11 активирует развернутые белки. Через Derlin-1 US11 связывается с TMEM129 в качестве лигазы ERAD RING E3 и привлекает Ube2J2 для убиквитинирования МНС-I перед деградацией, индуцированной US11.

В некоторых предпочтительных воплощениях домен деградации ERAD из гликопротеина US2 HCMV аденовируса включает аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO. 48, предпочтительно аминокислотную последовательность,

которая имеет идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, и более предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 98%, или 99% или более и имеет резидентную функцию в эндоплазматическом ретикулуме. В некоторых воплощениях аминокислотная последовательность домена деградации ERAD из гликопротеина US2 HCMV показана в SEQ ID NO. 48.

В некоторых предпочтительных воплощениях домен деградации ERAD из US2 включает аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 80% или более аминокислотной последовательности, показанной в SEQ ID NO. 76, предпочтительно аминокислотную последовательность, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, и более предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 98%, или 99% или более и имеет резидентную функцию в эндоплазматическом ретикулуме. В некоторых воплощениях аминокислотная последовательность домена деградации ERAD из US2 показана в SEQ ID NO. 76.

В некоторых предпочтительных воплощениях домен деградации ERAD гликопротеина US11 HCMV включает аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO. 54, предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, и более предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 98%, или 99% или более и имеет резидентную функцию в эндоплазматическом ретикулуме. В некоторых воплощениях аминокислотная последовательность домена деградации ERAD гликопротеина US11 HCMV показана в SEQ ID NO. 54.

В некоторых предпочтительных воплощениях домен деградации ERAD из US11 включает аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO. 82, предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, и более предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 98%, или 99% или более и имеет резидентную функцию в эндоплазматическом ретикулуме. В некоторых воплощениях аминокислотная последовательность домена деградации ERAD из US11 показана в SEQ ID NO. 82.

b) US3 HCMV

Вместо того, чтобы способствовать деградации белков МНС, гликопротеин US3 HCMV физически связывается с гетеродимерами МНС класса I, которые нагружены пептидами, что приводит к удержанию комплексов класса I в ЭПР и ингибированию

связывания инвариантных цепей с DR- $\alpha\beta$ -димерами класса II в ЭПР, что приводит к неправильной локализации комплексов класса II и снижению нагрузки пептидами. Следовательно, US3 способен препятствовать внутриклеточному транспорту и созреванию молекул МНС класса I на ранних стадиях инфекции HCMV. US3 представляет собой мембранный белок эндоплазматического ретикулула. Эксперименты по замене доменов показали, что люминального домена US3 достаточно для того, чтобы US3 сохранялся в ЭПР сам по себе, тогда как люминальный, так и трансмембранный домены необходимы для удержания молекул МНС класса I в ЭПР.

В некоторых предпочтительных воплощениях домен деградации ERAD гликопротеина US3 HCMV включает аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO. 51, предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, и более предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 98%, или 99% или более и имеет резидентную функцию в эндоплазматическом ретикулуле. В некоторых воплощениях аминокислотная последовательность домена деградации ERAD гликопротеина US3 HCMV показана в SEQ ID NO. 51.

В некоторых предпочтительных воплощениях домен деградации ERAD из US3 включает аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO. 79, предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, и более предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 98%, или 99% или более и имеет резидентную функцию в эндоплазматическом ретикулуле. В некоторых воплощениях аминокислотная последовательность домена деградации ERAD из US3 показана в SEQ ID NO. 79.

с) US10 HCMV

Гликопротеин US10 HCMV также взаимодействует с компонентами антигенной презентации МНС класса I. US10 связывает свободные тяжелые цепи класса I и задерживает их транспорт из ЭПР. Однако US10 не влияет на US2 или US11.

В некоторых предпочтительных воплощениях домен деградации ERAD гликопротеина US10 HCMV включает аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO. 57, предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, и более

предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 98%, или 99% или более и имеет резидентную функцию в эндоплазматическом ретикулуме. В некоторых воплощениях аминокислотная последовательность домена деградации ERAD гликопротеина US10 HCMV показана в SEQ ID NO. 57.

d) US6 HCMV, ICP47 HSV, CPXV012, BNFL2a EBV, UL49.5 BHV

Неидентичный с US2, US3, US10 и US11, белок US6 HCMV L влияет на презентацию антигена посредством совершенно другой стратегии. В отличие от взаимодействия со свободными тяжелыми цепями класса I или полностью собранными комплексами класса I, US6 ингибирует транслокацию цитозольных пептидов через комплекс TAP (TAP1/2). US6 связывается с TAP1 со стороны просвета ЭПР и вызывает конформационные изменения, которые предотвращают связывание АТФ. Остатки 89–108 в домене US6, выходящем в просвет ЭПР, способствуют связыванию US6 с TAP и одновременно необходимы и достаточны для этого ингибирования. Это ингибирование активности TAP влияет не только на экспрессию классических аллелей MHC класса I, но также на экспрессию неклассических аллелей HLA-C и HLA-G в фетальных цитотрофобластах.

Действуя как белок US6 HCMV, ICP47 HSV экспрессируется на ранних стадиях инфекционного цикла и не требуется для репликации *in vitro*, и та же стратегия может быть применена для предотвращения молекулярного компонента класса I. ICP47 блокирует TAP-опосредованный транспорт пептидов и прочно связывается с комплексом TAP1-TAP2. Ключом к разгадке механизма, с помощью которого ICP47 блокирует TAP, является то, что этот белок проявляет высокую видовую избирательность. Как ICP47 HSV1, так и ICP47 HSV2 ингибируют TAP у обезьяноподобных, обезьян, свиней, собак и коров и мало влияют на TAP у мышей, крыс, морских свинок или кроликов. ICP47 имеет примерно в 100 раз более высокую аффинность к TAP человека, чем к TAP мыши. ICP47 ингибирует связывание пептида с TAP, но не влияет на связывание АТФ. ICP47 имеет в 10–1000 раз более высокую аффинность к TAP, чем большинство пептидов, действует как конкурентный ингибитор связывания пептида с TAP и, как полагают, связывается непосредственно с сайтом связывания пептида.

В некоторых предпочтительных воплощениях TAP-связывающий домен US6 HHV-7 включает аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO. 65, предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, и более предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 98%, или 99% или более и имеет

резидентную функцию в эндоплазматическом ретикулуме. В некоторых воплощениях аминокислотная последовательность ТАР-связывающего домена US6 HHV-7 показана в SEQ ID NO. 65.

В некоторых предпочтительных воплощениях ТАР-связывающий домен ICP47 HSV включает аминокислотную последовательность, которая на 80% или более идентична аминокислотной последовательности, показанной в SEQ ID NO. 67, предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, и более предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 98%, или 99% или более и имеет резидентную функцию в эндоплазматическом ретикулуме. В некоторых воплощениях аминокислотная последовательность ТАР-связывающего домена ICP47 HSV показана в SEQ ID NO. 67.

В некоторых предпочтительных воплощениях ТАР-связывающий домен CPXV012 включает аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO. 69, предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, и более предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 98%, или 99% или более и имеет резидентную функцию в эндоплазматическом ретикулуме. В некоторых воплощениях аминокислотная последовательность ТАР-связывающего домена CPXV012 показана в SEQ ID NO. 69.

В некоторых предпочтительных воплощениях полноразмерная последовательность CPXV012 включает аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO. 68, предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, и более предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 98%, или 99% и более; а аминокислотная последовательность полноразмерной последовательности CPXV012 показана как SEQ ID NO. 68.

В некоторых предпочтительных воплощениях ТАР-связывающий домен BNFL2a EBV включает аминокислотную последовательность, которая на 80% или более идентична аминокислотной последовательности, показанной в SEQ ID NO. 71, предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, и более предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 98%, или 99% или более и имеет

резидентную функцию в эндоплазматическом ретикулуме. В некоторых воплощениях аминокислотная последовательность ТАР-связывающего домена BNFL2a EBV показана в SEQ ID NO. 71.

В некоторых предпочтительных воплощениях полноразмерная последовательность BNFL2a EBV включает аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO. 70, предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, и более предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 98%, или 99% и более; а аминокислотная последовательность полноразмерной последовательности BNFL2a EBV показана как SEQ ID NO. 70.

В некоторых предпочтительных воплощениях ТАР-связывающий домен UL49.5 BHV включает аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO. 73, предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, и более предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 98%, или 99% или более и имеет резидентную функцию в эндоплазматическом ретикулуме. В некоторых воплощениях аминокислотная последовательность ТАР-связывающего домена UL49.5 BHV показана в SEQ ID NO. 73.

В некоторых предпочтительных воплощениях полноразмерная последовательность UL49.5 BHV включает аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO. 72, предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, и более предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 98%, или 99% и более; а аминокислотная последовательность полноразмерной последовательности BHV UL49.5 показана как SEQ ID NO. 72.

е) Другие

В некоторых предпочтительных воплощениях домен деградации ERAD из US21 HHV-7 включает аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO. 63, предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, и более предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 98%, или 99% или более и имеет

резидентную функцию в эндоплазматическом ретикулуме. В некоторых воплощениях аминокислотная последовательность домена деградации ERAD из US21 HHV-7 показана в SEQ ID NO. 63.

В некоторых предпочтительных воплощениях полноразмерная последовательность US21 HHV-7 включает аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO. 61, предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, и более предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 98%, или 99% и более; а аминокислотная последовательность полноразмерной последовательности US21 HHV-7 показана как SEQ ID NO. 61.

В некоторых предпочтительных воплощениях домен деградации ERAD из UL16 HCMV включает аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO. 85, предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, и более предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 98%, или 99% или более и имеет резидентную функцию в эндоплазматическом ретикулуме. В некоторых воплощениях аминокислотная последовательность домена деградации ERAD из UL16 HCMV показана в SEQ ID NO. 85.

В некоторых предпочтительных воплощениях полноразмерная последовательность UL16 HCMV включает аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO. 83, предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, и более предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 98%, или 99% и более; а аминокислотная последовательность полноразмерной последовательности UL16 HCMV показана как SEQ ID NO. 83.

В некоторых предпочтительных воплощениях домен деградации ERAD из UL141 HCMV включает аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO. 88, предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, и более предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 98%, или 99% или более и имеет резидентную функцию в эндоплазматическом ретикулуме. В некоторых воплощениях

аминокислотная последовательность домена деградации ERAD из UL141 HCMV показана в SEQ ID NO. 88.

В некоторых предпочтительных воплощениях полноразмерная последовательность UL141 HCMV включает аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO. 86, предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, и более предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 98%, или 99% и более; и аминокислотная последовательность полноразмерной последовательности UL141 HCMV показана как SEQ ID NO. 86.

В некоторых предпочтительных воплощениях резидентный в Гольджи домен UL142 HCMV включает аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO. 91, предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, и более предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 98%, или 99% или более и имеет резидентную функцию в эндоплазматическом ретикулуме. В некоторых воплощениях аминокислотная последовательность резидентного в Гольджи домена UL142 HCMV показана в SEQ ID NO. 91.

В некоторых предпочтительных воплощениях Nef HIV включает аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO. 92, предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, и более предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 98%, или 99% или более и имеет резидентную функцию в эндоплазматическом ретикулуме. В некоторых воплощениях аминокислотная последовательность Nef HIV показана в SEQ ID NO. 92.

В некоторых предпочтительных воплощениях полноразмерная последовательность UL142 HCMV включает аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO. 89, предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, и более предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 98%, или 99% и более; а аминокислотная последовательность полноразмерной последовательности UL142 HCMV показана как SEQ ID NO. 89.

В некоторых предпочтительных воплощениях Vpr HIV включает аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 93, предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, и более предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 98%, или 99% или более и имеет резидентную функцию в эндоплазматическом ретикулуме. В некоторых воплощениях аминокислотная последовательность Vpr HIV показана в SEQ ID NO. 93.

В некоторых предпочтительных воплощениях HHV-8 KK3 включает аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO. 94, предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, и более предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 98%, или 99% или более и имеет резидентную функцию в эндоплазматическом ретикулуме. В некоторых воплощениях аминокислотная последовательность KK5 HHV-8 показана в SEQ ID NO. 94.

В некоторых предпочтительных воплощениях KK5 HHV-8 включает аминокислотную последовательность, которая на 80% или более идентична аминокислотной последовательности, показанной в SEQ ID NO. 95, предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, и более предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 98%, или 99% или более и имеет резидентную функцию в эндоплазматическом ретикулуме. В некоторых воплощениях аминокислотная последовательность KK5 HHV-8 показана в SEQ ID NO. 95.

В некоторых предпочтительных воплощениях MK3 MHV-68 включает аминокислотную последовательность, которая на 80% или более идентична аминокислотной последовательности, показанной в SEQ ID NO. 96, предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, и более предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 98%, или 99% или более и имеет резидентную функцию в эндоплазматическом ретикулуме. В некоторых воплощениях аминокислотная последовательность MK3 MHV-68 показана в SEQ ID NO. 96.

В некоторых предпочтительных воплощениях p12 HTLV-1 включает аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO. 97, предпочтительно

аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, и более предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 98%, или 99% или более и имеет резидентную функцию в эндоплазматическом ретикулуле. В некоторых воплощениях аминокислотная последовательность p12 HTLV-1 показана в SEQ ID NO. 97.

В некоторых предпочтительных воплощениях KDEL рецептор-связывающий домен белка CPXV203 вируса осповакцины включает аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO. 100, предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, и более предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 98%, или 99% или более и имеет резидентную функцию в эндоплазматическом ретикулуле. В некоторых воплощениях аминокислотная последовательность KDEL рецептор-связывающего домена белка CPXV203 вируса осповакцины показана в SEQ ID NO. 100.

В некоторых предпочтительных воплощениях KDEL рецептор-связывающий домен белка CPXV203 вируса осповакцины включает аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO. 103, предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, и более предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 98%, или 99% или более и имеет резидентную функцию в эндоплазматическом ретикулуле. В некоторых воплощениях аминокислотная последовательность KDEL рецептор-связывающего домена белка CPXV203 вируса осповакцины показана в SEQ ID NO. 103.

В некоторых предпочтительных воплощениях полноразмерная последовательность белка CPXV203 вируса осповакцины включает аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO. 98, предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, и более предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 98%, или 99% и более; а аминокислотная последовательность полноразмерной последовательности белка CPXV203 вируса осповакцины показана как SEQ ID NO. 98.

В некоторых предпочтительных воплощениях полноразмерная последовательность белка CPXV203 вируса осповакцины включает аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO. 101, предпочтительно аминокислотную последовательность,

которая имеет идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, и более предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 98%, или 99% и более; а аминокислотная последовательность полноразмерной последовательности белка CPXV203 вируса коровьей оспы показана как SEQ ID NO. 101.

2. Мишень-связывающий домен

Мишень-связывающий домен химерных белковых конструкций, представленных в настоящем раскрытии, может представлять собой любую структуру, которая распознает и связывает белок-мишень, например, антитела, фрагменты антител, функциональные мотивы, полученные из природных белков (например, природных лигандов), искусственно синтезированные полипептиды или белки, обладающие аффинностью к белку-мишени, или различные варианты, такие как мутанты, объединения и укорочения вышеупомянутых молекул. Например, нацеливающий домен может представлять собой природный лиганд белка-мишени, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически распознает белок-мишень, или антиген, который может специфически распознаваться антителом.

В некоторых воплощениях домен, связывающий мишень, включает антитело или его функциональный фрагмент для специфичного целевого связывания с белком-мишенью, например, диатела, Fab, Fab', F(ab')₂, Fd, фрагменты Fv, дисульфид-стабилизированные фрагменты Fv (dsFv), (dsFv)₂, биспецифические dsFv (dsFv-dsFv'), диатела, стабилизированные дисульфидной связью (ds диатела), молекулы одноцепочечных антител (scFv), димеры scFv (бивалентные диатела), Fv(scFv), мультиспецифические антитела (например, биспецифические антитела), камелизированные однодоменные антитела (например, V_{HH}), нанотела, доменные антитела, двухвалентные доменные антитела, диатела, триатела и четверные антитела. Домен белка, связывающего мишень, может также включать любые связывающие лиганды, способные связывать белки-мишени, включая, без ограничения указанным, лиганд, часть связывания лиганда в рецепторе, часть связывания белка-хозяина в вирусном белке и т.д.

Белком-мишенью может быть любой белок, уровень или активность которого, как ожидается, будет модулироваться, например, изменяться активность посредством механизма ERAD для блокирования белков в ЭПР и ускорения деградации, опосредованной протеасомами, что может изменить фенотип клетки и улучшить клеточную функцию, вызывая апоптоз клеток и/или ингибируя репликацию вируса и т.д., чтобы достичь терапевтических целей (например, улучшить терапевтический эффект, уменьшить побочные эффекты и т.п.). В некоторых воплощениях белок-мишень может

представлять собой белок, участвующий в клеточном цикле, апоптозе, передаче сигнала, дифференцировке клеток, дедифференцировке клеток, росте клеток, продуцировании цитокинов или их биорегуляторов, продуцировании цитокинов или биорегуляторов, продуцировании регуляторного или функционального белка, или белок, участвующий в путях провоспалительной передачи сигналов или регуляции глюкозы.

В другом воплощении белок-мишень представляет собой ассоциированный с заболеванием белок (также называемый «патогенным белком»), описанные в данной заявке «белок, ассоциированный с заболеванием» или «патогенный белок», относятся к белку, любое изменение в функции или активности которого приведет к возникновению заболевания или какая функция является более важной для развития заболевания, примерный патогенный белок включает, без ограничения указанным, онкогенный белок, вирусный белок, белок аутоиммунного заболевания (например, антитела, продуцируемые плазматическими клетками).

В некоторых воплощениях белок-мишень выбран из группы, состоящей из: белков-мишеней, связанных с иммунной функцией, белков-мишеней, связанных с неврологическими заболеваниями, белков-мишеней, связанных с инфекционными заболеваниями (например, белков-мишеней, связанных с вирусной инфекцией), белков-мишеней, связанных с аутоантигеном, или белков-мишеней, связанных с опухолью (или онкогенными белками), белков-мишеней, связанных с метаболическими заболеваниями.

В некоторых воплощениях патогенный белок представляет собой онкогенный белок. Онкогенный белок может кодироваться онкогеном, включая, без ограничения указанным, BCL-2, c-MYC, Ras, HER2, BCR/ABL, ABL1/BCR, TGFB1, TLX1, P53, WNT1, WNT2, WT1, αv - $\beta 3$., PKCa, ABL, BCL1, CD24, CDK4, EGFR/ERBB-1, HSTF1, INT1/WNT1, INT2, MDM2, MET, MYB, MYC, MYCN, MYCL1, RAF1, NRAS, REL, AKT2, APC, BCL2-ALPHA, BCL2-BETA, BCL3, BCR, BRCA1, BRCA2, CBL, CCND1, CDKN1A, CDKN1C, CDKN2A, CDKN2B, CRK, CRK-II, CSF1R/FMS, DBL, DDOST, PMS-2, PRAD-1, RAF, RHOM-1, RHOM-2, SIS, TAL2, TANI, TIAM1, TSC2, TRK, TSC1, STK11, PTCH, MEN1, MEN2, P57/KIP2, PTEN, HPC1, ATM, XPA/XPG, BCL6, DEK, AKAP13, CDH1, BLM, EWSR1/FLI1, FES, FGF3, FER, FGR, FLI1/ERGB2, FOS, FPS/FES, FRA1, FRA2, FYN, HCK, HEK, HER3/ERBB-2, ERBB-3, HER4/ERBB-4, HST2, INK4A, INK4B, JUN, JUNB, JUND, KIP2, KIT, KRAS2A, KRAS2B, LCK, LYN, MAS, MAX, MCC, MLH1, MOS, MSH2, MYBA, MYBB, NF1, NF2, P53, PDGFB, PIM1, PTC, RBI, RET, ROS1, SKI, SRC1, TALI, TGFB2, THRA1, THRB, TIAM1, TRK, VAV, VHL, WAF1, WNT2, WT1, YES1, ALK/NPM1, AMI1, AXL, FMS, GIP, GLI, GSP, HOX11, HST, IL3, INT2, KS3, K-SAM, LBC, DCC, DPC4/SMAD4, E-CAD, E2F1/RBAP, ELK1, ELK3, EPH, EPHA1, E2F1, EPHA3, ERG, ETS1,

ETS2, LMO-1, LMO-2, L-MYC, LYL1, LYT-10, MDM-2, MLH1, MLL, MLM, N-MYC, OST, PAX-5, PMS-1, FGF4, FGF6, FANCA, FLI1/ERGB2, FOSL1, FOSL2, GLI, HRAS1, HRX/MLLT1, HRX/MLLT2, KRAS2, MADH4, MASI, MCF2, MLLT1/MLL, MLLT2/HRX, MTG8/RUNX1, MYCLK1, MYH11/CBFB, NFKB2, NOTCH1, NPM1/ALK, NRG/REL, NTRK1, PBX1/TCF3, PML/ RARA, PRCA1, RUNX1, RUNX1/CBFA2T1, SET, SHP2, TCF3/PBX1, TNF α , кластерин, сурвивин, TOE β , c-fos, c-SRC и INT-1. В некоторых воплощениях онкогенный белок может быть представителем семейства Bcl-2 (например, Bcl-2, Bcl-xL и Bcl-w), VEGF/VEGFR, PDGFR β , EGFR, мутантов EGFR, IGF-1R, HDAC, HER2, MYC, KRAS, AFP, CEA, CA199, рецептором эстрогена ER- α , рецептором андрогена (AR), тирозинкиназой (c-ABL, BCR-ABL, BTK, FAK, PTK6, Wee1, трансмембранным рецептором TRK), рецепторной серин/треонинкиназы (IRAK4, LRRK2, B-Raf, RIPK2, CDK4/6, CDK7, CDK8, CDK8/19, CDK9, TBK1), протеинкиназы II (CK2), эпигенетически родственных белков (BRD2, BRD3, BRD4, BRDT, TRIM24, BRD9, PBRM1, SMARCA2, SMARCA4, EP300, EZH2, WDR5), медуллярного гормона надпочечников (ADM) и DPP3.

В некоторых воплощениях белок-мишень включает белок, связанный с иммунной функцией. Термин «белок, связанный с иммунной функцией», используемый в настоящем документе, относится к функциональному белку, участвующему в иммунном процессе организма, например, к антигенпрезентирующей молекуле (например, молекуле МНС класса I, молекуле МНС класса II, HLA и т.п.), молекуле распознавания антигена (например, TCR, CD123, NKG2D и т.п.), молекуле иммунной контрольной точки (например, PD-1, PD-L1, CTLA4, TIM3, TIGIT, LAG3, A2AR, BTLA, IDO1, IDO2, TDO, KIR, NOX2, VISTA, SIGLEC7, PVR и т.п.), иммуностимулирующей/костимулирующей молекуле (например, CD3, CD80/86, CD28 и т.п.) и другим молекулам, участвующим во врожденном или адаптивном иммунитете. В некоторых воплощениях белки-мишени, связанные с иммунной функцией, включают, например, CD123, CD7, CD5, молекулы МНС класса I, молекулы МНС класса II, неклассические молекулы МНС (например, HLA-G, HLA-E), MICA/B, ULBP1-6, IL6, рецептор IL6, рецептор IL1, RANKL, TGF- β 1, PD1, PD-L1, CTLA4, Tim3, LAG3, Siglec-15, TIGIT, CD47, IL4RA, CD94/NKG2A, CXCR1/2, CXCL8, CCR2/CCR5, CCR4, CXCR4, c-Rel, CCL2, CCL5, CCL20, CCL22, CSF-1, CCL2, CCL2, CCL5 индоламин-2,3-диоксигеназы (IDO) или аргиназы 1 (ARG1).

В некоторых воплощениях белок-мишень включает белок-мишень, связанный с неврологическими заболеваниями. Используемый в данной заявке термин «заболевания нервной системы» относится к белку, участвующему в неврологических заболеваниях, особенно к белку, вызывающему нейродегенеративные заболевания. В некоторых воплощениях белок-мишень, связанный с неврологическим заболеванием, включает,

например, тау, β -амилоид ($A\beta$), α -синуклеин, мутантный хантингтин (mHTT), α -синуклеин, РНК-связывающий белок TAR (TARDBP) и FUS РНК-связывающий белок (FUS).

В некоторых воплощениях белок-мишень включает белок-мишень, связанный с вирусной инфекцией. Белок-мишень, связанный с вирусной инфекцией, включает, например, белок X, кодируемый HBV (HBx), ДНК-полимеразу HBV, капсидный гликопротеин HBV, обратную транскриптазу HIV-1, gp120 HIV, протеазу NS3-4A HCV, РНК-полимеразу HCV, оболочечный белок HCV, ДНК-полимеразу EBV, EBNA1 EBV, РНК-синтетазу коронавируса, шиповидный белок коронавируса, белок оболочки коронавируса, мембранный белок коронавируса, белок нуклеокапсида коронавируса, РНК-зависимую РНК-полимеразу (RdRp), такую как новая РНК-зависимая РНК-полимераза коронавируса, ДНК- и РНК-полимеразу герпесвирусов, капсидный гликопротеин вируса герпеса, ДНК-полимеразу CMV, капсидный гликопротеин CMV, белок оболочки RSV, капсидный белок RSV, РНК-полимеразу RSV, РНК-полимеразу вируса гриппа, белок оболочки вируса гриппа, ДНК-полимеразу HPV или капсидный белок HPV. В другом воплощении белок-мишень представляет собой вирусный белок, например, поверхностный антиген HBV, HBeAg, белок полимеразы HBV, белок Gag HIV, белок Env HIV и т.д., функция которого считается важной для амплификации и функционирования репликации вируса, и прогрессирование вирусных заболеваний.

В некоторых воплощениях белок-мишень включает аутоантиген-ассоциированный белок. В данной области известно множество аутоантигенов, связанных с аутоиммунными заболеваниями. Например, существуют: аутоантиген, связанный с диабетом 1 типа, например, антиген островковых клеток (ICA), инсулин (IAA), декарбоксилаза глутаминовой кислоты 65 (GAD65), антиген инсулиномы-2 (IA-2); аутоантиген, связанный с ревматоидным артритом (RA), например, цитруллинированный белок/пептидное антитело, гетерорибонуклеопротеин (гетерогенный ядерный рибонуклеопротеин A2/B1), альдолаза, альфа-енолаза, кальретикулин, термоактивируемый белок (HSP60), BiP, PGK1, стресс-индуцированный фосфопротеин 1, FUSE-BP1/2; аутоантиген, ассоциированный с системной красной волчанкой (SLE), например, дезоксирибонуклеопротеин, SmD1, SmD3, Clq, воспалительный антикоагулянт (LA), кардиолипид (CL), β 2-гликопротеин I (β 2 GPI), протромбин (PT) и фосфатидилсерин (PS); аутоантиген, связанный с системным склерозом (SSc)/склеродермией (SD), например, Scl-70, SSA, Ro52; антиген, связанный с аутоиммунными заболеваниями печени, например, митохондриальный антиген, Spl00, PML, gp210, p62; аутоантиген, связанный с тяжелой миастенией, например, рецептор ацетилхолина; аутоантиген, связанный с аутоиммунным заболеванием центральной

нервной системы (лимбический энцефалит, энцефаломиелит, мозжечковая атаксия), например, комплекс потенциалзависимых калиевых каналов (VGKC), рецептор потенциалзависимых кальциевых каналов, рецептор α -амино-3-гидрокси-5-метилизоксазол-4-пропионовой кислоты (AMPA), рецепторы γ -аминомасляной кислоты-B (GABA_B), глициновые рецепторы; аутоантиген, связанный с рассеянным склерозом, например, основной белок миелина (MBP), гликопротеин миелиновых олигодендроцитов (MOG); аутоантиген, связанный с полимиозитом (PM) и миозитом (DM), например, Jo-1, Mi-2, PM-Scl, Ro-52; аутоантиген, связанный с глютен-чувствительной энтеропатией, например, эндомизиальное антитело (EMA), тканевая трансглутаминаза (tTG); аутоантиген, связанный с энцефалитом с анти-NMDAR антителом, например, рецептор N-метил-D-аспартата; аутоантиген, связанный с оптикомиелитом (NMO), например, аквапорин 4 (AQP4); и аутоантиген, связанный с репродукцией, например, антиген яичников, антиген сперматозоидов.

В некоторых воплощениях патогенный белок представляет собой белок-мишень, связанный с метаболическими заболеваниями. Белок-мишень, связанный с метаболическими заболеваниями, включает, например: белок-мишень атеросклероза, AS, включая, без ограничения указанным, CD36, рецептор липопротеинов низкой плотности (LDLR), ChemR23 (CMKLR1), митохондриальную дегидрогеназу (митохондриальную дегидрогеназу) ALDH4A1 (белок-мишень); белки-мишени диабета 2 типа, включая, без ограничения указанным, RalGAP α 1, дипептидилпептидазу IV (DPP4); Белки-мишени для неалкогольной жировой болезни печени, включая, без ограничения указанным, TMEM16A, VAMP3; белки-мишени для метаболизма глюкозы в опухоли, включая, без ограничения указанным, гексокиназу (HK), транспортер глюкозы 1 (GLUT1), транспортер глюкозы 4 (GLUT4), фосфоглицератдегидрогеназу, лактатдегидрогеназу; белки-мишени для метаболизма липидов опухоли, включая, без ограничения указанным, АТФ-цитратлиазу (ACLY), синтазу жирных кислот (FASN) и ацетил-КоА-ацетилтрансферазу 1 (ACAT1).

В некоторых воплощениях домен, связывающий мишень, специфически нацелен на другие белки-мишени в дополнение к следующим белкам-мишеням: TCR, HLA-I, MICA и MICB; и вирусный белок, резидентный в эндоплазматическом ретикулуме представляет собой любой вирусный белок, резидентный в эндоплазматическом ретикулуме, описанный в настоящем раскрытии.

В некоторых воплощениях домен, связывающий мишень, специфически нацелен по меньшей мере на два из следующих белков-мишеней: TCR, HLA-I, MICA, MICB; и вирусный белок, резидентный в эндоплазматическом ретикулуме представляет собой

любой вирусный белок, резидентный в эндоплазматическом ретикулуме, описанный в настоящем раскрытии.

В некоторых воплощениях домен, связывающий мишень, специфически нацелен на TCR, HLA-I, MICA или MICB, а вирусный белок, резидентный в эндоплазматическом ретикулуме не является E3-K19 аденовируса.

В некоторых воплощениях домен, связывающий мишень, химерной белковой конструкции соединен с доменом, связывающим белок механизма ERAD через шарнир или линкер. В некоторых воплощениях шарнир включает аминокислотную последовательность, указанную SEQ ID NO.123 (шарнир IgG4) или SEQ ID NO.133 (((Gly4Ser)₂).

В некоторых предпочтительных воплощениях HLA-связывающий домен гликопротеина US2 HCMV включает аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO. 47, предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, и более предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 98%, или 99% и более; а аминокислотная последовательность HLA-связывающего домена гликопротеина US2 HCMV показана как SEQ ID NO. 47.

В некоторых предпочтительных воплощениях HLA-связывающий домен US2 включает аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO. 75, предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, и более предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 98%, или 99% и более; а аминокислотная последовательность HLA-связывающего домена US2 показана как SEQ ID NO. 75.

В некоторых предпочтительных воплощениях MHC-связывающий домен гликопротеина US11 HCMV включает аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO. 53, предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, и более предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 98%, или 99% и более; а аминокислотная последовательность MHC-связывающего домена гликопротеина US11 HCMV показана как SEQ ID NO. 53.

В некоторых предпочтительных воплощениях HLA-связывающий домен US11

включает аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO. 81, предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, и более предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 98%, или 99% и более; и аминокислотная последовательность HLA-связывающего домена US11 показана как SEQ ID NO. 81.

В некоторых предпочтительных воплощениях HLA-связывающий домен гликопротеина US2 HCMV включает аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO. 50, предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, и более предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 98%, или 99% и более; а аминокислотная последовательность HLA-связывающего домена гликопротеина US3 HCMV показана как SEQ ID NO. 50.

В некоторых предпочтительных воплощениях HLA-связывающий домен US3 включает аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO. 78, предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, и более предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 98%, или 99% и более; а аминокислотная последовательность HLA-связывающего домена US3 показана как SEQ ID NO. 78.

В некоторых предпочтительных воплощениях HLA-связывающий домен гликопротеина US10 HCMV включает аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO. 56, предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, и более предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 98%, или 99% и более; а аминокислотная последовательность HLA-связывающего домена гликопротеина US10 HCMV показана как SEQ ID NO. 56.

В некоторых предпочтительных воплощениях белок-связывающий молекулярный домен, нацеленный на МНС I и/или МНС II или его функциональные варианты, получен из вирусных гликопротеинов, которые разрушают молекулы МНС и/или МНС II; предпочтительно вирусные гликопротеины выбраны из гликопротеина US2, US3, US11

или US10 HCMV, E3-19K аденовируса или US21 HHV-7.

В некоторых предпочтительных воплощениях молекулярный домен связывающего белка, нацеленный на МНС I и/или МНС II или его функциональные варианты, дополнительно включает вирусный белок, который направленно ингибирует или разрушает целевой NK-белок MICA, MICB, ULBP1, ULBP2, ULBP3, ULBP4, ULBP5. или ULBP6; предпочтительно вирусный белок выбран из HCMV UL16, UL141, UL142 или E3-19K аденовируса.

В некоторых предпочтительных воплощениях молекулярный домен связывающего белка, нацеленный на МНС I и/или МНС II или его функциональные варианты, дополнительно включает вирусный белок, который транспортирует молекулы МНС I из аппарата Гольджи в лизосомы для деградации; предпочтительно вирусный белок выбран из Nef HIV, Vpr HIV, U21 HHV-7, KK3 HHV-8, KK5 HHV-8, MK3 MHV-68 и p12 HTLV-1.

В некоторых предпочтительных воплощениях молекулярный домен связывающего белка, нацеленный на МНС I и/или МНС II или его функциональные варианты, дополнительно включает вирусный белок, который опосредует возврат молекул МНС-полипептида из аппарата Гольджи в эндоплазматический ретикулум и способствует их деградации; предпочтительно вирусный белок содержит структуру, связывающую МНС, и домен, связывающий рецептор KDEL; предпочтительно вирусный белок представляет собой белок CPXV203 вируса коровьей оспы.

В некоторых предпочтительных воплощениях МНС-связывающий домен US21 HHV-7 включает аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO. 62, предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, и более предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 98%, или 99% и более; а аминокислотная последовательность МНС-связывающего домена US21 HHV-7 показана как SEQ ID NO. 62.

В некоторых предпочтительных воплощениях домен, связывающий белок-мишень NK, из UL16 HCMV, включает аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO. 84, предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, и более предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 98%, или 99% и более; и домен, связывающий белок-мишень NK, из UL16 HCMV показан как SEQ ID NO. 84.

В некоторых предпочтительных воплощениях домен, связывающий белок-мишень NK, из UL141 HCMV, включает аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO. 87, предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, и более предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 98%, или 99% и более; и домен, связывающий белок-мишень NK, из UL141 HCMV показан как SEQ ID NO. 87.

В некоторых предпочтительных воплощениях MICA и ULBP3-связывающий домен из UL142 HCMV включает аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO. 90, предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, и более предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 98%, или 99% и более; а MICA и ULBP3-связывающие домены из UL142 HCMV показаны как SEQ ID NO. 90.

В некоторых предпочтительных воплощениях MHC-связывающий домен белка CPXV203 вируса осповакцины включает аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO. 99, предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, и более предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 98%, или 99% и более; а аминокислотная последовательность MHC-связывающего домена белка CPXV203 вируса осповакцины показана как SEQ ID NO. 99.

В некоторых предпочтительных воплощениях MHC-связывающий домен белка CPXV203 вируса осповакцины включает аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO. 102, предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, и более предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 98%, или 99% и более; а аминокислотная последовательность MHC-связывающего домена белка CPXV203 вируса осповакцины показана как SEQ ID NO. 102.

В некоторых предпочтительных воплощениях MHC-связывающий домен E3-19K аденовируса включает аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO. 59,

предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, и более предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 98%, или 99% и более; а аминокислотная последовательность МНС-связывающего домена E3-19K аденовируса показана как SEQ ID NO. 59.

3. Домен, связывающий участника пути деградации белков

Химерная белковая конструкция, представленная в настоящем раскрытии, также может содержать домен, связывающий участника пути деградации белка. Как описано в настоящем документе, «домен, связывающий участника пути деградации белка» относится к любой части, которая может прямо или косвенно связываться с участником пути деградации белка.

Путь деградации белка может представлять собой любой путь, который опосредует деградацию белков внутри клетки. Известные пути деградации белков включают, без ограничения указанным, путь убиквитинирования-протеасом, эндосомно-лизосомный путь и путь аутофагальной деградации.

Участники пути убиквитинирования-протеасомы включают, например, фермент, активирующий убиквитин E1, фермент, связывающий убиквитин E2, убиквитинлигазу E3 и протеасому.

Примеры ферментов, активирующих убиквитин E1, включают, например, UBA1, UBA2, UBA3, UBA5, UBA6, UBA7, ATG7, NAE1 и SAE1.

Примеры ферментов, связывающих убиквитин E2, включают, например, hCdc34, Ubc-Uev1A, UBE2A, UBE2B, UBE2C, UBE2D1, UBE2D2, UBE2D3, UBE2D4, UBE2E1, UBE2E2, UBE2E3, UBE2F, UBE2G1, UBE2G2, UBE2H, UBE2I, UBE2J1, UBE2J2, UBE2K, UBE2L3, UBE2L6, UBE2M, UBE2N, UBE2O, UBE2Q1, UBE2Q2, UBE2R1 (CDC34), UBE2R2, UBE2S, UBE2T, UBE2U, UBE2V1, UBE2V2, UBE2W, UBE2Z, ATG3, VIRC6 и UFC1.

Примеры убиквитинлигаз E3 включают, например, фон Хиппель-Линдау (VHL), Цереблон (CRBN), белок-ингибитор апоптоза (IAP), Kelch-подобный ECH-ассоциированный белок 1 (Keap1), RNF4, RNF114, MDM2, LUBAC., FBW7, Met30, HECT, SKP2, бета TRCP1, HUWE1, TRAF6, SMURF1 и E6AP. В некоторых воплощениях примеры убиквитинлигазы E3 включают, например, E3A, mdm2, комплекс, способствующий анафазе (APC), UBR5 (EDD1), SOCS/BC-box/elcBC/CUL5/RING, LNXp80, CBX4, CBLL1, HACE1, HECTD1, HECTD2, HECTD3, HECTD4, HECW1, HECW2, HERC1, HERC2, HERC3, HERC4, HERC5, HERC6, HUWE1, ITCH, NEDD4, NEDD4L, PPIL2, PRPF19, PIAS1, PIAS2, PIAS3, PIAS4, RANBP2, RNF4, RBX1, SMURF1, SMURF2, STUB1,

TOPORS, TRIP12, UBE3A, UBE3B, UBE3C, UBE3D, UBE4A, UBE4B, UBOX5, UBR5, VHL, WWP1, WWP2, Parkin и MKRN1.

Участники эндосомно-лизосомного пути включают, например, AP-1, AP-2, AP-3, эндосомы, лизосомы, HOPS, ESCRT, GASP, BLOC-1, ESCRT, Retromer, ESCRT, сортирующий нексин, Dapper2, SNX4, Pincher, Rap1-PDZ-GEF1, клатрин, C3G/CrkL/Shp2/Gab2 и т.п.

Участники пути деградации аутофагии включают, например, шаперон-опосредованную аутофагию (CMA), USP10, G3BP1, ULK1, ATG16L1, TRIM16, FBXO27VDAC, RHOT1, MFN1/2, BNIP3L, FUNDC1, BNIP3, AMBRA1, BCL2L13, FKBP8, CHDH, DISC1., PHB2, кардиолипин, SEC62, RTN3, PEX5, PEX14, ABCD3, NUFIP1 и т.д.

В некоторых воплощениях домен, связывающий участника пути деградации белков, представляет собой связывающий домен VHL. В некоторых воплощениях VHL-связывающий домен включает аминокислотную последовательность, такую как SEQ ID NO.119 (DRHDSGLDSM) или такую как SEQ ID NO.120 (ALAPYIP).

В некоторых воплощениях домен, связывающий участника пути деградации белков, представляет собой связывающий домен Keap1. В некоторых воплощениях связывающий домен Keap1 включает аминокислотную последовательность, такую как SEQ ID NO.121 (LDPETGEYL).

В некоторых воплощениях домен, связывающий участника пути деградации белков, представляет собой связывающий домен убиквитинлигазы E3, который включает аминокислотную последовательность, такую как SEQ ID NO.119 (DRHDSGLDSM).

В некоторых воплощениях домен, связывающий участника пути деградации белков, представляет собой связывающий домен CMA. В некоторых воплощениях CMA-связывающий домен включает аминокислотную последовательность, такую как SEQ ID NO.122 (KFERQ). В некоторых воплощениях CMA-связывающий домен включает аминокислотную последовательность, такую как SEQ ID NO.123 (KFERQKILDQRFFE).

В некоторых воплощениях домен, связывающий участника пути деградации белков, представляет собой связывающий домен протеасомы. В некоторых воплощениях протеасомный связывающий домен выбран из: дрожжевого Rad23 (например, Rad23 *S. cerevisiae*), человеческого убиквитиноподобного домена Rad23b (hHR23b) (UbL), E7 HPV и протеасома-связывающего домена анкиринового белка. В некоторых воплощениях протеасомный связывающий домен содержит аминокислоты 1-77 дрожжевого Rad23. В некоторых воплощениях протеасомный связывающий домен содержит аминокислоты 1-83 человеческого Rad23.

Авторы настоящей заявки обнаружили, что по сравнению с базовой конструкцией

TPD (домен связывания белка-мишени - трансмембранный домен-домен удержания в ЭПР (TBD-TMD-ERD)) химерная белковая конструкция, содержащая домен, связывающий участника пути деградации белка (лиганд для лигазы E3 (E3L), лиганд убиквитин-конъюгирующего фермента E2 (E2L) или лизосомный лиганд (LL)) (например, описанные выше) значительно улучшают деградацию белков-мишеней. Способность связывания между функциональной структурой вирусного ЭПР-резидентного белка и обратным транспортным комплексом ERAD различна, и взаимодействие между природной структурой и ЭПР-резидентной лигазой E3 также различно, и оно также конкурирует с нормальным путем деградации неправильно свернутого белка по механизму ERAD в эндоплазматическом ретикулуме, так что природный домен TMD-ERD имеет различия и ограничения в способности к убиквитинированию и деградации белка-мишени. Чтобы дополнительно повысить эффективность деградации белка-мишени, введение лигандного домена убиквитин-протеасомной системы (UPS) и/или лигандного домена аутофагально-лизосомного пути (ALP) может дополнительно способствовать убиквитинированию белков-мишеней, транспортируемых в цитоплазму и деградации в протеасомах или транспорту в лизосомы, достигая эффективного гидролиза белков-мишеней.

В некоторых воплощениях домен, связывающий мишень, или домен, связывающий белок механизма ERAD, химерной белковой конструкции соединен с доменом, связывающим участника пути деградации белка, через шарнир или линкер. Шарнир или линкер могут представлять собой одну или несколько структур молекулярной последовательности $(Glyx\ Ser)_n$, где n может быть числами от 1 до 10, тогда как x, y могут быть числами от 0 до 10, соответственно, но x, y в то же время не могут быть равны 0. В некоторых воплощениях шарнир включает аминокислотную последовательность, указанную SEQ ID NO.172 (шарнир IgG4) или SEQ ID NO.173 (((Gly4Ser)2).

4. Химерная белковая конструкция с TPD

В некоторых воплощениях химерная белковая конструкция, представленная в настоящем раскрытии, включает домен, связывающий белок-мишень, нацеленный на TCR и E3-19K аденовируса, а также один или несколько доменов, связывающих участников пути деградации белка, описанных выше. В некоторых воплощениях химерная белковая конструкция, представленная в настоящем раскрытии, включает домен связывания белка-мишени, нацеленный на TCR и E3-19K аденовируса, а также домен, связывающий убиквитинлигазу E3. В некоторых воплощениях домен, связывающий убиквитинлигазу E3, включает аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO. 147 (DRHDSGLDSMGSGSGALAPYIP).

В некоторых воплощениях химерная белковая конструкция, предлагаемая

настоящим раскрытием, включает домен, связывающий белок-мишень, нацеленный на TCR, и трансмембранный домен или его функциональные варианты, а также домены, резидентные в эндоплазматическом ретикулуме, или его функциональные варианты вирусного белка, резидентного в эндоплазматическом ретикулуме,, отличного от E3-19K аденовируса. Вирусный белок, резидентный в эндоплазматическом ретикулуме, может быть выбран по меньшей мере из одной из следующей группы, состоящей из: гликопротеина US2, US11, US3, US10, US6 из HCMV, ICP47 HSV, CPXV12, UL49.5 BHV, BNFL2a EBV, UL16, UL141, UL142 из HCMV, Nef HIV, Vpr HIV, U21 HHV-7, KK3 HHV-8, KK5 HHV-8, MK3 MHV-68, p12 HTLV-1 и белок CPXV203 вируса коровьей оспы.

В некоторых воплощениях химерная белковая конструкция, предлагаемая настоящим раскрытием, включает связывающий белок-мишень домен, нацеленный на указанный выше белок-мишень (например, TCR), а также трансмембранный домен или его функциональные варианты и домены, резидентные в эндоплазматическом ретикулуме, или их функциональные варианты US2 и/или US11 HCMV.

В некоторых воплощениях химерная белковая конструкция, предлагаемая настоящим раскрытием, включает домен, связывающий белок-мишень, нацеленный на указанный выше белок-мишень (например, TCR), а также трансмембранный домен или его функциональные варианты и домены, резидентные в эндоплазматическом ретикулуме, или их функциональные варианты US3 HCMV.

В некоторых воплощениях химерная белковая конструкция, предлагаемая настоящим раскрытием, включает домен, связывающий белок-мишень, нацеленный на указанный выше белок-мишень (например, TCR), а также трансмембранный домен или его функциональные варианты и домены, резидентные в эндоплазматическом ретикулуме, или их функциональные варианты US3 HCMV.

В некоторых воплощениях химерная белковая конструкция, представленная в настоящем раскрытии, включает связывающий белок-мишень домен, нацеленный на указанный выше белок-мишень (например, TCR), а также трансмембранный домен или его функциональные варианты и домены, резидентные в эндоплазматическом ретикулуме, или их функциональные варианты US6 HCMV, ICP47 HSV, CPXV012, BNFL2a EBV и/или UL49.5 BHV.

В некоторых воплощениях химерная белковая конструкция, предлагаемая настоящим раскрытием, включает домен, связывающий белок-мишень, нацеленный на указанный выше белок-мишень (например, TCR), а также трансмембранный домен или его функциональные варианты и домены, резидентные в эндоплазматическом ретикулуме, или их функциональные варианты US21 HHV-7.

В некоторых воплощениях химерная белковая конструкция, предлагаемая настоящим раскрытием, включает домен, связывающий белок-мишень, нацеленный на указанный выше белок-мишень (например, TCR), а также трансмембранный домен или его функциональные варианты и домены, резидентные в эндоплазматическом ретикулуме, или их функциональные варианты US16, UL141 и/или UL142 из HCMV.

В некоторых воплощениях химерная белковая конструкция, предлагаемая настоящим раскрытием, включает домен, связывающий белок-мишень, нацеленный на указанный выше белок-мишень (например, TCR), а также трансмембранный домен или его функциональные варианты и домены, резидентные в эндоплазматическом ретикулуме, или их функциональные варианты Nef HIV, Vpr HIV, U21 HIV-7, KK3 HIV-8, KK5 HIV-8, MK3 HIV-68 и/или p12 HTLV-1.

В некоторых воплощениях химерная белковая конструкция, представленная в настоящем раскрытии, включает домен, связывающий белок-мишень, нацеленный на указанный выше белок-мишень (например, TCR), а также трансмембранный домен или его функциональные варианты и домены, резидентные в эндоплазматическом ретикулуме, или их функциональные варианты из белка CPXV203 вируса коровьей оспы.

В некоторых воплощениях химерная белковая конструкция, представленная в настоящем раскрытии, включает домен связывания белка-мишени, не нацеленный на TCR и E3-19K аденовируса. В некоторых воплощениях химерная белковая конструкция, представленная в настоящем раскрытии, включает домен связывания белка-мишени, нацеленный на CD123 и E3-19K аденовируса.

В некоторых воплощениях вышеуказанная химерная белковая конструкция дополнительно включает один или несколько связывающих доменов участников пути деградации белка, описанных выше.

5. Фрагмент коэкспрессии

В некоторых воплощениях химерная белковая конструкция, представленная в настоящем раскрытии, и по меньшей мере один фрагмент коэкспрессии экспрессируются совместно. Можно использовать любой способ, применимый к обычной экспрессии. Например, химерная белковая конструкция (или ее часть) и по меньшей мере одна группа коэкспрессии могут быть соединены расщепляемым линкером, а в случае расщепления линкера химерная белковая конструкция и группа коэкспрессии могут быть коэкспрессированными.

В некоторых воплощениях химерная белковая конструкция, представленная в настоящем раскрытии, связана, например, саморасщепляющейся связью, по меньшей мере, с одним фрагментом коэкспрессии. В некоторых воплощениях саморасщепляющаяся

связь представляет собой расщепляемый пептид, например, пептид T2A, пептид GSG-T2A, пептид E2A, пептид GSG-E2A, пептид F2A, пептид GSG-F2A, пептид P2A или пептид GSG-P2A.

В некоторых предпочтительных воплощениях T2A включает аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO. 108, предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, и более предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 98%, или 99% и более; и аминокислотная последовательность T2A показана как SEQ ID NO. 108.

В некоторых предпочтительных воплощениях аминокислотная последовательность пептида GSG-T2A показана в SEQ ID NO.109.

В некоторых предпочтительных воплощениях P2A включает аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO. 110, предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, и более предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 98%, или 99% и более; и аминокислотная последовательность P2A показана в SEQ ID NO. 110.

В некоторых предпочтительных воплощениях аминокислотная последовательность пептида GSG-P2A показана в SEQ ID NO. 111.

В некоторых предпочтительных воплощениях E2A включает аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO. 112, предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, и более предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 98%, или 99% и более; и аминокислотная последовательность E2A показана в SEQ ID NO. 112.

В некоторых предпочтительных воплощениях аминокислотная последовательность пептида GSG-E2A показана в SEQ ID NO. 113.

В некоторых предпочтительных воплощениях F2A включает аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO. 114, предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, и более предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет

идентичность 98%, или 99% и более; и аминокислотная последовательность F2A показана как SEQ ID NO. 114.

В некоторых предпочтительных воплощениях аминокислотная последовательность пептида GSG-F2A показана в SEQ ID NO. 115.

Фрагмент коэкспрессии, представленный в настоящей заявке, может представлять собой любой белок или полипептид, обладающий биологической функцией. В зависимости от желаемой биологической функции можно выбрать подходящий фрагмент коэкспрессии. Например, чтобы снизить иммуногенность или презентацию антигена в клетках, в качестве фрагмента коэкспрессии можно выбрать белок, способный разрушать молекулы МНС класса I или II или сокращать их количество. В качестве другого примера, чтобы клетки распознавали белок-мишень, в качестве фрагмента коэкспрессии можно выбрать связывающий домен, который распознает белок-мишень или связывается с ним (например, хемокиновый рецептор или химерный антигенный рецептор CAR). В качестве другого примера, чтобы повысить иммуностимулирующую активность, иммуностимулирующую молекулу можно выбрать в качестве фрагмента коэкспрессии.

В некоторых предпочтительных воплощениях примеры фрагментов коэкспрессии включают, без ограничения указанным, интактные вирусные ЭПР-резидентные гликопротеины (например, US2, US3, US11, US10 из HCMV, E3-K19 аденовируса, US6 HCMV, ICP47 HSV), химерный антигенный рецептор (CAR), функциональный Т-клеточный рецептор (TCR), хемокиновые рецепторы (например, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR9, CCR2b, CXCR1, CXCR2 и CXCR4), рецепторы, активирующие NK-клетки (например, NKG2D, NKG2C, NKG2E, NKG2F, NKG2H, CD94, KIR2DL4, KIR2DS1, KIR2DS2, KIR2DS4, KIR3DS1, нативные цитотоксические рецепторы, TRAIL, DNAM-1, CD16a, 2B4, NTB-A, CRACC и NKp80), компоненты передачи сигнала CNK, цитокины, CD7, иммуностимулирующие молекулы (например, TNF- α , IFN- β , IFN- γ , IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-18 и один или несколько колониестимулирующих факторов гранулоцитов-макрофагов) и т.д.

i) Интактный вирусный ЭПР-резидентный гликопротеин

В некоторых воплощениях фрагмент коэкспрессии представляет собой интактный вирусный гликопротеин, резидентный в ЭПР, включая, без ограничения указанным, US2, US3, US11, US10 ИЗ HCMV, E3-K19 аденовируса, US6 HCMV и ICP47 HSV.

В некоторых предпочтительных воплощениях полноразмерная последовательность гликопротеина US2 из HCMV включает аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO. 46, предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет

идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, и более предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 98%, или 99% или более, предпочтительно, обладающих активностью разрушения молекул МНС класса I или МНС класса II; а аминокислотная последовательность полноразмерной последовательности гликопротеина US2 HCMV показана как SEQ ID NO. 46.

В некоторых предпочтительных воплощениях полноразмерная последовательность US2 включает аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO. 74, предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, и более предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 98%, или 99% или более, предпочтительно, обладающих активностью разрушения молекул МНС класса I или МНС класса II; а аминокислотная последовательность полноразмерной последовательности гликопротеина US2 HCMV показана как SEQ ID NO. 74.

В некоторых предпочтительных воплощениях полноразмерная последовательность гликопротеина US3 из HCMV включает аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO. 49, предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, и более предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 98%, или 99% или более, предпочтительно, обладающих активностью разрушения молекул МНС класса I или МНС класса II; а аминокислотная последовательность полноразмерной последовательности гликопротеина US3 из HCMV показана как SEQ ID NO. 49.

В некоторых предпочтительных воплощениях полноразмерная последовательность US3 включает аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO. 77, предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, и более предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 98%, или 99% или более, предпочтительно, обладающих активностью разрушения молекул МНС класса I или МНС класса II; а аминокислотная последовательность полноразмерной последовательности гликопротеина US3 показана как SEQ ID NO. 77.

В некоторых предпочтительных воплощениях полноразмерная последовательность гликопротеина US11 из HCMV включает аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в

SEQ ID NO. 52, предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, и более предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 98%, или 99% или более, предпочтительно, обладающих активностью разрушения молекул МНС класса I или МНС класса II; а аминокислотная последовательность полноразмерной последовательности гликопротеина US11 из HCMV показана как SEQ ID NO. 52.

В некоторых предпочтительных воплощениях полноразмерная последовательность US11 включает аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO. 80, предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, и более предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 98%, или 99% или более, предпочтительно, обладающих активностью разрушения молекул МНС класса I или МНС класса II; а аминокислотная последовательность полноразмерной последовательности гликопротеина US11 показана как SEQ ID NO. 80.

В некоторых предпочтительных воплощениях полноразмерная последовательность гликопротеина US10 из HCMV включает аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO. 55, предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, и более предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 98%, или 99% или более, предпочтительно, обладающих активностью разрушения молекул МНС класса I или МНС класса II; а аминокислотная последовательность полноразмерной последовательности гликопротеина US10 из HCMV показана как SEQ ID NO. 55.

В некоторых предпочтительных воплощениях полноразмерная последовательность E3-19K аденовируса включает аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO. 58, предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, и более предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 98%, или 99% или более, предпочтительно, обладающих активностью разрушения молекул МНС класса I или МНС класса II; а аминокислотная последовательность полноразмерной последовательности гликопротеина E3-19K аденовируса показана как SEQ ID NO. 58.

В некоторых предпочтительных воплощениях полноразмерная последовательность US6 из HCMV включает аминокислотную последовательность, которая имеет

идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO. 64, предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, и более предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 98%, или 99% или более, предпочтительно, обладающих активностью разрушения молекул МНС класса I или МНС класса II; и полноразмерная последовательность US6 из HCMV показана как SEQ ID NO. 64.

В некоторых предпочтительных воплощениях полноразмерная последовательность ICP47 из HSV включает аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO. 66, предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, и более предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 98%, или 99% или более, предпочтительно, обладающих активностью разрушения молекул МНС класса I или МНС класса II; и полноразмерная последовательность ICP47 из HSV показана как SEQ ID NO. 66.

ii) Химерный антигенный рецептор (CAR)

В некоторых воплощениях фрагмент коэкспрессии представляет собой химерный антигенный рецептор (CAR). CAR включает домен связывания белка-мишени (например, внеклеточный домен распознавания, нацеленный на опухоль), трансмембранный домен и домен передачи сигнала активации иммунного рецептора (ITAM) (также называемый «доменом передачи внутриклеточного сигнала»). В некоторых воплощениях CAR может дополнительно включать костимулирующий домен. В некоторых воплощениях шарнир или линкер включен в домен внеклеточного узнавания, нацеленный на опухоль, трансмембранный домен и/или домен внутриклеточной передачи сигнала.

В некоторых воплощениях домен внеклеточного распознавания, нацеленный на опухоль, выбран из домена, связывающего специфический опухолевый антиген, домена, связывающего антиген-мишень в микрооружии опухоли, и/или хемокинового рецептора, нацеленного на микроокружение опухоли.

В некоторых предпочтительных воплощениях внеклеточный домен узнавания, нацеленный на опухоль, выбран из антитела, способного целенаправленно распознавать опухолеассоциированный антиген или его функциональный фрагмент, TCR или их комбинацию. Функциональные фрагменты антитела выбраны из группы, состоящей из Fd, Fv, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv (scFv), одноцепочечного антитела (scFv) или нанотела, диатела, триатела и тетратела.

В некоторых предпочтительных воплощениях трансмембранный домен CAR, описанный в настоящем документе, может быть получен из любого мембраносвязывающего белка или трансмембранного белка, включая, без ограничения указанным, BAFFR, BLAME (SLAMF8), CD2, CD3 ϵ , CD4, CD5, CD8, CD9, CD11a (CD18, ITGAL, LFA-1), CD11b, CD11c, CD11d, CD16, CD19, CD22, CD27, CD28, CD29, CD33, CD37, CD40, CD45, CD49a, CD49d, CD49f, CD64, CD80, CD84, CD86, CD96(Tactile), CD100(SEMA4D), CD103, CD134, CD137(4-1BB), CD150(IPO-3, SLAMF1, SLAM), CD154, CD160(BY55), CD162(SELPLG), CD226(DNAM1), CD229(Ly9), CD244(2B4, SLAMF4), CD278(ICOS), CEACAM1, CRT AM, GITR, HYEM(LIGHTR), IA4, IL2R β , IL2R γ , IL7R α , ITGA1, ITGA4, ITGA6, ITGAD, ITGAE, ITGAM, ITGAX, ITGB1, ITGB2, ITGB7, KIR, LTBR, OX40, NKG2C, NKG2D, NKp30, NKp44, NKp46, NKp80 (KLRF1), PAG/Cbp, PSGL1, SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAMF7, α , β или ζ -цепи Т-клеточных рецепторов, TNFR2, VLA1 и VLA-6.

В некоторых предпочтительных воплощениях трансмембранный домен CAR выбран из трансмембранного домена рецептора, активирующего НК-клетки, трансмембранного домена DAP10, трансмембранного домена DAP12, трансмембранного домена CD8, трансмембранного домена CD28, трансмембранного домена CD4, трансмембранного домена 4-1BB, трансмембранного домена OX40, трансмембранного домена ICOS, трансмембранного домена CTLA-4, трансмембранного домена PD-1, трансмембранного домена LAG-3, трансмембранного домена 2B4 и трансмембранного домена BTLA, а также их комбинации.

В некоторых предпочтительных воплощениях трансмембранного домена CAR выбран из трансмембранного домена CD8, трансмембранного домена α и/или β цепи Т-клеточного рецептора, трансмембранного домена CD28, трансмембранного домена CD3 ϵ , трансмембранного домена CD45, трансмембранного домена CD4, трансмембранного домена CD5., трансмембранного домена CD8, трансмембранного домена CD9, трансмембранного домена CD16, трансмембранного домена CD22, трансмембранного домена CD33, трансмембранного домена CD37, трансмембранного домена CD64, трансмембранного домена CD80, трансмембранного домена CD86, трансмембранного домена CD134, трансмембранного домена CD137, трансмембранного домена CD154, трансмембранного домена GITR и их комбинации.

В некоторых предпочтительных воплощениях домен передачи сигнала активации иммунного рецептора (ITAM) происходит из домена передачи внутриклеточного сигнала активации иммунного рецептора; предпочтительно иммунный рецептор выбран из TCR ζ , CD2, CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ , CD3 ζ , CD5, CD22, FcR γ , CD66d, Fc α RI, Fc γ RI, Fc γ RII, Fc γ RIII,

дектина-1, CLEC-1, CD72, CD79A, CD79B; предпочтительно домен передачи сигнала активации иммунного рецептора (ITAM) объединен с адаптером передачи сигналов NK-клеток или его функциональным вариантом; и предпочтительно иммунный рецептор представляет собой CD3 ζ .

В некоторых предпочтительных воплощениях домен передачи сигнала активации иммунного рецептора (ITAM) получен из CD3 ζ , общего FcR γ (FCER1G), Fc γ RIIa, FcR β , CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ , CD5, CD22, CD79a, CD79b, CD278 («ICOS»), Fc ϵ RI CD66d, DAP10 и DAP12 и другие домены внутриклеточной передачи сигнала.

В некоторых предпочтительных воплощениях домен передачи внутриклеточного сигнала CAR включает домен передачи внутриклеточного сигнала из рецептора, активирующего NK-клетки, и/или домен передачи сигнала костимуляции.

В некоторых предпочтительных воплощениях домен передачи сигнала костимулирующей T-клетки получен из домена передачи внутриклеточного сигнала костимулирующих молекул; предпочтительно костимулирующие молекулы выбраны из группы, состоящей из молекул MHC класса I, белков рецепторов TNF, иммуноглобулиноподобных белков, рецепторов цитокинов, белков интегринов, сигнальных молекул активации лимфоцитов (белков SLAM), активированных рецепторов NK-клеток, BTLA, рецепторов Toll-лиганда, OX40, CD2, CD7, CD7, CD16, CD27, CD28, CD30, CD40, CD38, CD35, CD79A, CD79B, CDS, ICAM-1, LFA-1, (CD11a/CD18), 4-1BB(CD137), B7-H3, CDS, ICAM-1, ICOS(CD278), GITR, BAFRR, LIGHT, HVEM(LIGHTR), KIRDS2, SLAMF7, NKp80(KLRF1), NKp44, NKp30, NKp46, CD19, CD4, CD8 α , CD8 β , IL2R β , IL2R γ , IL7R α , ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, LFA-1, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, NKG2D, NKG2C, NCR, DAP10, DAP12, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (тактильный), CEACAM1, CRTAM, Ly9(CD229), CD160(BY55), PSGL1, CD100SEMA4D, CD69, SLAMF6(NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162)), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, CD19a, CD83-специфических связывающих лигандов, CARD11, FcRa, FcRp, FcRy, Fyn, HVEM, ICOS, Lck, LAG3, LAT, LRP, NOTCH1, Wnt, OX40, ROR2, Ryk, SLAMF1, Slp76, pTa, TCRa, TCRp, TRIM, ZAP70 и PTCH2. Более предпочтительно домен передачи сигнала костимуляции может быть выбран из домена передачи внутриклеточного сигнала NKG2D, домена передачи внутриклеточного сигнала DAP10, домена передачи внутриклеточного сигнала DAP12, домена передачи внутриклеточного сигнала NCR, домена передачи внутриклеточного сигнала CD28, домена передачи внутриклеточного сигнала 4-1BB,

домена передачи внутриклеточного сигнала OX40 и домена передачи внутриклеточного сигнала ICOS.

В некоторых воплощениях шарнирный и/или трансмембранный домен CAR, описанный в настоящем документе, обеспечивает презентацию на клеточной поверхности внеклеточного домена CAR. Шарнир CAR, описанный в настоящем документе, может происходить из любого мембраносвязывающего белка или трансмембранного белка, включая, без ограничения указанным, BAFFR, BLAME (SLAMF8), CD2, CD3ε, CD4, CD5, CD8, CD9, CD11a (CD18, ITGAL, LFA-1), CD11b, CD11c, CD11d, CD16, CD19, CD22, CD27, CD28, CD29, CD33, CD37, CD40, CD45, CD49a, CD49d, CD49f, CD64, CD80, CD84, CD86, CD96 (tactile), CD100(SEMA4D), CD103, CD134, CD137(4-1BB), CD150(IPO-3, SLAMF1, SLAM), CD154, CD160(BY55), CD162(SELPLG), CD226(DNAM1), CD229(Ly9), CD244 (2B4, SLAMF4), CD278(ICOS), CEACAM1, CRT AM, GITR, HYEM(LIGHTR), IA4, IL2Rβ, IL2Rγ, IL7Ra a, ITGA1, ITGA4, ITGA6, ITGAD, ITGAE, ITGAM, ITGAX, ITGB1, ITGB2, ITGB7, KIR, LTBR, OX40, NKG2C, NKG2D, NKp30, NKp44, NKp46, NKp80 (KLRF1), PAG/Cbp, PSGL1, SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAMF7, α, β или ζ цепи рецепторов Т-клеток, TNFR2, VLA1 и VLA-6. В некоторых воплощениях шарнир CAR, описанный в настоящем документе, включает шарнирный участок CD8α, шарнирный участок человеческого иммуноглобулина (Ig) или последовательность, богатую глицином-серином.

В некоторых предпочтительных воплощениях линкер представляет собой гибкий линкер; предпочтительно, гибкий линкер включает аминокислотную последовательность, обозначенную как (Gly(x)Ser(y))_n, где n представляет собой целое число от 1 до 10, а x и y представляют собой независимые целые числа от 0 до 10, при условии, что x и y оба не равны 0; и более предпочтительно, линкер включает аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO. 104 или аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO. 105.

В некоторых предпочтительных воплощениях шарнир представляет собой шарнир IgG1 или шарнир IgG4.

В некоторых предпочтительных воплощениях шарнир IgG1 включает аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO. 106, предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, и более предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 98%, или 99% и более; и аминокислотная последовательность шарнира IgG1 показана как SEQ ID NO. 106.

В некоторых предпочтительных воплощениях шарнир IgG4 включает аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO. 107, предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, и более предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 98%, или 99% и более; и аминокислотная последовательность шарнира IgG4 показана как SEQ ID NO. 107.

В некоторых предпочтительных воплощениях пептид расщепления входит в состав компонента рецептора активации NK, компонента передачи сигнала CNK и/или компонента UT, например, пептид T2A, пептид GSG-T2A, пептид E2A, пептид GSG-E2A, пептид F2A, Пептид GSG-F2A, пептид P2A или пептид GSG-P2A.

В некоторых предпочтительных воплощениях T2A включает аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO. 108, предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, и более предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 98%, или 99% и более; и аминокислотная последовательность T2A показана как SEQ ID NO. 108.

В некоторых предпочтительных воплощениях аминокислотная последовательность пептида GSG-T2A показана в SEQ ID NO.109.

В некоторых предпочтительных воплощениях P2A включает аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO. 110, предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, и более предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 98%, или 99% и более; и аминокислотная последовательность F2A показана как SEQ ID NO. 110.

В некоторых предпочтительных воплощениях аминокислотная последовательность пептида GSG-P2A показана в SEQ ID NO. 111.

В некоторых предпочтительных воплощениях E2A включает аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO. 112, предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, и более предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 98%, или 99% и более; и аминокислотная последовательность E2A показана

как SEQ ID NO. 112.

В некоторых предпочтительных воплощениях аминокислотная последовательность пептида GSG-E2A показана в SEQ ID NO. 113.

В некоторых предпочтительных воплощениях F2A включает аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO. 114, предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, и более предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 98%, или 99% и более; и аминокислотная последовательность F2A показана как SEQ ID NO. 114.

В некоторых предпочтительных воплощениях аминокислотная последовательность пептида GSG-F2A показана в SEQ ID NO. 115.

iii) Рецептор CNK

В некоторых воплощениях фрагмент коэкспрессии представляет собой рецептор CNK. Рецептор CNK включает химерный компонент рецептора, активирующего НК, и химерный компонент передачи сигнала НК (также называемый «компонентом передачи сигнала CNK»). Химерный компонент рецептора, активирующего НК, может по меньшей мере включать рецептор, активирующий НК-клетки, или его функциональный вариант.

Рецепторы, активирующие НК-клетки

В некоторых воплощениях рецептор, активирующий НК-клетки, включает: (a) внеклеточный домен (ED) или функциональный вариант рецептора, активирующего НК-клетки, (b) трансмембранный домен (TMD) или функциональный вариант рецептора, активирующего НК-клетки и (c) внутриклеточный домен (ICD) или функциональный вариант рецептора, активирующего НК-клетки; и где, необязательно, шарнир или линкер включен между внеклеточным доменом рецептора, активирующего НК-клетки или его функциональным вариантом, трансмембранным доменом рецептора, активирующего НК-клетки или его функциональным вариантом, и/или внутриклеточным доменом рецептора, активирующего НК-клетки или его функциональным вариантом. Подробное описание рецепторов, активирующих НК-клетки, и компонентов передачи сигнала CNK можно найти, например, в: US 2020/0308248A1, вся информация которого включена в данную заявку ссылкой.

Рецептор, активирующий НК-клетки, выбран из NKG2D, NKG2C, NKG2E, NKG2F, NKG2H, CD94, KIR2DL4, KIR2DS1, KIR2DS2, KIR2DS4, KIR3DS1, натурального цитотоксического рецептора (NCR), TRAIL, DNAM-1, сигнальной молекулы активации лимфоцитов (SLAM) молекулы семейства 2B4 (также известной как CD244), молекулы

прикрепления DNAX 1 (DNAM-1, также известной как CD226), CD16a, 2B4, NTB-A, CRACC (CS1) и NKp80, где натуральный цитотоксический рецептор включает NKp46 (также известный как NCR1 или CD335), NKp44 (также известный как NCR2 или CD336) и NKp30 (также известный как NCR3 или CD337). В некоторых воплощениях натуральный цитотоксический рецептор выбран из NKp46, NKp44 и NKp30.

В некоторых предпочтительных воплощениях рецептор, активирующий NK-клетки, представляет собой рецептор, активирующий NK-клетки млекопитающих; предпочтительно млекопитающее выбрано из числа человека, примата, крысы, лошади, коровы, овцы, козы, кошки, свиньи, собаки, ламы, альпаки, слона, белки, морской свинки.

В некоторых предпочтительных воплощениях рецептор, активирующий NK-клетки, представляет собой рекомбинантный рецептор, активирующий NK-клетки, содержащий различные исходные домены, активирующие NK-клетки.

В некоторых предпочтительных воплощениях рецептор, активирующий NK-клетки, представляет собой рецептор, активирующий NK-клетки человеческого происхождения; и предпочтительно, рецептор, активирующий NK-клетки, представляет собой рекомбинантный рецептор, активирующий NK-клетки, содержащий различные домены, активирующие NK-клетки человеческого происхождения.

В некоторых предпочтительных воплощениях рецептор, активирующий NK-клетки, представляет собой рецептор, активирующий NK-клетки мышиноного или крысиного происхождения; и предпочтительно, рецептор, активирующий NK-клетки, представляет собой рекомбинантный рецептор, активирующий NK-клетки, содержащий различные домены, активирующие NK-клетки мышиноного или крысиного происхождения.

В некоторых предпочтительных воплощениях рецептор, активирующий NK-клетки, представляет собой рекомбинантный рецептор, активирующий NK-клетки, содержащий домены человеческого происхождения и домены, активирующие NK-клетки, мышиноного или крысиного происхождения.

В некоторых предпочтительных воплощениях внеклеточный домен рецептора, активирующего NK-клетки, представляет собой внеклеточный домен рецептора, активирующего NK-клетки человека, мыши или крысы.

В некоторых предпочтительных воплощениях трансмембранный домен рецептора, активирующего NK-клетки, представляет собой трансмембранный домен рецептора, активирующего NK-клетки человека, мыши или крысы.

В некоторых предпочтительных воплощениях внутриклеточный домен рецептора, активирующего NK-клетки, представляет собой внутриклеточный домен рецептора, активирующего NK-клетки человека, мыши или крысы.

В некоторых предпочтительных воплощениях рецептор, активирующий NK-клетки, включает внеклеточный домен рецептора, активирующего NK-клетки человека, трансмембранный домен рецептора, активирующего NK-клетки мыши или крысы, и внутриклеточный домен рецептора, активирующего NK-клетки человека.

В некоторых предпочтительных воплощениях функциональный вариант, активирующий NK-клетки, выбран из мутанта рецептора, активирующего NK-клетки, слитого белка дикого типа или слитого белка дикого типа и мутанта.

В некоторых предпочтительных воплощениях внеклеточный домен человеческого NKG2D включает аминокислотную последовательность, которая на 80% или более идентична аминокислотной последовательности, показанной в SEQ ID NO. 1, предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, и более предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 98%, или 99% и более; и аминокислотная последовательность полноразмерной последовательности человеческого NKG2D показана как SEQ ID NO. 1.

В некоторых предпочтительных воплощениях полноразмерная последовательность человеческого NKG2D включает аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO. 2, предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, и более предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 98%, или 99% и более; и аминокислотная последовательность полноразмерной последовательности человеческого NKG2D показана как SEQ ID NO. 2.

В некоторых предпочтительных воплощениях внеклеточный домен мышинового NKG2D включает аминокислотную последовательность, которая на 80% или более идентична аминокислотной последовательности, показанной в SEQ ID NO. 3, предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, и более предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 98%, или 99% и более; и аминокислотная последовательность полноразмерной последовательности мышинового NKG2D показана как SEQ ID NO. 3.

В некоторых предпочтительных воплощениях полноразмерная последовательность мышинового NKG2D включает аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO. 4, предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет

В некоторых предпочтительных воплощениях полноразмерная последовательность человеческого NTB-A включает аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO. 22, предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, и более предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 98%, или 99% и более; и аминокислотная последовательность полноразмерной последовательности человеческого NTB-A показана как SEQ ID NO. 22.

В некоторых предпочтительных воплощениях полноразмерная последовательность человеческого CRACC включает аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO. 23, предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, и более предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 98%, или 99% и более; и аминокислотная последовательность полноразмерной последовательности человеческого CRACC показана как SEQ ID NO. 23.

В некоторых предпочтительных воплощениях полноразмерная последовательность человеческого NKp80 включает аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO. 24, предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, и более предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 98%, или 99% и более; и аминокислотная последовательность полноразмерной последовательности человеческого NKp80 показана как SEQ ID NO. 24.

Компонент передачи сигнала CNK

В некоторых воплощениях компонент передачи сигнала CNK включает по меньшей мере (i) сигнальный адаптер NK-клетки (например, DAP10 или DAP12) или его функциональный вариант. В некоторых воплощениях сигнальный адаптер NK-клетки включает: (a) внеклеточный домен (ED) или функциональный вариант сигнального адаптера NK-клетки, (b) трансмембранный домен (TMD) или функциональный вариант сигнального адаптера NK-клетки и (c) внутриклеточный домен (ICD) или функциональный вариант сигнального адаптера NK-клетки; и где, необязательно, шарнир или линкер включен между внеклеточным доменом сигнального адаптера NK-клетки или его функциональным вариантом, трансмембранным доменом сигнального адаптера NK-клетки или его функциональным вариантом, и/или внутриклеточным доменом

сигнального адаптера НК-клетки или его функциональным вариантом.

В некоторых предпочтительных воплощениях сигнальный адаптер НК-клетки представляет собой сигнальный адаптер НК-клетки млекопитающих; предпочтительно млекопитающее выбрано из человека, примата, крысы, лошади, крупного рогатого скота, овцы, козы, кошки, свиньи, собаки, ламы, альпаки, слона, белки, морской свинки.

В некоторых предпочтительных воплощениях сигнальный адаптер НК-клетки представляет собой рекомбинантный преобразователь сигнала НК-клетки, содержащий различные исходные домены сигнального адаптера НК-клетки.

В некоторых предпочтительных воплощениях сигнальный адаптер НК-клетки представляет собой сигнальный адаптер НК-клетки человеческого происхождения; предпочтительно сигнальный адаптер НК-клетки представляет собой рекомбинантный сигнальный адаптер НК-клетки, содержащий различные домены сигнального адаптера НК-клетки человеческого происхождения.

В некоторых предпочтительных воплощениях сигнальный адаптер НК-клетки представляет собой сигнальный адаптер НК-клетки мышинового или крысиного происхождения; предпочтительно, сигнальный адаптер НК-клетки представляет собой рекомбинантный сигнальный адаптер НК-клетки, содержащий различные домены сигнального адаптера НК-клетки мышинового или крысиного происхождения.

В некоторых предпочтительных воплощениях сигнальный адаптер НК-клетки представляет собой рекомбинантный сигнальный адаптер НК-клетки, содержащий домены сигнального адаптера НК-клеток человеческого и мышинового/крысиного происхождения.

В некоторых предпочтительных воплощениях внеклеточный домен сигнального адаптера НК-клетки представляет собой внеклеточный домен сигнального адаптера НК-клетки человека, мышцы или крысы.

В некоторых предпочтительных воплощениях трансмембранный домен сигнального адаптера НК-клетки представляет собой трансмембранный домен сигнального адаптера НК-клетки человека, мышцы или крысы.

В некоторых предпочтительных воплощениях внутриклеточный домен сигнального адаптера НК-клетки представляет собой внутриклеточный домен сигнального адаптера НК-клетки человека, мышцы или крысы.

Адаптером сигнала НК-клеток в компоненте передачи сигнала CNK является DAP10 или DAP12.

В некоторых предпочтительных воплощениях функциональный вариант сигнального адаптера клетки CNK выбран из мутанта DAP10 или DAP12, или слитого

белка DAP10 и DAP12, или слитого белка DAP10 или DAP12 дикого типа с мутантным типом DAP10 или DAP12.

В некоторых предпочтительных воплощениях компонент передачи сигнала CNK дополнительно включает (ii) домен передачи сигнала активации иммунного рецептора (ITAM) и/или (iii) домен передачи сигнала костимуляции Т-клеток.

В некоторых предпочтительных воплощениях шарнир или линкер включен между сигнальным адаптером НК-клетки или его функциональным вариантом, доменом передачи сигнала активации иммунного рецептора (ITAM) и/или доменом передачи сигнала костимуляции Т-клеток; предпочтительно сигнальный адаптер НК-клетки или его функциональный вариант объединен с доменом передачи сигнала активации иммунного рецептора (ITAM).

В некоторых предпочтительных воплощениях домен передачи сигнала активации иммунного рецептора (ITAM) происходит из домена передачи внутриклеточного сигнала активации иммунного рецептора; предпочтительно иммунный рецептор выбран из TCR ζ , CD2, CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ , CD3 ζ , CD5, CD22, Fc α RI, Fc γ RI, Fc γ RII, Fc γ RIII, дектина-1, CLEC-1, CD72, CD79A, CD79B; предпочтительно домен передачи сигнала активации иммунного рецептора (ITAM) объединен с адаптером передачи сигналов НК-клеток или его функциональным вариантом; и предпочтительно иммунный рецептор представляет собой CD3 ζ .

В некоторых предпочтительных воплощениях домен передачи сигнала костимуляции Т-клеток получен из домена внутриклеточной передачи сигнала молекулы совместного моделирования.

В некоторых предпочтительных воплощениях полноразмерная последовательность человеческого DAP10 включает аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO. 25, предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, и более предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 98%, или 99% и более; и аминокислотная последовательность полноразмерной последовательности человеческого DAP10 показана как SEQ ID NO. 25.

В некоторых предпочтительных воплощениях полноразмерная последовательность человеческого DAP10 включает аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO. 26, предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, и более

предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 98%, или 99% и более; и аминокислотная последовательность полноразмерной последовательности человеческого DAP10 показана как SEQ ID NO. 26.

В некоторых предпочтительных воплощениях трансмембранный домен человеческого DAP10 включает аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO. 27, предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, и более предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 98%, или 99% и более; и аминокислотная последовательность полноразмерной последовательности человеческого DAP10 показана как SEQ ID NO. 27.

В некоторых предпочтительных воплощениях полноразмерная последовательность человеческого DAP12 включает аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO. 28, предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, и более предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 98%, или 99% и более; и аминокислотная последовательность полноразмерной последовательности человеческого DAP12 показана как SEQ ID NO. 28.

В некоторых предпочтительных воплощениях трансмембранный домен человеческого DAP12 включает аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO. 29, предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, и более предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 98%, или 99% и более; и аминокислотная последовательность полноразмерной последовательности человеческого DAP12 показана как SEQ ID NO. 29.

В некоторых предпочтительных воплощениях слитый белок трансмембранных человеческих доменов DAP12 и DAP10 включает аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO. 30, предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, и более предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 98%, или 99% и более; и аминокислотная последовательность полноразмерной последовательности человеческого DAP10 и человеческого DAP12 показана как SEQ ID

NO. 30.

В некоторых предпочтительных воплощениях полноразмерная последовательность слитого белка человеческих DAP10-DAP12 включает аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO. 31, предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, и более предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 98%, или 99% и более; и аминокислотная последовательность полноразмерной последовательности слитого белка человеческих DAP10-DAP12 показана как SEQ ID NO. 31.

В некоторых предпочтительных воплощениях последовательность домена внутриклеточной передачи сигнала человеческого CD3 дзета включает аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO. 32, предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, и более предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 98%, или 99% и более; а аминокислотная последовательность домена внутриклеточной передачи сигнала человеческого CD3 дзета показана как SEQ ID NO. 32.

В некоторых предпочтительных воплощениях полноразмерная последовательность человеческого DAP10-CD3 дзета включает аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO. 33, предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, и более предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 98%, или 99% и более; и аминокислотная последовательность DAP10-CD3 дзета показана как SEQ ID NO. 33.

В некоторых предпочтительных воплощениях полноразмерная последовательность человеческого DAP12-CD3 дзета включает аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO. 34, предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, и более предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 98%, или 99% и более; и аминокислотная последовательность DAP12-CD3 дзета показана как SEQ ID NO. 34.

В некоторых предпочтительных воплощениях полноразмерная последовательность

человеческого DAP10-DAP12-CD3 дзета включает аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO. 35, предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, и более предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 98%, или 99% и более; и аминокислотная последовательность DAP10-DAP12-CD3 дзета показана как SEQ ID NO. 35.

В некоторых предпочтительных воплощениях последовательность домена внутриклеточной передачи сигнала человеческого 41BB включает аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO. 36, предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, и более предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 98%, или 99% и более; а аминокислотная последовательность домена внутриклеточной передачи сигнала человеческого 41BB показана как SEQ ID NO. 36.

В некоторых предпочтительных воплощениях полноразмерная последовательность человеческого DAP10-41BB включает аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO. 37, предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, и более предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 98%, или 99% и более; и аминокислотная последовательность полноразмерной последовательности человеческого DAP10-41BB показана как SEQ ID NO. 37.

В некоторых предпочтительных воплощениях полноразмерная последовательность человеческого DAP10-41BB-CD3 дзета включает аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO. 38, предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, и более предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 98%, или 99% и более; и аминокислотная последовательность DAP10-41BB-CD3 дзета показана как SEQ ID NO. 38.

В некоторых предпочтительных воплощениях последовательность домена внутриклеточной передачи сигнала человеческого CD28 включает аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO. 39, предпочтительно аминокислотную

последовательность, которая имеет идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, и более предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 98%, или 99% и более; а аминокислотная последовательность домена внутриклеточной передачи сигнала человеческого CD28 показана как SEQ ID NO. 39.

В некоторых предпочтительных воплощениях полноразмерная последовательность человеческого DAP10-CD28 включает аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO. 40, предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, и более предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 98%, или 99% и более; и аминокислотная последовательность DAP10-CD28 показана как SEQ ID NO. 40.

В некоторых предпочтительных воплощениях полноразмерная последовательность человеческого DAP10-CD28-CD3 дзета включает аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO. 41, предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, и более предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 98%, или 99% и более; и аминокислотная последовательность DAP10-CD28-CD3 дзета показана как SEQ ID NO. 41.

В некоторых предпочтительных воплощениях полноразмерная последовательность человеческого DAP12-41BB включает аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO. 42, предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, и более предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 98%, или 99% и более; и аминокислотная последовательность полноразмерной последовательности человеческого DAP12-41BB показана как SEQ ID NO. 42.

В некоторых предпочтительных воплощениях полноразмерная последовательность человеческого DAP12-41BB-CD3 дзета включает аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO. 43, предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, и более предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 98%, или 99% и более; и аминокислотная последовательность человеческого DAP12-41BB-CD3

дзета показана как SEQ ID NO. 43.

В некоторых предпочтительных воплощениях полноразмерная последовательность человеческого DAP12-CD28 включает аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO. 44, предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, и более предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 98%, или 99% и более; и аминокислотная последовательность человеческого DAP12-CD28 показана как SEQ ID NO. 44.

В некоторых предпочтительных воплощениях полноразмерная последовательность человеческого DAP12-CD28-CD3 дзета включает аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO. 45, предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, и более предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 98%, или 99% и более; и аминокислотная последовательность человеческого DAP12-CD28-CD3 дзета показана как SEQ ID NO. 45.

В некоторых предпочтительных воплощениях компонент передачи сигнала CNK включает аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO. 25~45.

В некоторых предпочтительных воплощениях химерная белковая конструкция и компоненты рецептора, активирующего NK-клетки, и компоненты передачи сигнала CNK образуют многофункциональный комплекс, причем многофункциональный комплекс включает аминокислотную последовательность, как показано в SEQ ID NO. 117. В некоторых предпочтительных воплощениях многофункциональный комплекс включает аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO. 117, предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, и более предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 98%, или 99% и более; и аминокислотная последовательность многофункционального комплекса включает аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO. 117.

6. Молекулы Нуклеиновых Кислот

В другом отношении в настоящем раскрытии также предлагается химерная нуклеотидная конструкция, которая кодирует любую из химерных белковых конструкций, описанных в настоящей заявке.

Молекула нуклеиновой кислоты может включать дезоксирибонуклеиновую кислоту (ДНК), рибонуклеиновую кислоту (РНК), треозонуклеиновую кислоту (ТНК), гликолевую нуклеиновую кислоту (ГНК), пептидную нуклеиновую кислоту (ПНК), закрытую нуклеиновую кислоту (ЗНК, в том числе ЗНК с конфигурацией β -D-рибозы, α -ЗНК с конфигурацией α -L-рибозы (диастереоизомеры ЗНК), с 2'-аминофункционализированной 2'-амино-ЗНК и 2'-амино- α -ЗНК с 2'-аминофункционализацией), этиленнуклеиновую кислоту (ЭНК), циклогексенилнуклеиновую кислоту (CeNA) и/или химеры и/или их комбинации. Типичная ДНК включает, без ограничения указанным, плазмидную ДНК (пДНК) и т.д. Типичная РНК включает, без ограничения указанным, мРНК, кольцевую РНК и ссRNA.

В некоторых предпочтительных воплощениях молекула нуклеиновой кислоты представляет собой мРНК. мРНК относится к любой РНК, которая кодирует по меньшей мере один белок и способна продуцировать кодируемый белок *in vitro*, *in vivo*, *in situ* или *ex vivo*. Специалисты в данной области техники знают, что, если не указано иное, в последовательности нуклеиновой кислоты, описанной в настоящей заявке, может использоваться «Т» в репрезентативной последовательности ДНК, а в случае последовательности, представляющей РНК (например, мРНК), «Т» будет заменена на «U». Таким образом, любая ДНК, раскрытая и идентифицированная в настоящем документе по конкретному идентификационному номеру последовательности, также раскрывает соответствующую последовательность РНК (например, мРНК), комплементарную ДНК, где каждая «Т» последовательности ДНК заменена на «U».

В некоторых предпочтительных воплощениях молекула нуклеиновой кислоты включает нуклеотидную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с нуклеотидной последовательностью, показанной в SEQ ID NO. 118, предпочтительно нуклеотидную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, и более предпочтительно нуклеотидную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более.

В некоторых предпочтительных воплощениях молекула нуклеиновой кислоты включает нуклеотидную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с нуклеотидной последовательностью, показанной в SEQ ID NO. 160, предпочтительно нуклеотидную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, и более предпочтительно нуклеотидную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более. В некоторых предпочтительных воплощениях молекула нуклеиновой кислоты включает нуклеотидную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с нуклеотидной

последовательностью, показанной в SEQ ID NO. 162, предпочтительно нуклеотидную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, и более предпочтительно нуклеотидную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более. В некоторых предпочтительных воплощениях молекула нуклеиновой кислоты включает нуклеотидную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с нуклеотидной последовательностью, показанной в SEQ ID NO. 165, предпочтительно нуклеотидную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, и более предпочтительно нуклеотидную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более.

В некоторых предпочтительных воплощениях молекула нуклеиновой кислоты представляет собой мРНК, синтезированную *in vitro*. В некоторых предпочтительных воплощениях мРНК, синтезированная *in vitro*, имеет модификации, необязательно включая одну или несколько модификаций, выбранных из следующей группы: 5'UTR, 5'UTR, полиА-хвост, 5'-кэпированный и один или несколько модифицированных нуклеотидов в кодирующая область.

i) Модификация молекул нуклеиновой кислоты (например, мРНК).

Природные молекулы мРНК в эукариотической клетке могут содержать стабильные элементы, включая, без ограничения указанным, нетранслируемые области (UTR) на их 5'-конце (5'-UTR) и/или UTR на их 3'-конце (3'-UTR), а также другие структурные особенности, например, структура 5'-кэпа и 3'-полиА хвост. И 5'-UTR, и 3'-UTR обычно транскрибируются с геномной ДНК и являются частями преждевременной мРНК. Характерные структуры зрелых мРНК (например, структура 5'-кэпа и 3'-полиА хвост) часто добавляются к транскрибируемой (preterm) мРНК во время процессирования мРНК.

«5'UTR» относится к участку мРНК выше (т.е. 5') иницирующего кодона (т.е. первого кодона транскрипта мРНК, транслируемого рибосомой), который не кодирует полипептид. При генерации транскриптов РНК 5'-UTR может содержать последовательность промотора. Такие последовательности промотора известны в данной области. Понятно, что такие промоторные последовательности не будут присутствовать в молекулах нуклеиновой кислоты настоящего раскрытия.

«3' UTR» относится к участку мРНК ниже (т.е. 3') стоп-кодона (т.е. кодона транскрипта мРНК, указывающего на терминацию трансляции), который не кодирует полипептид.

«ПолиА-хвост» представляет собой участок мРНК, расположенный ниже по ходу транскрипции, например, непосредственно ниже 3'-UTR (т.е. 3'), содержащий множество последовательных аденозинмонофосфатов. ПолиА-хвост может содержать от 10 до 300

аденозинмонофосфатов. Например, полиА-хвост может содержать 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210., 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290 или 300 аденозинмонофосфатов. В некоторых воплощениях полиА-хвост содержит от 50 до 250 аденозинмонофосфатов. В соответствующих биологических средах (например, в клетках или *in vivo*) роль полиА-хвоста заключается в защите мРНК от ферментативной деградации (например, ферментативной деградации в цитоплазме) и содействии терминации транскрипции и/или выходу и трансляции мРНК из ядра. 3'-ПолиА-хвост обычно представляет собой сегмент адениновых нуклеотидов, добавленный к 3'-концу транскрибируемой мРНК. В некоторых случаях 3'-полиА-хвост может содержать примерно до 400 адениновых нуклеотидов. Длина 3'-полиА-хвоста может влиять на стабильность самой молекулы мРНК.

5'-Кэпирование полинуклеотидов может осуществляться одновременно во время реакции транскрипции *in vitro*, и, в зависимости от протоколов производителя, структура 5'-гуанозина кэпа может быть создана с помощью следующих химических аналогов кэпа РНК: 3'-O-Me-m7G (5') ppp(5')G[ARCA cap], G(5')ppp(5')A, G(5') ppp(5') G, m7G(5') ppp(5') A, m7G(5') ppp(5') G (New England Biolabs, Ипсвич, Массачусетс). 5'-Кэпирование модифицированной РНК можно осуществить после транскрипции с использованием фермента, кэпирующего вирус коровьей оспы, для получения структуры «Cap 0»: m7G(5')ppp(5')G (New England Biolab, Ипсвич, Массачусетс). Структуру Cap1 можно получить с использованием кэп-фермента вируса коровьей оспы и 2'-O-метилтрансферазы: m7G(5')ppp(5')G-2'-O-метил. Структура Cap2 может быть создана из структуры Cap1 с последующим 2'-O-метилением предпредпоследнего (5'-предпредпоследнего) нуклеотида с использованием 2'-O-метилтрансферазы. Структура Cap3 может быть создана из структуры Cap2 с последующим 2'-O-метилением последнего четвертого (5'-предпредпоследнего) нуклеотида с использованием 2'-O-метилтрансферазы. Ферменты могут быть получены из рекомбинантных источников.

Молекула мРНК, содержащая по крайней мере один из вышеупомянутых стабильных элементов, может значительно увеличить экспрессию кодируемого ею белка, а когда используются два или более из вышеупомянутых стабильных элементов, экспрессия белка с этой мРНК демонстрирует синергетический эффект по сравнению с мРНК с одним используемым стабильным элементом.

В некоторых воплощениях из мРНК, описанной в настоящем документе, удаляют одну или несколько последовательностей, богатых AU. Последовательности, богатые AU, также известные как AURES, представляют собой нестабильные последовательности, обнаруженные в 3'-UTR.

В некоторых воплощениях мРНК, описанная в настоящем раскрытии, дополнительно содержит открытую рамку считывания (ORF), кодирующую сигнальный пептид. Сигнальный пептид может содержать 15-60 аминокислот на N-конце белка, которые обычно необходимы для мембранного транспорта по секреторному пути, таким образом, в целом контролируя секреторные пути большинства белков в эукариотах и прокариотах. Длина сигнального пептида может составлять 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58 или 59 аминокислот.

«Открытая рамка считывания» представляет собой непрерывный участок ДНК, который начинается со стартового кодона (например, метионина (ATG)) и заканчивается стоп-кодоном (например, TAA, TAG или TGA) и кодирует полипептид.

Сигнальные пептиды, полученные из гетерологичных генов, известны в данной области техники и могут быть протестированы на предмет искомым свойств, а затем включены в нуклеиновые кислоты настоящего раскрытия. В некоторых воплощениях сигнальный пептид может включать одну из следующих последовательностей: MDSKGSSQKGSRLLLVSNLLLPQGVVG (SEQ ID NO.148), MDWTWILFLVAAATRVHS (SEQ ID NO.149), METPAQLLFLLLLWLPDTTG (SEQ ID NO.150), MLGSNSGQRVFTILLVAPAYS (SEQ ID NO.151), MKCLLYLAFLFIGVNCA (SEQ ID NO.152), MWLVSLAIVTACAGA (SEQ ID NO.153) и MFVFLVLLPLVSSQC (SEQ ID NO.154).

Молекулы нуклеиновой кислоты, представленные в настоящей заявке, можно синтезировать с помощью твердофазной технологии, жидкофазного химического синтеза, ферментативного лигирования и их комбинаций. Синтезированные молекулы нуклеиновой кислоты можно очистить и количественно оценить. Подробности можно увидеть в WO 2021222304, полное содержание которого включено в данную заявку ссылкой.

7. Вектор

В другом аспекте в настоящем раскрытии дополнительно предлагается вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты, представленную в настоящем раскрытии, где молекула нуклеиновой кислоты функционально связана по меньшей мере с одним полинуклеотидным регуляторным элементом (например, промотором) для экспрессии химерной белковой конструкции, кодируемой молекулой нуклеиновой кислоты.

В некоторых воплощениях вектор выбран из: плазмиды, наноплазмиды, космиды, вирусного вектора, миникольца, РНК-вектора или линейной или кольцевой ДНК (например, транспозонной ДНК) или молекул РНК.

В некоторых воплощениях вирусный вектор выбран из: ретровируса,

лентивирусного вектора, аденовируса, парвовируса (например, аденоассоциированного вируса), вектора на основе аденоассоциированного вируса (AAV), коронавируса, РНК-вируса с отрицательной цепью, такого как ортомиксовирус (например, вирус гриппа), рабдовируса (например, вирусов бешенства и везикулярного стоматита), парамиксовируса (например, Мачи и Сендай), РНК-вируса с положительной цепью, такого как пикорнавирус и альфавирус, и вируса с двухцепочечной ДНК, при этом вирус с двухцепочечной ДНК включает аденовирус, вирус герпеса (например, вирус простого герпеса типов I и II, вирус Эпштейна-Барр, цитомегаловирус) и вируса оспы (например, осповакцины, оспы кур и оспы канареек), вируса Норвалка, тогавируса, флавивируса, реовируса, паповавируса, гепаднавируса, бакуловируса и вируса гепатита, вирусоподобной частицы (VLP).

В некоторых воплощениях вирусный вектор представляет собой ретровирусный вектор.

В некоторых воплощениях ретровирусный вектор выбран из: вируса лейкопролиферативной саркомы птиц, вируса С-типа млекопитающих, вируса В-типа, вируса D-типа, коллекции HTLV-BLV, лентивируса, спумавируса.

В некоторых воплощениях вирусный вектор представляет собой лентивирусный вектор. В некоторых воплощениях вирусный вектор представляет собой онколитический вирусный вектор. Онколитический вирусный вектор относится к вирусному вектору на основе онколитического вируса, в который могут быть вставлены экзогенные последовательности нуклеиновой кислоты.

В некоторых воплощениях лентивирусный вектор выбран из HIV-1, HIV-2, SIV, FIV, BIV, EIAV, CAEV или лентивируса демиелинизирующего лейкоэнцефалита овец.

В некоторых воплощениях вектор представляет собой экспрессирующий вектор на основе транспозонов. Транспозон — это последовательность ДНК, которая может менять свое положение в геноме. В подсистеме транспозонов молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая представленную в данной заявке химерную белковую конструкцию, фланкирована концевыми повторами, распознаваемыми транспозазами, которые опосредуют движение транспозонов. Транспозазы могут доставляться совместно в виде белков, кодируемых тем же вектором, что и химерная белковая конструкция, или кодироваться на отдельных носителях. Неограничивающими примерами мобильных подсистем являются Sleeping Beauty, Piggyback, Frog Prince и Prince Charming.

В некоторых воплощениях вектор, представленный в настоящем раскрытии, можно комбинировать с другими векторами, причем другие векторы содержат другие молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие по меньшей мере один фрагмент коэкспрессии.

В некоторых предпочтительных воплощениях вектор дополнительно включает промотор; и предпочтительно, чтобы промотор представлял собой промотор EF1 α или промотор CMV.

В некоторых предпочтительных воплощениях химерная белковая конструкция, представленная в настоящем раскрытии, может быть экспрессирована в одном и том же векторе с фрагментом коэкспрессии, регулируемым одними и теми же или разными промоторами, или экспрессироваться во множестве векторов.

8. Клетка

В другом отношении в настоящем раскрытии также предлагается сконструированная клетка, которая экспрессирует химерную белковую конструкцию, как представлено в настоящем раскрытии, или содержит химерную конструкцию или нуклеотидный вектор, как предусмотрено в настоящем раскрытии.

В некоторых воплощениях сконструированная клетка одновременно экспрессирует химерную белковую конструкцию, представленную в настоящем раскрытии, и фрагмент коэкспрессии, описанный выше. Фрагмент коэкспрессии и домен, связывающий белок-мишень, химерной белковой конструкции могут быть объединены для достижения конкретной цели. Например, когда домен связывания белка-мишени специфически распознает белок, экспрессируемый на иммунных клетках, который может вызывать иммунное отторжение, фрагмент коэкспрессии может представлять собой белок, который дополнительно ингибирует иммунное отторжение (например, ЭПР-резидентный гликопротеин вируса и т. д.), белок, который воздействует на микроокружение опухоли (например, хемокиновые рецепторы и т. п.), или белок, который стимулирует иммунную активность (например, цитокины, белки зародышевой линии иммунных клеток CD7, CD5 и т. п.), и полученные клетки будут иметь сниженную иммуногенность (или иммунное отторжение) при трансплантации в организм человека и/или обладают повышенной иммунной активностью. Это полезно для клеточной иммунотерапии, а также для трансплантации других терапевтических клеток. Таким образом, клетки могут представлять собой иммунные клетки (например, Т-клетки), стволовые клетки, клетки почек, островковые клетки и кардиомиоциты и т. п.

В некоторых воплощениях клетка представляет собой иммунную клетку, выбранную из: Т-клетки, естественной клетки-киллера (NK), В-клетки, макрофага, моноцита, дендритной клетки, нейтрофила или $\gamma\delta$ Т-клетки. Сконструированная клетка может быть выбрана из группы, состоящей из: CD8⁺ Т-клетки, CD4⁺ Т-клетки, цитотоксической Т-клетки, терминальной эффекторной Т-клетки, Т-клетки памяти, наивной Т-клетки, группы клеток, состоящей из регуляторной Т-клетки, Т-клетки

натурального киллера, гамма-дельта Т-клетки, Т-клетки-киллера, индуцированной цитокинами (СИК), и лимфоцита, инфильтрирующего опухоль.

В некоторых воплощениях сконструированная клетка представляет собой Т-клетку. В случае экспрессии химерной белковой конструкции и фрагмента коэкспрессии, описанных выше, для получения Т-клетки со сниженной иммуногенностью и/или повышенной иммунной активностью, Т-клетка может дополнительно экспрессировать рецепторы, которые могут специфически нацеливаться на опухолевые маркеры, включая, без ограничения указанным, CAR, TCR, компоненты рецептора, активирующего НК-клетки, и т.п.

В некоторых воплощениях сконструированные клетки представляют собой Т-клетки, которые одновременно экспрессируют химерную белковую конструкцию, предусмотренную настоящим раскрытием и выбранную из одного или нескольких из следующих: E3-K19 аденовируса, CAR, рецептор, активирующий НК-клетки, и компоненты передачи сигнала CNK.

В некоторых воплощениях сконструированные клетки представляют собой Т-клетки, которые одновременно экспрессируют химерную белковую конструкцию, рецептор, активирующий НК-клетки, и, необязательно, компонент передачи сигнала CNK, как предусмотрено настоящим раскрытием.

В некоторых воплощениях сконструированные клетки представляют собой Т-клетки, которые одновременно экспрессируют химерную белковую конструкцию, аденовирус EK-K19 и CAR, как предусмотрено настоящим раскрытием.

С другой стороны, в настоящем раскрытии также предлагается способ создания сконструированной клетки (например, Т-клетки), описанной в настоящем документе, который включает введение вектора, описанного в настоящем документе, в условиях, подходящих для экспрессии молекулы нуклеиновой кислоты, описанной в настоящем документе, в иницирующую клетку.

Многие способы, известные в данной области техники для создания клеток CAR-T, также могут быть применены для создания сконструированных клеток, как описано в настоящем документе. Например, Zhang et al., *Engineering CAR-T cells*, *Biomarker Research* (2017) 5:22 описывает способ создания CAR-T-клеток. Способ, предложенный в настоящем документе, может включать одну или несколько из следующих стадий, выбранных из: получение клетки-инициатора, культивирование (включая размножение, необязательно включая активацию) клетки-инициатора и генетической модификации клетки. Иницирующая клетка может представлять собой стволовую клетку, причем стволовая клетка может представлять собой гемопоэтическую клетку-предшественник

(например, предшественник Т-клетки, предшественник NK-клетки, предшественник макрофага), гемопоэтическую стволовую клетку (HSC), клетку CD34+, линию эмбриональных клеток, мезенхимальную стволовую клетку или клетку iPSC. Иницирующая клетка также может представлять собой клетку, которая дифференцировалась из стволовой клетки, например, в описанную выше иммунную клетку.

Иницирующая клетка может быть получена из любого источника, например, иммунной клетки (например, Т-клетки), выделенной из субъекта (например, человека). В некоторых воплощениях иммунную клетку получают из представляющего интерес субъекта, например, субъекта, у которого подозревается наличие определенного заболевания или состояния, субъекта, у которого подозревается предрасположенность к определенному заболеванию или состоянию, субъекта, который будет страдать от него, в настоящее время страдает или лечился от конкретного заболевания или состояния, а также субъекта, который также может быть здоровым добровольцем или здоровым донором; а иммунные клетки также могут поступать из банков крови. Иммунная клетка может быть аутологичной или аллогенной по отношению к представляющему интерес субъекту. Иммунные клетки можно собирать из любого места, где они присутствуют у субъекта, включая, без ограничения указанным, кровь, пуповинную кровь, селезенку, тимус, лимфатические узлы, плевральный выпот, ткань селезенки, опухоли и костный мозг. Выделенные иммунные клетки можно использовать непосредственно или хранить в течение определенного периода времени, например, в замороженном виде.

Активация и/или пролиферация иммунных клеток является одним из основных стадий функционирования иммунных клеток. В некоторых воплощениях иммунные клетки активируются и пролиферируют одновременно до и/или после генетической модификации. В некоторых воплощениях иммунные клетки активируются и/или пролиферируют *in vitro*, *ex vivo* или *in vivo*. Способы активации и пролиферации иммунных клеток были описаны в данной области и могут быть использованы в способах, описанных в настоящем документе. Например, Т-клетки могут активироваться и пролиферировать посредством поверхностного контакта с агентами, прикрепляемыми к сигналам, связанным со стимуляцией комплекса CD3/TCR, и лигандами, стимулирующими костимулирующие молекулы на поверхности Т-клеток. В частности, популяцию Т-клеток можно стимулировать, например, путем контакта с анти-CD3 антителом или его антигенсвязывающим фрагментом или анти-CD2 антителом, иммобилизованным на поверхности, или путем контакта с активатором протеинкиназы С (например, фистиноидом), а также как ионофором кальция. Для совместной стимуляции

хелперных молекул на поверхности Т-клеток используются лиганды, связанные с хелперными молекулами. Например, в условиях, подходящих для стимуляции пролиферации Т-клеток, популяции Т-клеток могут вступать в контакт с анти-CD3 и анти-CD28 антителами. Для стимуляции пролиферации CD4⁺ Т-клеток или CD8⁺ Т-клеток можно использовать анти-CD3 антитела и анти-CD28 антитела. В некоторых воплощениях первичный сигнал стимуляции и сигнал костимуляции Т-клетки могут обеспечиваться с помощью разных протоколов.

Генетически модифицированные клетки могут быть получены путем трансдукции по существу гомогенных иницирующих клеток молекулами нуклеиновой кислоты, кодирующими химерные белковые конструкции, представленные в настоящем документе. В некоторых воплощениях ретровирусный вектор (например, лентивирусный вектор) используют для введения молекул нуклеиновой кислоты, представленных в настоящем документе, в иницирующие клетки. Например, молекулы нуклеиновой кислоты, представленные в настоящем документе, можно клонировать в лентивирусные векторы и экспрессировать с помощью их эндогенных промоторов, лентивирусных длинных концевых повторов или промоторов, специфичных для представляющего интерес типа клеток-мишеней. Обычные способы доставки, используемые для доставки вирусных векторов, включают, без ограничения указанным, электропорацию, микроинъекцию, генные пушки и магнитную трансфекцию.

Генетически модифицированные клетки также могут быть получены путем доставки молекул нуклеиновой кислоты с помощью ЛНЧ, как описано в подразделе «6. Молекулы нуклеиновых кислот» выше. Другие невирусные способы доставки нуклеиновых кислот включают трансфекцию *in vitro* с использованием фосфата кальция, DEAE-декстрана, электропорацию и слияние протопластов. Транспозазы или нуклеазы направленного действия (например, нуклеазы с цинковыми пальцами, мегануклеазы, нуклеазы TALE или CRISPR) также можно использовать для достижения генетической модификации исходной клетки, тем самым получая сконструированные клетки, как описано в настоящем раскрытии.

В некоторых воплощениях сконструированные клетки, представленные в настоящем документе, получают путем трансфекции молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих химерную белковую конструкцию, представленную в настоящем документе, в иницирующие клетки перед введением. В некоторых воплощениях сконструированные клетки, представленные в настоящем документе, можно получить путем трансфекции иммунных клеток молекулами нуклеиновой кислоты, кодирующими химерную белковую конструкцию, представленную в настоящем документе, например, с помощью вирусных

векторов. Сконструированные клетки, предложенные в настоящем документе, демонстрируют пониженную экспрессию иммуногенных молекул (например, TCR, HLA и т.п.) и/или иммуносупрессирующих молекул (например, PD-1 и т.п.) и/или повышенную экспрессию рецепторов, нацеленных на опухоль (например, CAR), сконструированные рецепторы TCR, CNK и т.п.) на поверхности клетки.

С другой стороны, в настоящем раскрытии также предлагается популяция клеток, полученная *ex vivo* вышеуказанными способами. В некоторых воплощениях по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% популяции клеток экспрессируют пептид-маркер экспрессии, представленный в настоящем документе (например, укороченный EGFR (EGFRt), расщепляемо связанный с описанной в данной заявке химерной белковой конструкцией). Уровень экспрессии укороченного EGFR может представлять собой уровни экспрессии описанных в данной заявке химерных белковых конструкций в клеточной популяции.

9. Фармацевтическая композиция и набор

В другом отношении в настоящем раскрытии предлагается фармацевтическая композиция или набор, который содержит (i) химерную белковую конструкцию, молекулу нуклеиновой кислоты, вектор или популяцию клеток, как описано в настоящем документе, и (ii) фармацевтически приемлемую среду. Термин «фармацевтически приемлемая среда» относится к любым и всем растворителям, дисперсионным средам, покрытиям, антимикробным и фунгицидным агентам, изотоническим агентам и агентам, замедляющим абсорбцию, и т.д., которые облегчают хранение и введение химерной белковой конструкции, молекулы нуклеиновой кислоты, экспрессирующего вектора и/или популяции клеток, представленных в настоящем документе, и фармацевтически приемлемые среды могут включать любой подходящий компонент, например, без ограничения указанным, физиологический раствор, липосомы, эксципиенты полимеризации, коллоиды или частицы носителя.

В некоторых воплощениях фармацевтически приемлемые среды представляют собой солевые растворы, которые могут растворять или диспергировать химерную белковую конструкцию, молекулу нуклеиновой кислоты, экспрессирующий вектор и/или популяцию клеток, предусмотренные настоящим раскрытием. Иллюстративные примеры солевых растворов включают, без ограничения указанным, буферный физиологический раствор, раствор сахарозы, нормальный физиологический раствор, ацетатный буфер, фосфатный буфер, цитратный буфер, бикарбонатный буфер, солевой раствор и раствор полисорбата.

i) Фармацевтическая композиция нуклеиновой кислоты

В некоторых воплощениях фармацевтически приемлемые среды представляют собой липосомы. Липосомы представляют собой моноламеллярные или многослойные везикулы с мембранами, образованными липофильными материалами и внутренней водной фракцией. Молекулы нуклеиновой кислоты и/или векторы, представленные в настоящем раскрытии, могут быть инкапсулированы в водную фракцию липосом. Типичные липосомы включают, без ограничения указанным, липосомы на основе 3-[N-(N',N'-диметиламиноэтан)карбамоил]холестерола (DC-Chlo), липосомы на основе N-(2,3-диолеоилокси)пропил-N,N,N-триметиламмоний хлорид (DOTMA) и липосомы на основе 1,2-диолеоилокси-3-триметилпропана (DOTAP). Способы получения липосом и инкапсулирования молекул нуклеиновой кислоты и/или векторов в липосомы хорошо известны в данной области техники (см., например, D.D. Lasic et al., *Liposomes in gene delivery*, published by CRC Press, 1997).

В некоторых воплощениях фармацевтически приемлемые среды представляют собой полимерные наполнители, включая, без ограничения указанным, микросферы, микрокапсулы, полимерные мицеллы и дендритные полимеры. Молекулы нуклеиновой кислоты и/или векторы, представленные в настоящем раскрытии, могут быть инкапсулированы, прикреплены или покрыты компонентами на основе полимеров способами, известными в данной области техники (см., например, W. Heiser, *Nonviral gene transfer techniques*, published by Humana Press, 2004; патент США 6025337; *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57(15):2177-2202(2005)).

В некоторых воплощениях фармацевтически приемлемые среды представляют собой коллоидные частицы или частицы-носители, например, коллоиды золота, наночастицы золота, наночастицы кремнезема и многосегментные наностержни. Молекулы нуклеиновой кислоты и/или векторы, предусмотренные в настоящем раскрытии, могут быть покрыты, прикреплены или связаны с носителем любым подходящим способом, известным в данной области техники (см., например, M. Sullivan et al., *Gene Therapy*, 10:1882–1890 (2003), C. McIntosh et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 123(31): 7626–7629 (2001), D. Luo et al., *Nature Biotechnology*, 18:893-895(2000) и A. Salem et al., *Nature Materials*, 2:668-671(2003)).

В некоторых воплощениях фармацевтическая композиция может дополнительно содержать добавки, включая, без ограничения указанным, стабилизаторы, консерванты и ускорители трансфекции, которые способствуют усвоению лекарственного средства клетками. Подходящие стабилизаторы могут включать, без ограничения указанным, глутамат натрия, глицин, EDTA и альбумин. Подходящие консерванты могут включать, без

ограничения указанным, 2-феноксиэтанол, бензоат натрия, сорбат калия, метилгидроксibenзоат, фенолы, тимеросал и антибиотики. Подходящие ускорители трансфекции могут включать, без ограничения указанным, кальций.

Фармацевтическую композицию, представленную в настоящем документе, можно вводить любым подходящим путем, известным в данной области техники, включая, без ограничения указанным, парентеральный, пероральный, энтеральный, буккальный, назальный, местный, ректальный, вагинальный, внутримышечный, интраназальный, трансмукозальный, эпидермальный, трансдермальный, дермальный, глазной, легочный и подкожный пути введения. Фармацевтическая композиция, представленная в настоящем документе, может быть введена субъекту в форме состава или препарата, подходящего для каждого пути введения. Составы, подходящие для введения фармацевтических композиций, могут включать, без ограничения указанным, растворы, дисперсии, эмульсии, порошки, суспензии, аэрозоли, спреи, капли в нос, составы на основе липосом, пластыри, имплантаты и суппозитории.

Препараты могут удобно находится в стандартных дозированных формах и могут быть приготовлены любым способом, хорошо известным в области фармации. Способ приготовления этих препаратов или фармацевтических композиций включает стадию добавления молекул нуклеиновой кислоты, описанных в настоящем раскрытии, в одну или несколько фармацевтически приемлемых сред и, необязательно, в одну или несколько добавок. Способы приготовления таких препаратов можно найти, например, в Remington's Pharmaceutical Sciences (Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19th ed., A.R. Gennaro(ed), Mack Publishing Co., N.J., 1995; R. Stribling et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA,89:11277-11281(1992); A.Barnes et al.,Current Opinion in Molecular Therapeutics 2000 2:87-93(2000); T.W.Kim et al.,The Journal of Gene Medicine,7(6):749-758(2005); и S.F. Jia et al., Clinical Cancer Research, 9:3462 (2003); A.Shahiwala et al., Recent patents on drug delivery and formulation,1:1-9(2007); ссылки из которых полностью включены в настоящий документ ссылкой).

В некоторых воплощениях молекула нуклеиновой кислоты (например, мРНК) может быть доставлена физически, биологически или химически (см., например, S. Guan, J. Rosenecker, Gene Ther. 2017, 24, 133.).

Физические способы включают, без ограничения указанным, доставку с помощью генных пушек (например, с частицами золота), электропорацию, акустическую перфорацию и т.д. (см., например, Kutzler et al., (2008) DNA vaccines: Ready for prime time? Nat Rev Genet 9:776–788; Geall et al., Nonviral delivery of self-amplifying RNA vaccines. Proc Natl Acad Sci US A.Sep.4,2012; 109(36):14604-9.).

Биологические способы включают, без ограничения указанным, доставку вирусными векторами (например, ретровирусными векторами, аденовирусными векторами, аденоассоциированными вирусными векторами).

Химические методы включают, без ограничения указанным, доставку через нативные белки/гликаны, полимеры, липиды. Типичные природные белки/гликаны включают протамин и хитозан (см., например, A.E. et al., *Cancer Immunol. Immunother.* 2015, 64, 1461; U.S. Kumar et al. *ACS Nano* 2021, 11, 17582). Примеры полимеров включают полиэтиленимин (PEI) (например, линейный PEI, разветвленный PEI и дендритный PEI), поли(β -аминоэфир) (PBAE) (см., например, K. Singha et al., *Nucleic Acid Ther.* 2011, 21, 133; A. A. Eltoukhy et al., *Biomaterials* 2012, 33, 3594).

Типичные липиды включают катионные липиды, такие как 1,2-диоктадеценил-3-триметиламмонийпропан (DOTMA) и 1,2-диолеоил-3-триметиламмонийпропан (DOTAP) (см., например, X. Hou et al., *Nat.Rev.Mater.* 2021, 10, 1078.), липосомы, образованные из DOTMA, DOTAP и DOPE (1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин, вспомогательные липиды), которые могут образовывать коллоидно стабильные наночастицы с мРНК после самосборки (см., например, L.M. Kranz et al., *Nature* 2016, 534, 396.).

Типичные липиды также могут представлять собой ионизируемые липиды. Ионизируемые липиды (pKa 6,5-6,9) представляют собой альтернативные липидные материалы, которые нейтральны при физиологическом pH, но положительно заряжены за счет протонирования свободных аминов в кислой среде (см., например, S.C. Semple et al., *Nat. Biotechnol.* 2010, 28, 172). После интернализации клетки наночастицы, образованные ионизируемыми липидами, инкапсулируются в эндосомах. В дальнейшем, благодаря постоянному снижению pH эндосом и лизосом, ионизированные липиды могут получать протоны для ионизации, способствуя тем самым слиянию липидных наночастиц (ЛНЧ) с эндосомальными мембранами, что в конечном итоге обеспечивает высвобождение мРНК, нагруженной на липидные наночастицы, в цитоплазму (см., например, L. Miao et al., *Mol.Cancer* 2021, 20, 41).

Ионизируемые липиды могут образовывать составы липидных наночастиц с холестерином, вспомогательными липидами и ПЭГилированными липидами (т.е. ПЭГилированными липидами). Холестерин — это природный жесткий и гидрофобный липид, который поддерживает структуру и стабильность липидных наночастиц. Он также может способствовать слиянию липидных наночастиц, нагруженных мРНК (т.е. наночастиц мРНК) с эндосомальными мембранами. Вспомогательные липиды, такие как цвиттерионный липид DOPE, 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DSPC) и 1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DOPC), широко используются для облегчения

проникновения через клеточные мембраны и эндосомального выхода из мембраны (см., например, N. Chaudhary et al., *Nat. Rev. Drug Discovery* 2021,20,817.). ПЭГилированные липиды состоят из ПЭГ и заякоривающих липидов. Гидрофильные ПЭГ в основном распределены на поверхности комплексов мРНК, тогда как гидрофобные участки встроены в липидные бислои. Введение ПЭГилированных липидов не только увеличивает период полужизни липидных наночастиц, но и корректирует размер частиц за счет изменения молекулярной массы цепи ПЭГ. Обычно молекулярная масса и длина липидного хвоста могут находиться в диапазоне от 350 до 3000 Да и от 10 до 18 атомов углерода, соответственно (см., например, N. Chaudhary et al., *Nat. Rev. Drug Discovery* 2021, 20, 817.).

За последние несколько десятилетий исследователи разработали большие библиотеки ионизируемых липидов для доставки мРНК, включая DLin-MC3-DMA, SM-102, TT3, C12-200, 3060 i10 и ALC-0315 (см., например, M. Yanez Arteta et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 2018, 115, E3351; R. Verbeke et al., *Controlled Release* 2021,333,511; B. Li et al., *Nano Lett.*2015,15,8099; K.A. Hajj et al., *Nano Lett.*2020,20,5167; K.A. Hajj et al., *Small* 2019,15,1805097; A.B. Vogel et al., *Nature* 2021,592,283). Некоторые из них достигли замечательных результатов в клиническом применении. Типичным примером является DLin-MC3-DMA, ключевой компонент Onpattro, одобренный Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA) для доставки миРНК (см., например, A. Akinc et al., *Nat. Nanotechnol.* 2019, 14, 1084). DLin-MC3-DMA также широко используется для доставки мРНК, включая замену белков и пептидов, редактирование генов и противовирусную инфекцию (см., например, R.S. Riley et al., *Sci.Adv.*2021, 7, eaba1028.). SM-102 и ALC-0315, две «звездные молекулы», были одобрены FDA в качестве ключевых компонентов вакцин BNT162b и mRNA-1273 для предотвращения COVID-19, соответственно (см., например, X. Hou et al., *Nat. Rev. Mater.* 2021, 10, 1078.).

Идеальный вектор мРНК на основе липидов должен отвечать следующим условиям: 1) голая мРНК может образовывать стабильные комплексы, защищающие мРНК от деградации; 2) для стабилизации комплекса мРНК необходимо добавить четыре ключевых компонента (ионизируемые липиды, холестерин, вспомогательные липиды и ПЭГилированные липиды); 3) компоненты липидных наночастиц должны быть протонированы, чтобы вызвать нестабильность мембраны и способствовать выходу из эндосом комплексов мРНК; 4) все липидные материалы биоразлагаемы и не причиняют вреда пациентам.

При оптимизации платформ доставки на основе липидов следует учитывать

следующие моменты: 1) способность к деградации ионизируемых липидов: скелетная структура липидов способствует клиренсу липидов и снижает токсичность за счет введения алкиновых и сложноэфирных групп в липидный хвост; 2) иммуногенность липидных наночастиц: гетероциклические липиды в составе липидных наночастиц могут повышать эффективность мРНК-вакцин путем активации пути стимулятора гена интерферона (STING) дендритных клеток (ДК) (см., например, L. Miao et al., *Nat. Biotechnol.* 2019, 37, 1174.); 3) стабильность липидных наночастиц: ожидается, что несколько многообещающих стратегий улучшат стабильность мРНК-вакцин, включая оптимизацию рКа, введение наполнителей, модификацию мРНК и т.д.

Липидные наночастицы можно получать с использованием компонентов, композиций и способов, известных в данной области техники, см., например, РСТ/US2016/052352, РСТ/US2016/068300, РСТ/US2017/037551, РСТ/US2015/027400, РСТ/US2016/047406, РСТ/US2016/000129, РСТ/US2016/014280, РСТ/US2016/014280, РСТ/US2017/038426, РСТ/US2014/027077, РСТ/US2014/055394, РСТ/US2016/052117, РСТ/US2012/069610, РСТ/US2017/027492, РСТ/US2016/059575 и РСТ/US2016/069491, все содержание которых включено сюда ссылкой.

ii) Онколитический вирус и его фармацевтическая композиция

В некоторых воплощениях настоящая заявка предоставляет онколитический вирус, способный экспрессировать химерную белковую конструкцию настоящей заявки. В настоящей заявке «онколитический вирус» означает любой вирус, способный инфицировать опухолевые клетки, реплицироваться в опухолевых клетках и лизировать опухолевые клетки. В некоторых воплощениях онколитический вирус дополнительно способен распространяться на другие опухолевые клетки в ходе непрерывного цикла репликации.

Онколитические вирусы могут быть получены из множества вирусов, и неограничивающие примеры включают вирус коровьей оспы, аденовирус, вирус простого герпеса 1 (HSV1), вирус простого герпеса 2 (HSV2), миксовирус, реовирус, полиовирус, вирус везикулярного стоматита (VSV), вирус кори (MV), вирус Ласса (LASV) и вирус болезни Ньюкасла (NDV), а также варианты этих вирусов.

В некоторых воплощениях в настоящей заявке предлагается онколитический вирус, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты, представленную в настоящем раскрытии, причем молекула нуклеиновой кислоты функционально связана по меньшей мере с одним полинуклеотидным регуляторным элементом (например, промотором) для экспрессии химерной белковой конструкции, кодируемой молекулой нуклеиновой кислоты.

В некоторых воплощениях онколитический вирус, описанный в настоящей заявке,

может инфицировать практически любой тип клеток. В некоторых воплощениях онколитический вирус может быть репликационно-селективным. Репликационно-селективный онколитический вирус реплицируется в опухолевых клетках чаще, чем в неопухолевых клетках.

Можно понять, что онколитический вирус может быть репликационно-селективным, если репликация вируса находится под контролем регуляторов экспрессии генов, например, областей энхансера/промотора, полученных с 5'-стороны гена альбумина (см., например, Miyatake et al., 1997), *J. Virol.* 71: 5124-5132).

В некоторых воплощениях онколитический вирус может иметь в своих геномах промоторы, специфичные для опухолевых клеток, или специфичные для опухолевых клеток регуляторные последовательности транскрипции. «Специфичность опухолевой клетки» для последовательностей промотора или транскрипционного термина означает, что они обычно присутствуют в опухолевой клетке-мишени на более высоких уровнях, чем в нормальных клетках. Таким образом, специфичность опухолевых клеток определяется уровнями усиления онколитического вируса.

Например, путем функционального присоединения гена HSV к промотору TGF- β основные транскрипционные единицы HSV можно поставить под транскрипционный контроль промотора фактора роста опухоли- β (TGF- β). Известно, что некоторые опухолевые клетки сверхэкспрессируют TGF- β по сравнению с неопухолевыми клетками того же типа. Таким образом, онколитический вирус, репликация которого контролируется транскрипцией промотора TGF- β , является репликационно-селективным, поскольку он реплицируется в некоторых опухолевых клетках больше, чем в неопухолевых клетках того же типа. Подобный репликационно-селективный онколитический вирус может быть получен с использованием любого модификатора экспрессии генов, который, как известно, избирательно вызывает сверхэкспрессию в пораженных клетках. Репликационно-селективный онколитический вирус может представлять собой, например, мутант HSV-1, у которого ген, кодирующий ICP34.5, мутирован или отсутствует. Онколитический вирус также может содержать другие модификации в своих геномах. Например, онколитический вирус может содержать дополнительную ДНК, встроенную в ген UL44. Эта вставка может вызвать функциональную инактивацию гена UL44 и результирующий фенотип расщепления, или она может быть вставлена в уже инактивированный ген или заменить отсутствующий ген.

В некоторых воплощениях онколитический вирус сконструирован таким образом, чтобы последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая химерную белковую конструкцию, описанную в настоящей заявке, находилась под контролем промотора,

специфичного для опухолевых клеток.

В некоторых воплощениях онколитический вирус сконструирован таким образом, чтобы гены, кодирующие по меньшей мере один белок, необходимый для репликации вируса, находились под контролем промоторов, специфичных для опухолевых клеток.

В некоторых воплощениях вектор онколитического вируса может экспрессировать химерную белковую конструкцию, описанную в настоящей заявке, и нацеливающий домен химерной белковой конструкции способен распознавать опухолевые белки и связываться с ними. Опухолевые белки могут представлять собой белки, которые высоко экспрессируются в опухолевых клетках (например, c-Myc, Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, KRAS), белки, экспрессируемые в опухолевых клетках, которые способствуют росту опухолевых клеток (например, рецепторы эстрогена, андрогенные рецепторы, Her2, VEGF, VEGFR, PDGFR β , EGFR, мутанты EGFR) или белки, которые способствуют выходу опухолевых клеток из-под нормальных иммунных ответов (например, PD-L1, TGF- β 1).

В некоторых воплощениях нацеливающий домен химерной белковой конструкции может связываться с Bcl-2. Можно использовать любой домен направленного воздействия, способный направленно связывать BCL-2. Например, без ограничения указанным, разработан BH1, который является высококонсервативным и гомологичным белкам-членам семейства антиапоптоза Bcl-2, в котором последовательность нуклеотида мотива BH2 может быть использована в качестве домена направленного воздействия для конструирования элементов ER-TPD, нацеленных на белки семейства Bcl-2; этот элемент клонирован и установлен на сильном онколитическом вирусном промоторе и специфически инфицирует опухолевые клетки; онколитические вирусы амплифицируются в больших количествах и экспрессируют элементы ER-TPD белков семейства Bcl-2, тем самым реализуя деградацию антиапоптотических белков-членов Bcl-2 в клетках, что непосредственно приводит к апоптозу опухолевых клеток.

В некоторых воплощениях домен направленного воздействия химерной белковой конструкции может связываться с VEGFR. Можно использовать любой домен направленного воздействия, способный направленно связывать VEGFR. Например, без ограничения указанным, путем соединения рекомбинантных scFv тяжелой и легкой цепей VEGFR-антитела (анти-VEGF-A антитела Бевацизумаб и анти-VEGFR2 антитела Рамуцизумаб) последовательно с элементом ER-TPD, конструируется направленно воздействующий на VEGFR элемент ER-TPD; элемент клонируют и загружают на сильный промотор онколитического вируса, и после специфического заражения опухолевых клеток онколитический вирус амплифицируется в больших количествах и экспрессирует элемент VEGFR ER-TPD, тем самым непосредственно ингибируя

экспрессию VEGFR в опухолевых клетках, что приводит к торможению роста и апоптозу опухолевых клеток из-за отсутствия достаточного количества питательных веществ.

В некоторых воплощениях домен направленного воздействия химерной белковой конструкции может связываться с TGF- β 1 и PD-L1. Можно использовать любой домен направленного воздействия, способный направленно связывать BCL-2. Например, без ограничения указанным, элементы ER-TPD, нацеленные на TGF- β 1 и PD-L1, конструируют путем соединения рекомбинантных тяжелой и легкой цепей из scFv с использованием антител против TGF- β 1 и PD-L1 последовательно с элементами ER-TPD; элемент клонируют и загружают после сильного промотора онколитического вируса, и после специфического заражения опухолевых клеток онколитический вирус амплифицируется в больших количествах и экспрессирует элементы TGF- β 1 и PD-L1 ER-TPD, тем самым напрямую ингибируя и ухудшая экспрессию TGF- β 1 и PD-L1 в опухолевых клетках, нарушая иммуносупрессивное микроокружение опухоли, тем самым достигая эффекта лечения опухолей.

Неограничивая себя теорией считаем, что химерная белковая конструкция настоящей заявки имеет уникальное преимущество при экспрессии ее в опухолевых клетках с помощью онколитических вирусных векторов. С одной стороны, химерная белковая конструкция по настоящей заявке нацелена на деградацию белка в опухолевой клетке, чтобы помочь росту опухолевой клетки или ускользанию от иммунитета, или антиапоптозному белку, способствуя апоптозу или гибели опухолевой клетки. С другой стороны, онколитические вирусные векторы могут специфически реплицироваться в опухолевых клетках, способствуя лизису опухолевых клеток посредством репликации и лизиса вируса, объединяя два различных метода уничтожения опухолей в онколитических вирусных векторах и достигая синергического уничтожения в одной и той же лекарственной форме.

В другом отношении в настоящем раскрытии также предлагается фармацевтическая композиция, содержащая онколитические вирусы и фармацевтически приемлемые среды, предусмотренные настоящим раскрытием. В некоторых воплощениях фармацевтически приемлемые среды включают любые транспортные среды, растворители, разбавители, эксцipienty, адьюванты, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и фунгицидные агенты, абсорбенты и т.д., которые совместимы с введением млекопитающим и, в частности, людям.

В некоторых воплощениях онколитический вирус или его фармацевтическая композиция, описанные в настоящей заявке, составлены для внутривенного или внутриопухолевого введения. В некоторых воплощениях онколитические вирусы или их

фармацевтические композиции могут быть помещены в растворители или разбавители, подходящие для применения у людей или животных. Растворители или разбавители предпочтительно являются изотоническими, гипотоническими или слабогипотоническими и имеют относительно низкую ионную силу. Типичные примеры включают стерильную воду, физиологический раствор (например, хлорид натрия), раствор Рингера, растворы глюкозы, трегалозы или сахарозы, раствор Хэнка и другие водные физиологически сбалансированные солевые растворы.

В одном воплощении онколитический вирус или его фармацевтическая композиция, описанные в настоящей заявке, могут содержать буферный агент. Подходящий буферный агент включает, без ограничения указанным, фосфатные буферы (например, PBS), бикарбонатные буферы и/или трис-буферы, способные поддерживать физиологически или слабощелочной pH (например, от примерно pH 7 до примерно pH 9).

В одном воплощении онколитическая вирусная композиция по настоящему изобретению может быть приготовлена для улучшения ее стабильности, особенно ее стабильности в производственных условиях и в течение длительного (т.е. по меньшей мере 6 месяцев, предпочтительно по меньшей мере 2 лет) замороженного хранения (например, $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ или $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) хранения в холодильнике (например, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$) или хранения при комнатной температуре. Различные вирусные агенты, существующие в данной области техники, представляют собой либо замороженные жидкие формы, либо лиофилизированные формы (например, WO98/02522 и WO2008/114021 и т.п.). Твердая (например, сухая порошковая или лиофилизированная) композиция может быть получена на стадии, включающей вакуумную сушку и лиофилизацию. В иллюстративных целях для консервации вирусов особенно подходят буферные препараты с NaCl и сахаром.

iii) Цитофармацевтическая композиция

В другом отношении в настоящем раскрытии также предлагается цитофармацевтическая композиция, содержащая сконструированные клетки или популяцию клеток и фармацевтически приемлемую среду, предусмотренную настоящим раскрытием. Примеры сред включают: буферные агенты, такие как нейтральный буферный раствор, фосфатно-солевой буферный раствор и т.п.; углеводы, такие как глюкоза, манноза, сахароза или декстран, маннитол; белок; пептиды или аминокислоты, такие как глицин; антиоксидант; хелатирующие агенты, такие как EDTA или глутатион; адъюванты (например, гидроксид алюминия); и консерванты. В одном отношении цитофармацевтическая композиция по настоящему изобретению составлена для внутривенного введения.

III. Применимость TPD

В одном аспекте в настоящем раскрытии также предлагается применение химерных белковых конструкций, молекул нуклеиновой кислоты или векторов, описанных в настоящей заявке, при подготовке клеток для лечения. В другом аспекте в настоящем раскрытии также предлагается применение химерных белковых конструкций, молекул нуклеиновой кислоты или векторов, описанных в настоящей заявке, при лечении заболевания. В одном аспекте в настоящем раскрытии также предлагается применение клеток, экспрессирующих химерные белковые конструкции, молекулы нуклеиновой кислоты или векторы, описанные в настоящей заявке, при лечении заболевания.

1. Трансплантация клеток

В одном аспекте в настоящем раскрытии также предлагается применение химерных белковых конструкций, молекул нуклеиновой кислоты или векторов, описанных в настоящей заявке, при подготовке клеток для трансплантации (например, трансплантация аллогенных клеток).

В некоторых воплощениях трансплантируемые клетки представляют собой иммунные клетки (например, Т-клетки), стволовые клетки (и клетки, полученные в результате их дифференцировки), клетки почек, островковые клетки, кардиомиоциты и т.д. В некоторых воплощениях трансплантируемые клетки могут представлять собой аутологичные клетки или аллогенные клетки.

В одном аспекте в настоящей заявке также предлагается клетка, подлежащая трансплантации, которая экспрессирует химерную белковую конструкцию, молекулу нуклеиновой кислоты или вектор, описанные выше, экспрессирует химерную белковую конструкцию настоящей заявки, причем химерная белковая конструкция содержит домен, связывающий белок механизма ERAD, и домен направленного воздействия, причем домен направленного воздействия содержит домен, который специфически нацеливается на белок-мишень или связывается с ним, и белок-мишень представляет собой белок, связанный с отторжением трансплантата. В некоторых воплощениях химерные белковые конструкции дополнительно содержат домен, связывающий участника пути деградации белков (например, убиквитинлигазы E3, протеасомы, лизосомы), описанный в настоящей заявке. Можно использовать любой домен, связывающий участника пути деградации белков, описанный в настоящей заявке.

В некоторых воплощениях белки, связанные с отторжением трансплантата, включают: антигенпрезентирующую молекулу (например, молекулу МНС класса I, молекулу МНС класса II, молекулу МICA/B и т.п.), молекулу распознавания антигена (например, TCR, CD123, NKG2D и т.п.), молекулу иммунной контрольной точки (например, PD-1, PD-L1, CTLA4, TIM3, TIGIT, LAG3, A2AR, BTLA, IDO1, IDO2, TDO,

KIR, NOX2, VISTA, SIGLEC7, PVR и т.п.) и т.п.

В некоторых воплощениях белок, связанный с отторжением трансплантата, содержит иммуногенный белок (например, HLA (HLA α/β), TCR ($\alpha\beta$ TCR), лиганд NKG2D (представитель D группы естественных клеток-киллеров-2) и т.п.).

В настоящем раскрытии также предлагаются вышеупомянутые клетки, подлежащие трансплантации, и способы их обработки, которые могут решить проблемы источника персонализированных трансплантированных клеток и терапевтических клеток, невозможность стандартизировать и масштабировать производство, а также низкую эффективность лечения, с которой сталкиваются существующие трансплантация клеток и клеточная терапия.

Иммунная система очень пластична и обладает практически безграничной способностью обнаруживать вторгающиеся вирусы, бактерии, ксенологичные и больные клетки. Эта замечательная способность к иммунологическому надзору достигается в первую очередь за счет гуморального иммунитета и клеточного иммунитета, в состав которого входят две важные молекулярные структуры: иммуноглобулины и T-клеточные рецепторы (TCR). TCR, определяющая структуру T-клеток, представляет собой трансмембранный гетеродимер, состоящий либо из альфа- и бета-цепи, либо из дельта- и гамма-цепи, связанных дисульфидной связью. Внутри этих цепей комплементарно определяющие области (CDR) определяют антиген, с которым будет связываться TCR. В TCR субъединицы TCR α и TCR β (или TCR γ и TCR δ в $\gamma\delta$ T-клетках) отвечают за распознавание главного комплекса гистосовместимости (MHC)/антигенного лиганда.

Область гена MHC класса I человека включает аллели сайтов HLA-A, B, C, которые кодируют классический антиген (молекулу) класса I, например, антиген HLA-A, антиген B и антиген C и т.д., известные как HLA-A, HLA-B и HLA-C. Эти молекулы антигена присутствуют на поверхности всех соматических клеток и связываются с внутриклеточными белковыми эпитопными пептидами для распознавания иммунной системой. Если клетки продуцируют мутантные белки или вторгаются чужеродные бактерии или вирусы, клетки представляют эти мутантные белки или гетерологичные белковые эпитопы, иммунные клетки распознают их и осуществляют иммунную атаку и убивают, тем самым удаляя больные клетки, микробы и вирусы, проникающие в клетки.

Альфа/бета-T-лимфоциты распознают лиганды пептид-MHC с помощью мультимерного белкового ансамбля, называемого комплексом $\alpha\beta$ -T-клеточного антигенного рецептора (TCR).CD3. Эта структура состоит из варибельного димера $\alpha\beta$ TCR, который связывает антигены, и трех инвариантных димеров (CD3 $\gamma\epsilon$, $\delta\epsilon$ и $\zeta\zeta$), которые участвуют в поверхностном транспорте TCR.CD3, стабилизации и передаче сигнала.

Рецептор альфа-бета Т-клеток ($\alpha\beta$ TCR) экспрессируется на большинстве (около 95%) Т-клеток и играет решающую роль в активации Т-клеток посредством распознавания антигена, заякоренного в главном комплексе гистосовместимости (МНС). Таким образом, TCR-опосредованная активация Т-клеток является ключевым этапом патогенеза реакции трансплантат против хозяина (РТПХ) во время аллогенной трансплантации гемопоэтических клеток (алло-НСТ) и терапии аллогенными CAR-Т-клетками.

Система или комплекс человеческого лейкоцитарного антигена (HLA) представляет собой группу родственных белков, которые кодируются генным комплексом главного комплекса гистосовместимости (МНС) у человека. Эти белки клеточной поверхности отвечают за регуляцию иммунной системы. В условиях терапевтической трансплантации «несоответствие HLA» происходит, когда HLA донора на аллотрансплантате отличается от HLA реципиента. Несовпадение HLA приводит к активации аллореактивных Т-клеток, что может вызвать острое клеточное отторжение (ACR) в течение шести месяцев после трансплантации. Несовпадающие донорные антигены HLA также являются мишенями для выработки донор-специфичных HLA-антител *de nova* (dnDSA), которые играют повышенную роль как в остром, так и в хроническом отторжении трансплантированных клеток (например, Т-клеток). Следовательно, для создания универсальных трансплантационных клеток (например, Т-клеток) для безопасной аллогенной инфузии и терапевтических целей целесообразно эффективно блокировать реакцию «трансплантат против хозяина» (РТПХ) путем генетического разрушения TCR. Кроме того, необходимо ингибировать экспрессию HLA на аллогенной клетке (например, Т-клетке), чтобы уменьшить отторжение иммунной системой реципиента аллогенных Т-клеточных TCR $\alpha\beta$ и/или HLA класса I аллогенных Т-клеток.

В некоторых воплощениях химерные белковые конструкции, молекулы нуклеиновой кислоты или векторы, описанные выше, обладают пониженной иммуногенностью.

В некоторых воплощениях трансплантируемые клетки, обладающие пониженной иммуногенностью (или имеющие высокую степень совместимости), описанные в настоящей заявке, представляют собой Т-клетки, которые экспрессируют химерную белковую конструкцию TPD, содержащую трансмембранный домен или его функциональный вариант, специфически распознающие TCR и/или HLA и гликопротеин US2 и/или US11 HCMV и домен, резидентный в эндоплазматическом ретикулуме, или его функциональный вариант.

Домен, связывающий белок механизма ERAD, содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO. 76 или SEQ ID NO.82, или аминокислотную

последовательность, которая имеет по меньшей мере 80% (например, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99%) идентичности с ней.

В некоторых воплощениях трансплантируемые клетки с пониженной иммуногенностью представляют собой Т-клетки, экспрессирующие химерные белковые конструкции ER-TPD, содержащие трансмембранные домены scFv, специфически распознающие TCR и E3-K19 аденовируса или их функциональные варианты, и домены, резидентные в эндоплазматическом ретикулуме, или их функциональные варианты. В некоторых воплощениях трансплантируемая клетка, имеющая пониженную иммуногенность, представляет собой Т-клетку, экспрессирующую химерную белковую конструкцию ER-TPD, содержащую домен, связывающий белок-мишень, и домен, связывающий белок механизма ERAD, причем домен, связывающий белок-мишень, включает 6 CDR, содержащих аминокислотную последовательность, как показано в SEQ ID NO:116, или аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность по меньшей мере 80% (например, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99%). Домен, связывающий белок механизма ERAD, содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO. 60 или аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность по меньшей мере 80% (например, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99%).

В некоторых воплощениях химерная белковая конструкция ER-TPD с пониженной иммуногенностью, экспрессируемая Т-клеткой, дополнительно содержит домен, связывающий участника пути деградации белков (например, убиквитинлигазы E3, протеасомы), и, необязательно, домен, связывающий участника пути деградации белков, соединенный с доменом, связывающим белок механизма ERAD. В некоторых воплощениях химерная белковая конструкция ER-TPD с пониженной иммуногенностью, экспрессируемая Т-клеткой, дополнительно содержит связывающий домен убиквитинлигазы E3, имеющий аминокислотную последовательность, как показано в SEQ ID NO.147.

В некоторых воплощениях описанные выше клетки, подлежащие трансплантации, со сниженной иммуногенностью (например, Т-клетки) также экспрессируют фрагмент коэкспрессии, как описано выше.

Например, чтобы снизить иммуногенность или презентацию антигена в клетках, белки, способные разрушать или восстанавливать молекулы МНС класса I или II, могут экспрессироваться в клетках, подлежащих трансплантации (например, Т-клетках), со

сниженной иммуногенностью в виде фрагментов коэкспрессии (например, интактных вирусных гликопротеинов, резидентных в ЭПР, включая, без ограничения указанным, US2, US3, US11, US10 из HCMV, E3-K19 аденовируса, US6 HCMV и ICP47 HSV). Эффективное подавление TCR может значительно ингибировать TCR-опосредованную иммунную атаку и снизить РТПХ во время аллогенной трансфузии Т-клеток. Гликопротеины, включающие нативную резидентность вирусного ЭПР, могут дополнительно ингибировать молекулы МНС, тем самым предотвращая презентацию пептида CD8⁺ Т-клеткам реципиента и ингибируя иммунное распознавание аллогенными Т-клетками. Таким образом, высокосовместимые Т-клетки, также известные как «универсальные Т-клетки (UT)», как описано выше, могут достигать целей аллогенной трансфузионной терапии и могут улучшить совместимость аллогенных Т-клеток и долговечность после инфузии.

В другом аспекте в настоящем раскрытии предлагается способ снижения иммунного ответа субъекта на трансплантацию клеток, включающий введение терапевтически эффективного количества клеток, подлежащих трансплантации, как описано выше, имеющих пониженную иммуногенность по отношению к субъекту, тем самым снижая иммунный ответ субъекта на трансплантат или на модифицированную клетку. В некоторых воплощениях клетки, подлежащие трансплантации, экспрессируют внутри клетки химерную белковую конструкцию TPD, описанную в настоящем документе, причем химерная белковая конструкция TPD содержит домен, нацеленный на иммуногенные белки (например, HLA (HLA α/β), TCR ($\alpha\beta$ TCR), NKG2D (представитель D группы естественных клеток-киллеров-2 и т.п.) и домен, связывающий белок механизма ERAD, описанный выше, и, необязательно, домен, связывающий участника пути деградации белка.

2. Клеточная терапия

Клеточная терапия с помощью технологии генной инженерии для модификации клеток (например, иммунных клеток) так, чтобы они могли презентировать антигены, связанные с опухолью, или экспрессировать рецепторы, которые специфически распознают болезненные клетки, с последующим введением их пациентам после экспоненциального размножения *in vitro*, активируя иммунную систему *in vivo* для атаки опухолевых клеток или прямого специфического распознавания и уничтожения клеток болезни. В 2012 году CAR-T-клетки, нацеленные на CD19, достигли первого в истории медицины целенаправленного удаления опухолевых клеток у пациентов с В-клеточным лейкозом, став еще одной технологией лечения, которая действительно может вылечить лейкоз после технологии лечения трансплантацией стволовых клеток костного мозга, открыв новую эру прецизионной клеточной терапии. Ожидается, что эта технология

найдет применение для лечения различных гематологических опухолей и солидных опухолей. Однако текущая клиническая эффективность обычного CAR-T при лечении солидных опухолей недостаточна, и причины заключаются в следующем: (1) функция уничтожения CAR-T сильно зависит от распознавания опухолеассоциированного антигена (ТАА) по структуре CAR, но из-за гетерогенности солидных опухолей экспрессия белков-мишеней на поверхности опухолевых клеток сильно различается; в настоящее время CAR-T против одиночной мишени не может полностью распознать и уничтожить все опухолевые клетки, что приводит к уклонению от иммунитета и рецидивирующему метастазированию опухолей; (2) существует прямой иммуносупрессивный эффект солидных опухолей, экспрессирующих PD-L1, B3H7 и т.д., непосредственно ингибирующих активацию Т-клеток; (3) в иммуносупрессивном микроокружении солидных опухолей имеется большое количество иммуносупрессивных клеток, например, TAM, Treg, MDSC, и при разработке обычного CAR-T трудно преодолеть ограничения иммуносупрессивных клеток внутри опухоли; (4) традиционная CAR-T представляет собой персонализированную клеточную терапию, то есть Т-клетки исходят от самого пациента, и если пациент получил большое количество лучевой терапии, химиотерапии и т.д., функция иммунной системы нарушается, и поэтому трудно выделить достаточное количество Т-клеток из периферической крови пациента, даже если эти клетки выделены и модифицированы; функция пролиферации и уничтожения Т-клеток все еще очень слаба, поэтому трудно оказать терапевтический эффект.

Клетки, подлежащие трансплантации (например, Т-клетки), представленные в настоящей заявке, способны преодолеть проблемы изменчивости опухолевых мишеней, иммуносупрессивной среды опухоли, индивидуального источника лечебных клеток и другие проблемы, с которыми сталкиваются при существующей клеточной терапии.

Для целей клеточной терапии клетки, подлежащие трансплантации, со сниженной иммуногенностью (например, Т-клетки, а также универсальные Т-клетки с дефектами экспрессии на поверхности молекул TCR $\alpha\beta$ и МНС) могут быть дополнительно подвергнуты генетической инженерии, например, для экспрессии фрагмента коэкспрессии, описанного выше, для достижения терапевтических целей.

Например, чтобы дать возможность трансплантируемой клетке (например, Т-клетке) действовать специфически на белок-мишень, связанный с заболеванием, или на клетку, экспрессирующую белок-мишень, связанный с заболеванием, связывающий домен или молекула, которая распознает или связывается с белком-мишенью, связанным с заболеванием, может экспрессироваться в клетке, подлежащей трансплантации (например, Т-клетке), обладающей пониженной иммуногенностью, например, химерный антигенный

рецептор CAR, сконструированный рецептор TCR или CNK, представленный в настоящей заявке, или домен, связывающий противовирусный белок, и т.д.

В некоторых воплощениях молекулы, способные опосредовать миграцию заболевания, подлежащего трансплантации, в микроокружение заболевания (например, хемокиновые рецепторы или рецепторы цитокинов), также могут экспрессироваться в описанных выше клетках, подлежащих трансплантации (например, Т-клетках), со сниженной иммуногенностью.

В качестве другого примера, чтобы дать возможность клеткам, подлежащим трансплантации (например, Т-клеткам), обладать повышенной иммуностимулирующей активностью, иммуностимулирующие молекулы могут быть экспрессированы в вышеупомянутых клетках, подлежащих трансплантации, имеющих пониженную иммуногенность (например, Т-клетки).

В другом аспекте в настоящей заявке также предлагается, чтобы НК-элементы, особенно оптимизированные рекомбинантные НК-элементы, вводились в клетки, подлежащие трансплантации (например, УТ-клетки), предусмотренные настоящей заявкой, так чтобы Т-клетки могли быть столь же эффективными, как и НК-клетки, при распознавании всех инфицированных вирусом клеток и опухолевых клеток, необязательно, дополнительно обеспечивать способность CNK-Т-клеток эффективно активировать и убивать опухолевые клетки путем оптимизации элемента трансдукции. Поскольку мишени НК, включая белки семейства, такие как MICA, MICB, ULBP1–6 и т.д., могут широко экспрессироваться в различных опухолевых клетках и охватывать разные стадии прогрессирования опухоли, технология CNK может эффективно решить проблему нецелевого эффекта одиночного CAR-T и исключить вероятность ускользания опухоли от иммунитета. Кроме того, химерный адаптер, введенный CNK в конструкцию, может эффективно преобразовывать и усиливать сигналы НК, преодолевать ограничения иммунных контрольных точек, например, сигналов PD1, эффективно активировать Т-клетки и достигать уничтожения опухолевых клеток. Химерный адаптер усиливает сигналы CNK-Т-клеток и способен противостоять иммуносупрессии в опухолевой среде, осуществлять активацию Т-клеток и осуществлять уничтожение опухолевых клеток. Затем CNK-Т-клетки распознают мишени через НК, а также могут очищать иммуносупрессивные клетки, например, MDSC. После того как вирус инфицирует клетки и экспрессирует специфические функциональные белки, сборка или транспорт МНСI непосредственно способствует направленной деградации молекул МНСI, тем самым ингибируя презентацию эпитопов вирусного антигена и вызывая ускользание от иммунной системы.

В одном аспекте в настоящем раскрытии предлагается UT-клетка, которая также экспрессирует рецептор CNK и, необязательно, CAR, такие UT-клетки также могут называться «CNKT-UT». В этой заявке подтверждено, что CNK-UT обладает возможностями идентификации и уничтожения опухолей широкого спектра. В этой заявке дополнительно разрабатываются химерные специфические целевые продукты CAR/CNK-UT, демонстрируя, что продукты CAR/CNK-UT обладают более мощными функциями уничтожения и активации опухолевых клеток, чем обычные CAR-T. В экспериментах на животных продукты CAR/CNK-UT также обладают более эффективными способностями к удалению опухолей. Технология UT реализует аллогенную универсальную трансформацию, T-клетки получают здоровых доноров, чтобы реализовать стандартизацию и крупномасштабное производство продуктов CNK-UT, которые можно получить заранее, и обеспечить функцию T-клеток по уничтожению и активации опухолевых клеток.

В некоторых предпочтительных воплощениях CNKT-UT включает молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую аминокислотную последовательность, имеющую 80% или более идентичности с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO. 117, предпочтительно аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более. В некоторых предпочтительных воплощениях CNKT-UT включает молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO. 117. В другом аспекте в настоящем раскрытии также предлагается применение CNKT-UT при приготовлении лекарственных средств для лечения заболеваний.

В одном аспекте в настоящем раскрытии также предлагается иммунная клетка, содержащая или экспрессирующая химерную белковую конструкцию, кодирующую ее молекулу нуклеиновой кислоты или вектор, описанный в настоящей заявке, где химерная белковая конструкция содержит домен, связывающий белок механизма ERAD, и нацеливающий домен, при этом нацеливающий домен включает домен, который специфически нацеливается на белок-мишень или связывается с ним, и белок-мишень экспрессируется как на иммунной клетке, так и на клетке-мишени. В некоторых воплощениях иммунная клетка дополнительно содержит или экспрессирует связывающий домен или молекулу (например, CAR), нацеленную на белок-мишень, молекулу нуклеиновой кислоты или вектор, кодирующий его. В некоторых воплощениях примеры таких белков-мишеней включают CD123, CD5, CD7, CD38 или CD4.

Не ограничивая себя теорией считаем, что некоторые белки-мишени экспрессируются как на клетках-мишенях, например, клетках злокачественной опухоли

или клетках, инфицированных вирусом, так и на иммунных клетках, используемых для лечения. Такие мишени часто трудно лечить с помощью клеточной терапии, и поэтому, когда иммунные клетки, используемые для лечения, экспрессируют CAR, нацеленный на такие мишени, CAR может также привести к распознаванию той же мишени, экспрессируемой самими иммунными клетками, что приводит к аутофагии иммунных клеток, которые не могут нормально размножаться или имеют ограниченный эффект уничтожения клеток-мишеней. С помощью химерной белковой конструкции, предложенной в настоящей заявке, белок-мишень, экспрессируемый самой иммунной клеткой, может быть разрушен, тем самым избегая аутофагии, сохраняя при этом специфический поражающий эффект на клетку-мишень. Еще одним преимуществом использования химерной белковой конструкции по настоящей заявке является то, что химерная белковая конструкция, нацеленная на мишень, и связывающий домен, нацеленный на мишень (например, CAR, TCR и т.п.), могут быть экспрессированы одновременно путем коэкспрессии, что проще и более эффективно, чем традиционные способы нокаута генов.

В некоторых воплощениях химерные белковые конструкции дополнительно содержат домен, связывающий участника пути деградации белков (например, убиквитинлигазы E3, протеасомы, лизосомы), описанный в настоящей заявке. Можно использовать любой домен, связывающий участника пути деградации белков, описанный в настоящей заявке.

Способ введения клеток для адоптивной клеточной терапии известен и может комбинироваться с предложенными способами и композициями. Например, способы адоптивной Т-клеточной терапии описаны в патентной заявке США № 2003/0170238 (Gruenberg et al.); например, патент США № 4690915 (Rosenberg); и Rosenberg (2011) *Nat Rev Clin Oncol*.8(10):577-85). Подробности можно увидеть, например, в Themeli et al. (2013), *Nat Biotechnol*.31(10): 928-933; Tsukahara et al. (2013), *Biochem Biophys Res Commun* 438(1): 84-9; Davila et al. (2013) *PLoS ONE* 8(4): e61338.

В некоторых воплощениях индивидуальную популяцию или подтип клеток или клеток вводят субъекту в диапазоне от около одного миллиона до около ста миллиардов клеток, например, от 1 миллиона до около 50 миллиардов клеток (например, около 5 миллионов клеток, около 25 миллионов клеток, около 500 миллионов клеток, около 1 миллиарда клеток, около 5 миллиардов клеток, около 20 миллиардов клеток, около 30 миллиардов клеток, около 40 миллиардов клеток или диапазон, определяемый любым из двух вышеуказанных значений), например, около от 10 миллионов до около 100 миллиардов клеток (например, около 20 миллионов клеток, около 30 миллионов клеток,

около 40 миллионов клеток, около 60 миллионов клеток, около 70 миллионов клеток, около 80 миллионов клеток, около 90 миллионов клеток, около 10 миллиардов клеток, около 25 миллиардов клеток, около 50 миллиардов клеток, около 75 миллиардов клеток, около 90 миллиардов клеток или диапазон, определяемый любым из двух вышеуказанных значений), а в некоторых случаях от около 100 миллионов клеток до около 50 миллиардов клеток (например, около 120 миллионов клеток, около 250 миллионов клеток, около 350 миллионов клеток, около 450 миллионов клеток, около 650 миллионов клеток, около 800 миллионов клеток, около 900 миллионов клеток, около 3 миллиардов клеток, около 30 миллиардов клеток, около 45 миллиардов клеток) или любое значение между этими значениями.

В некоторых воплощениях доза всех клеток и/или отдельных подгрупп клеток находится в диапазоне от или около 10^4 клеток/кг массы тела до или около 10^9 клеток/кг массы тела, например, от 10^5 до 10^6 клеток/кг массы тела, например, по меньшей мере или по меньшей мере около или составляет 1×10^5 клеток/кг, $1,5 \times 10^5$ клеток/кг, 2×10^5 клеток/кг или 1×10^6 клеток/кг массы тела. Например, в некоторых воплощениях изобретения вводят клетки с содержанием 10^4 или около 10^9 Т-клеток на кг массы тела или около 10^9 Т-клеток на кг массы тела или в пределах определенной погрешности, например, от 10^5 до 10^6 Т-клеток на кг массы тела, например, по меньшей мере или по меньшей мере около или равно или около 1×10^5 Т-клеток/кг, $1,5 \times 10^5$ Т-клеток/кг, 2×10^5 Т-клеток/кг или 1×10^6 Т-клеток/кг массы тела.

Клетки можно вводить любым подходящим способом, например, болюсно, путем инъекции, такой как внутривенная или подкожная инъекция, внутриглазная инъекция, периокулярная инъекция, субретинальная инъекция, интравитреальная инъекция, трансептальная инъекция, субсклеральная инъекция, интрахориоидальная инъекция, передняя внутрикамерная инъекция, субперинеальная инъекция, субконъюнктивальная инъекция, субтеноновая инъекция, ретробульбарная инъекция, перибульбарная инъекция или постериальная окологсклеральная. В некоторых воплощениях клетки вводят парентерально, внутривенно и интраназально, а если желательно местное лечение, то путем внутриочагового введения. Парентеральные инфузии включают внутримышечное, внутривенное, внутриартериальное, внутрибрюшинное или подкожное введение. В некоторых воплощениях данную дозу вводят путем введения клеток в виде одного болюса. В некоторых воплощениях его вводят путем многократного болюса вводимых клеток, например, в течение периода не более 3 дней, или путем непрерывной инфузии вводимых клеток.

В некоторых воплощениях предусмотрен способ повторного введения дозы, при

котором вводят первую дозу клеток, за которой следуют одна или несколько вторых последовательных доз. При введении субъектам, проходящим адоптивную терапию, время и размер нескольких доз клеток обычно рассчитаны на повышение эффективности и/или активности и/или функции Т-клеток, экспрессирующих антиген (например, Т-клеток, экспрессирующих CAR). В некоторых воплощениях повторное введение снижает понижающую регуляцию или ингибирующую активность, которая может возникнуть, когда ингибирующие иммунные молекулы, такие как PD-1 и/или PD-L1, активируются на Т-клетках, экспрессирующих антиген, например, Т-клетках, экспрессирующих CAR. Способ включает введение первой дозы, за которой обычно следуют одна или несколько последовательных доз, и установление определенного периода времени между различными дозами.

В контексте адоптивной клеточной терапии введение данной «дозы» включает введение заданного количества или количества клеток в виде единой композиции и/или однократное непрерывное введение (например, в виде однократной инъекции или непрерывной инфузии), и также включает введение заданного количества или количества клеток, предусмотренных множеством индивидуальных композиций или инфузий в виде дробных доз в течение определенного периода времени (не более 3 дней). Таким образом, в некоторых случаях первая или непрерывная доза представляет собой однократное или непрерывное введение определенного количества клеток, введенное или начатое в один момент времени. Однако в некоторых случаях первую или последующую дозу вводят в виде многократных инъекций или инфузий в течение периода не более трех дней, например, один раз в три или два дня, один раз в день или многократных инфузий в течение дня.

3. Направленная деградация патогенного белка

В другом аспекте в настоящем раскрытии также предлагается способ деградации белка-мишени *in vivo* или *in vitro*, который включает доставку молекулы нуклеиновой кислоты и/или вектора, как описано в настоящем документе, в клетку, экспрессирующую белок-мишень, или субъекта, где молекула нуклеиновой кислоты и/или вектор, экспрессируемый в клетке или субъекте, будут давать химерную белковую конструкцию, как описано в данной заявке. Домен, связывающий белок-мишень, химерной белковой конструкции способен связываться с белком-мишенью, а домен, связывающий белок механизма ERAD, химерной белковой конструкции может использовать путь ERAD для приведения в непосредственную близость с системой убиквитин-протеасома (UPS), тем самым используя протеасому в UPS для разрушения белка-мишени. Когда химерная белковая конструкция дополнительно содержит домен, связывающий участника пути

деградации белков, этот способ будет стимулировать дополнительные системы деградации приблизиться к белку-мишени, что приведет к значительному улучшению эффекта деградации.

В другом аспекте в настоящем раскрытии также предлагается способ лечения состояния или заболевания субъекта, нуждающегося в этом, и/или предотвращения его рецидива, включающий: введение субъекту терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, описанной выше (включая молекулы нуклеиновой кислоты, например, мРНК, вирусные векторы, онколитические вирусы, химерные белковые конструкции и т.п.).

В некоторых воплощениях способ включает введение молекулы нуклеиновой кислоты (например, мРНК) или вектора (например, вирусного вектора), кодирующего химерную белковую конструкцию, индивидууму, нуждающемуся в этом, так, чтобы молекула нуклеиновой кислоты или вектор экспрессировали химерную белковую конструкцию в клетки индивидуума.

В контексте изобретения применим любой из обычных путей введения, включая парентеральный, местный или через слизистую оболочку. Парентеральный путь введения представляет собой инъекцию или инфузию и включает как системный, так и местный пути введения. Распространенными типами парентеральных инъекций являются внутривенные (в вену), внутриартериальные (в артерию), внутрикожные (в дерму), подкожные (под эпидермис), внутримышечные (в мышцы) и внутриопухолевые (в опухоль или в непосредственной близости от нее). Инфузии обычно вводятся внутривенно. Введение через слизистую оболочку включает, без ограничения указанным, пероральный/алиментарный, интраназальный, интратрахеальный, внутрилегочный, интравагинальный или интаректальный пути. Местное введение также можно осуществлять с использованием трансдермальных средств (например, пластыря и т.п.). Для введений могут использоваться обычные шприцы и иглы или любое соединение или устройство, доступное в данной области техники, способное облегчить или улучшить доставку активного агента(ов) субъекту.

В зависимости от заболевания, которое индивидуум необходимо лечить, а также от патогенного белка, который необходимо расщепить, можно выбрать подходящую химерную белковую конструкцию, ее молекулы нуклеиновой кислоты и векторы.

В некоторых предпочтительных воплощениях заболевание включает различные солидные опухоли и гематологические опухоли, инфекционные заболевания (например, вирусные инфекции), аутоиммунные заболевания, нейродегенеративные заболевания, метаболические заболевания.

В некоторых воплощениях заболевание представляет собой опухоль или злокачественную опухоль, и домен направленного воздействия химерной белковой конструкции специфически нацелен на мишень, ассоциированную с опухолью, или мишень, ассоциированную с иммунной функцией. Мишень, ассоциированная с опухолью, или мишень, ассоциированная с иммунной функцией, описаны ранее в настоящей заявке.

В некоторых предпочтительных воплощениях солидную опухоль выбирают из опухолей нервной системы, опухолей головы и шеи, опухолей грудной клетки, опухолей пищеварительной системы, опухолей мочеполовой системы, опухолей мягких тканей и кожи, опухолей костей и т.п.;

В некоторых предпочтительных воплощениях опухоли нервной системы включают диффузную глиому, диффузную астроцитому и анапластическую астроцитому, глиобластому, олигодендроглиому, олигоастроцитому, диффузные глиомы, другие астроцитомы, эпендимомы, нейрональные и смешанные нейронально-глиальные опухоли, медуллобластому, другие эмбриональные опухоли, шванномы, менингиомы, солитарные фиброзные опухоли и гемангиоперицитомы и т.п.;

В некоторых предпочтительных воплощениях опухоли головы и шеи включают злокачественные опухоли просвета носа и пазух, рак носоглотки, рак полости рта, рак гортани, опухоли слюнных желез, внутричерепные опухоли, рак щитовидной железы, рак языка и т.п.;

В некоторых предпочтительных воплощениях опухоли грудной клетки включают рак легкого, рак пищевода, рак кардии, рак молочной железы, опухоли средостения и т.п.;

В некоторых предпочтительных воплощениях опухоли пищеварительной системы включают рак желудка, колоректальный рак, рак сигмовидной, ободочной и прямой кишки, рак печени, рак поджелудочной железы и периампулярный рак, рак желчевыводящих путей, злокачественные опухоли тонкого кишечника и т.п.;

В некоторых предпочтительных воплощениях опухоли мочеполовой системы включают рак почки, рак предстательной железы, рак мочевого пузыря, рак яичек, рак полового члена, рак шейки матки, рак эндометрия, рак яичника и т.п.;

В некоторых предпочтительных воплощениях опухоли мягких тканей и кожи включают злокачественную фиброзную гистиоцитому, рабдомиосаркому, синовиальную саркому, злокачественную меланому кожи и т.д.

В некоторых предпочтительных воплощениях опухоли костей включают остеосаркому, саркому Юинга и т.д.

В некоторых предпочтительных воплощениях рак ободочной кишки представляет собой аденому ободочной кишки.

В некоторых предпочтительных воплощениях рак молочной железы представляет собой клетку трижды негативного рака молочной железы.

В некоторых предпочтительных воплощениях рак печени представляет собой гепатоцеллюлярную карциному.

В некоторых предпочтительных воплощениях заболевание представляет собой гематологическую опухоль, выбранную из лейкоза, лимфомы (HL), множественной миеломы (MM), миелодиспластического синдрома (MDS) и т.п.;

В некоторых предпочтительных воплощениях лейкоз представляет собой острый В-клеточный лимфобластный лейкоз, острый Т-клеточный лимфобластный лейкоз, острый миелоидный лейкоз и т.п.

В другом аспекте в настоящем раскрытии также предлагается способ лечения опухолей или рака у субъектов, нуждающихся в этом, включающий: введение субъекту терапевтически эффективного количества онколитического вируса или фармацевтической композиции онколитического вируса по настоящей заявке. Онколитические вирусы или композиции по настоящему изобретению можно вводить субъекту в виде однократной дозы или нескольких доз. При введении нескольких доз, их можно вводить одним и тем же или разными путями и можно вводить в одну и ту же часть или в разные части. Его также можно назначать непрерывным циклом, повторяя после периода отдыха. Интервал между каждым введением может варьировать от нескольких часов до года (например, 24 часа, 48 часов, 72 часа, еженедельно, раз в две недели, ежемесячно или ежегодно). Интервалы также могут быть нерегулярными (например, после развития опухоли). Доза каждого введения может варьировать в пределах вышеуказанных диапазонов. В некоторых воплощениях путь введения онколитического вируса может включать внутривенный и внутриопухолевый пути.

В случае настоящего изобретения онколитический вирус можно вводить один или несколько раз в подходящей дозе (например, от 10^7 до 5×10^9 БОЕ). Интервал между каждым введением вируса может варьировать от около 1 дня до около 8 недель. Другой предпочтительный протокол лечения включает от 2 до 5 (например, 3) внутривенных или внутриопухолевых введений онколитического вируса 10^8 или 10^9 БОЕ с интервалами примерно в 1 или 2 недели, которые может выбрать врач в зависимости от реальной ситуации. В некоторых воплощениях способ включает введение онколитического вирусного вектора, содержащего молекулу нуклеиновой кислоты, как описано выше, при этом у субъекта имеется онкологическое заболевание. Фармацевтическая композиция или онколитический вирусный вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты, как описано выше, способна целенаправленно деградировать патогенные белки, например,

онкогенные белки, вирусные белки, белки, связанные с иммунной системой, и т.д.

В некоторых воплощениях заболевание представляет собой инфекционное заболевание, и домен направленного воздействия химерной белковой конструкции специфически нацелен на мишени, ассоциированные с инфекционным заболеванием. Мишени, ассоциированные с инфекционным заболеванием, описаны ранее в настоящей заявке.

В некоторых воплощениях вирусные инфекционные заболевания включают: респираторные вирусные заболевания, желудочно-кишечные вирусные заболевания, вирусные заболевания печени, вирусные заболевания кожи и слизистых оболочек, вирусные заболевания глаз, вирусные заболевания центральной нервной системы, лимфоцитарные вирусные заболевания, вирусные заболевания, передаваемые насекомыми, лентивирусные инфекционные заболевания, и т.п.;

В некоторых воплощениях респираторные вирусные заболевания включают инфекции риновируса, аденовируса, респираторно-синцитиального вируса, вируса парагриппа и коронавируса; грипп; свинку и т.д.

В некоторых воплощениях желудочно-кишечные вирусные заболевания включают полиомиелит; инфекцию, вызванную вирусом Коксаки; эховирусную инфекцию; и вирусный гастроэнтерит, включая ротавирусный гастроэнтерит, вирусный гастроэнтерит Норуолка, аденовирусный гастроэнтерит, астровирусный гастроэнтерит, коронавирусный гастроэнтерит и калицивирусный гастроэнтерит и т.п.;

В некоторых воплощениях вирусные заболевания печени включают вирусный гепатит А, вирусный гепатит В, вирусный гепатит С, вирусный гепатит D, вирусный гепатит Е, вирусный гепатит Эпштейна-Барр и цитомегаловирусный гепатит.

В некоторых воплощениях вирусные заболевания кожи и слизистых оболочек включают корь, краснуху, острую сыпь у детей, ветрянную оспу и опоясывающий лишай, оспу, вирусную инфекцию простого герпеса, бешенство и ящур и т.п.

В некоторых воплощениях вирусные заболевания глаз включают эпидемический кератоконъюнктивит, фолликулярный конъюнктивит и герпетический кератоконъюнктивит и т.п.

В некоторых воплощениях вирусные заболевания центральной нервной системы включают японский энцефалит, западный лошадиный энцефалит, восточный лошадиный энцефалит, энцефалит Сент-Луиса, венесуэльский лошадиный энцефалит, энцефалит долины Мюррея, калифорнийский энцефалит, лесной энцефалит и лимфоцитарный хориоменингит и т.п.

В некоторых воплощениях лимфоцитарные вирусные заболевания включают

инфекционный мононуклеоз, цитомегаловирусную инфекцию и синдром приобретенного иммунодефицита и т.п.

В некоторых воплощениях вирусные заболевания, передаваемые насекомыми, включают: вирусные геморрагические лихорадки, в том числе эпидемическую геморрагическую лихорадку, желтую лихорадку, геморрагическую лихорадку Крым-Конго, лихорадку долины Рифт, аргентинскую геморрагическую лихорадку, боливийскую геморрагическую лихорадку, лихорадку Ласса, геморрагическую лихорадку Ому-Скраба, болезнь Марбурга, геморрагическую лихорадку Эбола и т.п.; лихорадку денге и геморрагическую лихорадку денге; лихорадку Западного Нила; колорадскую клещевую лихорадку; москитную лихорадку и т.п.;

В некоторых воплощениях лентивирусные инфекционные заболевания включают подострый склерозирующий панэнцефалит, болезнь Куру, прогрессирующую мультифокальную лейкоэнцефалопатию и подострую губчатую энцефалопатию (кортикостриарную дегенерацию спинного мозга) и т.п.;

В некоторых воплощениях заболевание представляет собой аутоиммунное заболевание, и домен направленного воздействия химерной белковой конструкции специфически нацелен на мишени, связанные с аутоантигеном. Мишени, связанные с аутоантигенами, описаны ранее в настоящей заявке.

В некоторых воплощениях аутоиммунные заболевания включают органоспецифические аутоиммунные заболевания и системные аутоиммунные заболевания.

Предпочтительно органоспецифические аутоиммунные заболевания включают хронический лимфоцитарный тиреоидит, гипертиреоз, инсулинозависимый сахарный диабет, тяжёлую миастению, язвенный колит, пернициозную анемию с хроническим атрофическим гастритом, легочно-геморрагический нефритический синдром, вульгарную пузырчатку, пемфигоид, первичный билиарный цирроз печени, рассеянный склероз, острый идиопатический полиневрит и т.п.

В некоторых воплощениях системные аутоиммунные заболевания включают системную красную волчанку, ревматоидный артрит, системный васкулит, склеродермию, пузырчатку, дерматомиозит, смешанное заболевание соединительной ткани, аутоиммунную гемолитическую анемию, аутоиммунные заболевания щитовидной железы, язвенный колит и т.п.;

В некоторых воплощениях заболевание представляет собой неврологическое или дегенеративное заболевание, и домен направленного воздействия химерной белковой конструкции специфически нацелен на мишени, связанные с неврологическими

заболеваниями. Мишени, связанные с неврологическими расстройствами, описаны ранее в настоящей заявке.

В некоторых воплощениях неврологические заболевания включают заболевания нервной системы, заболевания периферических нервов, такие как невралгия тройничного нерва, паралич лицевого нерва, гемифациальный спазм, вестибулярный нейронит, языкоглоточную невралгию, заболевание мононерва, невралгию плечевого сплетения, множественную мононейропатию, множественную невропатию, острую воспалительную демиелинизирующую полинейропатию, хроническую воспалительную демиелинизирующую полинейропатию;

заболевания спинного мозга, например, миелит, компрессионную миелопатию, подострую комбинированную дегенерацию спинного мозга, сирингомиелию, сосудистое заболевание спинного мозга, арахноидит спинного мозга и т.п.;

цереброваскулярные заболевания, например, транзиторную ишемическую атаку, инфаркт головного мозга, кровоизлияние в мозг, субарахноидальное кровоизлияние, тромбоз внутричерепной венозной системы и т.п.;

инфекционные заболевания центральной нервной системы, например, менингит, энцефалит и т.п., вызванные инфекциями вирусов, бактерий, грибов или паразитов и т.п., и лентивирусный энцефалит, вызванный лентивирусными инфекциями;

демиелинизирующие заболевания центральной нервной системы, например, рассеянный склероз, оптикомиелит, острый рассеянный энцефаломиелит, лейкодистрофию и т.п.;

двигательные расстройства, например, болезнь Паркинсона, хорею, гепатолентикулярную дегенерацию, дистонию, эссенциальный тремор, позднюю дискинезию и т.п.;

эпилепсию;

головные боли, например, мигрень, головные боли напряжения, кластерные головные боли и т.п.;

дегенеративные заболевания нервной системы, например, болезнь двигательных нейронов, болезнь Альцгеймера, деменцию с тельцами Леви, лобно-височную деменцию, множественную системную атрофию и т.п.;

наследственные заболевания нервной системы, такие как наследственная атаксия, наследственная спастическая параплегия, болезнь Шарко-Мари-Тута, нейрофиброматоз, туберозный склероз, церебральный гемангиоматоз и т.п.;

нарушения неврологического развития, такие как врожденная гидроцефалия, церебральный паралич, базилярная депрессия, субтонзиллярное заболевание мозжечка и

т.п.;

заболевания нервно-мышечного соединения и мышц, например, тяжелую миастению, периодический паралич, полимиозит, прогрессирующую мышечную дистрофию, миотоническую миопатию (миотоническую дистрофию, врожденную миотонию), метаболическую миопатию (митохондриальную миопатию, миопатию накопления липидов, гликогеноз) и т.п.;

заболевания вегетативной нервной системы, например, болезнь Рейно, эритромелалгию, гемифациальную атрофию, генерализованную вегетативную недостаточность, спонтанный гипергидроз, прогрессирующую липодистрофию и т.п.;

опухоли нервной системы, например, глиому, лимфому, менингиому и т.п.;

паранеопластические синдромы нервной системы, например, паранеопластическую дегенерацию мозжечка, паранеопластический энцефаломиелит, подострую некротическую миелопатию, подострую болезнь двигательных нейронов, паранеопластическую болезнь сенсорных нейронов и т.п.;

В некоторых предпочтительных воплощениях нейродегенеративные заболевания приводят к постепенной утрате структуры и функции нейронов, включая гибель нейронов и баланс глиальных клеток, что приводит к когнитивным нарушениям, таким как деменция. Примеры нейродегенеративных заболеваний включают болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона (БП), болезнь Хантингтона, БА или БП с ранним началом и боковой амиотрофический склероз (АЛС).

В некоторых воплощениях заболевание представляет собой метаболическое заболевание, такое как диабет, гиперлипидемия, подагра и т.д. Мишени, связанные с метаболическими заболеваниями, описаны ранее в настоящей заявке.

Примеры

Пример 1: Создание конструкции химерного белка ER-TPD

В этом примере были разработаны пять химерных белковых конструкций с использованием технологии направленной деградации белков на основе эндоплазматического ретикулума (ER-TPD). Среди них первая структура представляет собой базовую химерную белковую конструкцию ER-TPD, а остальные четыре структуры представляют собой более мощные химерные белковые конструкции ER-TPD, образованные путем добавления лиганда убиквитинлигазы E3, лиганда убиквитин-конъюгирующего фермента E2 или лиганда лизоцима или их комбинации к первой структуре. Химерная белковая конструкция ER-TPD содержит интегрированный многофункциональный домен или его функциональный вариант молекулы рекомбинантного белка, который связывается с белком-мишенью и индуцирует

направленную деградацию.

1.1 Базовая химерная белковая конструкция ER-TPD

В некоторых воплощениях используется базовая химерная белковая (ER-TPD) конструкция TBD-TMD-ERD, линейная схематическая диаграмма и структурная схема которой показаны на Фиг. 1А, содержащая три домена: (1) домен, связывающий белок-мишень (TBD) или его функциональный вариант, который может представлять собой молекулу белка с нацеливающим аффинным лигандом или ее функциональный вариант (который может представлять собой фрагмент антитела, полипептид, природный рецептор, лиганд или искусственный рекомбинантный белок, обладающий аффинностью к белку-мишени, или их связывающий домен); (2) трансмембранный домен (TMD) вирусного гликопротеина, резидентного в эндоплазматическом ретикулуме (ЭПР), или его функциональный вариант; и (3) цитоплазматический домен вирусного гликопротеина, резидентного в эндоплазматическом ретикулуме (ЭПР) (домен удержания в ЭПР, ERD), или его функциональный вариант. Необязательно, домен связывания белка-мишени или его функциональный вариант, трансмембранный домен вирусного гликопротеина, резидентного в эндоплазматическом ретикулуме, или его функциональный вариант и цитоплазматический домен вирусного гликопротеина, резидентного в эндоплазматическом ретикулуме, или его функциональный вариант связаны шарниром или линкером.

Как показано на Фиг. 1В, механизм работы химерной белковой (ER-TPD) конструкции TBD-TMD-ERD следующий: [1] Специфическое связывание и удержание: TBD-TMD-ERD после экспрессии находится в эндоплазматическом ретикулуме и связывается с белком-мишенью через домен, связывающий белок-мишень, что приводит к удержанию белка-мишени внутри эндоплазматического ретикулума и предотвращению транслокации синтезированного белка-мишени в аппарат Гольджи. [2] Ретро-транслокация: после того, как химерная белковая конструкция связывается с белком-мишенью, комплекс, образованный химерной белковой конструкцией и белком-мишенью, транслоцируется из эндоплазматического ретикулума в цитоплазму через ретро-транспортер по механизму ERAD. Классические ретро-транспортеры включают Derlin, лигазу E3 Hrd1 и шаперон Sel1L, которые способны рекрутировать АТФазу p97 из цитоплазмы. Derlin имеет шесть трансмембранных доменов, из которых N-концевой и C-концевой расположены в цитоплазме и образуют транспортный канал, АТФаза p97 необходима для процесса ретро-транслокации (Byun H et al., ERAD and how viruses exploit it. *Front Microbiol.* 2014 Jul 3; 5:330). [3] Убиквитинирование и протеасомная деградация: ретро-транспортеры могут взаимодействовать с убиквитинлигазой E3, присущей эндоплазматическому ретикулуму, чтобы способствовать убиквитинированию белков-мишеней, убиквитинированные белки-

мишени перемещаются в цитоплазму через ретротранспортеры, распознаются и разрушаются протеасомой.

1.2 Химерная белковая конструкция ER-TPD, имеющая лигандный домен убиквитинлигазы E3

В некоторых воплощениях используется химерная белковая (ER-TPD) конструкция TBD-TMD-ERD-E3L, имеющая лигандный домен убиквитинлигазы E3, ее линейная схематическая диаграмма и структурная схема показаны, соответственно на Фиг. 2А и 2В, которая содержит четыре домена: (1) домен, связывающий белок-мишень (TBD) или его функциональный вариант, который может представлять собой белковую молекулу нацеливающего аффинного лиганда или ее функциональный вариант (который может представлять собой фрагмент антитела, полипептид, природный рецептор, лиганд или искусственный домен рекомбинантного белка, обладающий аффинностью к белку-мишени); (2) трансмембранный домен вирусного гликопротеина, резидентного в эндоплазматическом ретикулуме, или его функциональный вариант; (3) цитоплазматический домен вирусного гликопротеина, резидентного в эндоплазматическом ретикулуме, или его функционального варианта; и (4) лиганд убиквитинлигазы E3 (лиганд для лигазы E3, E3L) или его функциональный вариант, лиганд убиквитинлигазы E3 может представлять собой полипептид или рекомбинантный белок для связывания с большим количеством убиквитинлигазы E3 вне эндоплазматической ретикулом. Необязательно, домен, связывающий белок-мишень, или его функциональный вариант, трансмембранный домен вирусного гликопротеина, резидентного в эндоплазматическом ретикулуме, или его функциональный вариант, цитоплазматический домен вирусного гликопротеина, резидентного в эндоплазматическом ретикулуме, или его функциональный вариант и лигандный домен убиквитинлигазы E3. или его функциональный вариант связаны шарниром или линкером. Из-за ограниченного числа убиквитинлигаз E3, присущих ЭПР, а также из-за конкуренции за убиквитинлигазы E3 со стороны пути ERAD, запускаемой неправильно свернутыми белками в ЭПР, невозможно достичь эффективной деградации белков-мишеней, если использование пути деградации убиквитин-протеасома не увеличивается. Таким образом, авторы изобретения обнаружили, что эффективное убиквитинирование и деградация белка-мишени могут быть достигнуты за счет экзогенного увеличения лиганда убиквитинлигазы E3.

Как показано на Фиг. 2С, механизм работы химерной белковой (ER-TPD) конструкции TBD-TMD-ERD-E3L заключается в следующем: [1] Специфическое связывание и удержание: TBD-TMD-ERD-E3L находится в эндоплазматическом ретикулуме после экспрессии и связывается с белком-мишенью через домен связывания

белка-мишени, что приводит к удержанию белка-мишени внутри эндоплазматического ретикулума и предотвращению транслокации синтезированного белка-мишени в аппарат Гольджи. [2] Ретротранслокация: после того, как химерная белковая конструкция связывается с белком-мишенью, комплекс, образованный химерной белковой конструкцией и белком-мишенью, транслоцируется из эндоплазматического ретикулума в цитоплазму через ретротранспортер по механизму ERAD. Классические ретротранспортеры включают Derlin, лигазу E3 Hrd1 и шаперон Sel1L, которые способны рекрутировать АТФазу p97 из цитоплазмы. Derlin имеет шесть трансмембранных доменов, из которых N-концевой и C-концевой расположены в цитоплазме и образуют транспортный канал, для процесса ретротранслокации необходима АТФаза p97. [3] Убиквитинирование и протеасомная деградация: химерная белковая конструкция связывается с лигазным комплексом E3 с помощью лиганда E3, белок-мишень убиквитинируется ферментом, конъюгирующим убиквитин E2, в комплексе и транслоцируется в протеасому для деградации. Среди них лиганд, нацеленный на лигазный комплекс E3, может представлять собой искусственно отобранную и сконструированную белковую последовательность или представлять собой природную белковую последовательность или ее рекомбинантную версию, например, фосфопептид, полученный из IкВ α (DRHDSGLDSM, SEQ ID NO.119), фосфопептид может рекрутировать SCF β -TRCP в комплекс убиквитинлигазы E3, чтобы опосредовать путь убиквитинирования и деградации белка-мишени (Sakamoto KM et al., *Protacs: chimeric molecules that target proteins to the Skp1-Cullin-F box complex for ubiquitination and degradation. Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001; 98:8554-9). Также может быть включен пептид распознавания лигазы E3 (ALAPYIP, SEQ ID NO.120), полученный из HIF-1 α , такой пептид распознавания может связываться с VHL лигазы E3, тем самым обеспечивая путь деградации через убиквитинирование (Ivan M et al., *HIF α targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing. Science.* 2001; 292:464-8).

1.3 Химерная белковая конструкция ER-TPD, имеющая домен лиганда убиквитин-конъюгирующего фермента E2

В некоторых воплощениях используется химерная белковая (ER-TPD) конструкция TBD-TMD-ERD-E2L, имеющая домен лиганда убиквитин-конъюгирующего фермента E2, ее линейная схематическая диаграмма и структурная схема показаны, соответственно на Фиг. 3А и 3В, которые содержат четыре домены: (1) домен связывания белка-мишени или его функциональный вариант, который может представлять собой белковую молекулу нацеливающего аффинного лиганда или ее функциональный вариант (который может представлять собой фрагмент антитела, полипептид, природный рецептор, лиганд или

искусственный рекомбинантный белок домен, имеющий сродство к белку-мишени); (2) трансмембранный домен вирусного гликопротеина, резидентного в эндоплазматическом ретикулуме, или его функциональный вариант; (3) цитоплазматический домен вирусного гликопротеина, резидентного в эндоплазматическом ретикулуме, или его функционального варианта; и (4) домен лиганда убиквитин-конъюгирующего фермента E2, или его функциональный вариант, лиганд лигазы убиквитин-конъюгирующего фермента E2, может представлять собой полипептид или рекомбинантный белок. Необязательно, домен связывания белка-мишени или его функциональный вариант, трансмембранный домен вирусного гликопротеина, резидентного в эндоплазматическом ретикулуме, или его функциональный вариант, цитоплазматический домен вирусного гликопротеина, резидентного в эндоплазматическом ретикулуме, или его функциональный вариант и домен лиганда убиквитин-конъюгирующего фермента E2 или его функциональный вариант связаны шарниром или линкером.

Как показано на Фиг. 3С, механизм работы химерной белковой (ER-TPD) конструкции TBD-TMD-ERD-E2L заключается в следующем: [1] Специфическое связывание и удержание: TBD-TMD-ERD-E2L находится в эндоплазматическом ретикулуме после экспрессии и связывается с белком-мишенью через домен связывания белка-мишени, что приводит к удержанию белка-мишени внутри эндоплазматического ретикулума и предотвращению транслокации синтезированного белка-мишени в аппарат Гольджи. [2] Ретро-транслокация: после того, как химерная белковая конструкция связывается с белком-мишенью, комплекс, образованный химерной белковой конструкцией и белком-мишенью, транслоцируется из эндоплазматического ретикулума в цитоплазму через ретро-транспортер по механизму ERAD. Классические ретро-транспортеры включают Derlin, лигазу E3 Hrd1 и шаперон Sel1L, которые способны рекрутировать АТФазу p97 из цитоплазмы. Derlin имеет шесть трансмембранных доменов, из которых N-концевой и C-концевой расположены в цитоплазме и образуют транспортный канал, для процесса ретро-транслокации необходима АТФаза p97. [3] Убиквитинирование и протеасомная деградация: химерная белковая конструкция напрямую связывается с конъюгирующим ферментом E2 с помощью лиганда конъюгирующего фермента E2, что позволяет убиквитинировать белок-мишень с помощью убиквитин-конъюгирующего фермента E2, и перенести его в протеасому для деградации. Домен лиганда убиквитин-конъюгирующего фермента E2, может связываться со структурой UBC убиквитин-конъюгирующего фермента E2, посредством домена цинкового пальца RING, полученного из белка семейства IAP, для достижения убиквитинирования и протеасомной деградации белка-мишени. Лиганд, нацеленный на

убиквитин-конъюгирующий фермент E2, может представлять собой домен с цинковым пальцем RING, полученный из белка семейства IAP, или последовательность рекомбинантного белка с доменом с цинковым пальцем RING. IAP (ингибитор белков апоптоза) представляет собой семейство молекул, ингибирующих апоптозные белки, IAP может функционировать как лигаза E3 для проапоптотических белков (таких как каспазы, SMAC, ARTS), тем самым ингибируя клеточный апоптоз путем достижения убиквитинирования и деградации проапоптотических белков. IAP также может регулировать передачу сигналов NOD и иммунный ответ посредством убиквитилирования RIPK2 (серин/треонин-протеинкиназы 2, взаимодействующей с рецепторами). Все пять представителей семейства IAP (XIAP, cIAP1, cIAP2, Livin и ILP2) имеют домены с цинковым пальцем RING, которые могут связываться с убиквитин-конъюгирующим ферментом E2 и белком Apollon (Mikihiko Naito et al., SNIPERs-Hijacking IAP activity to induce protein degradation. *Drug Discov Today Technol.* 2019 Apr; 31:35-42). Следовательно, более эффективное убиквитинирование и протеасомно-опосредованная деградация белков-мишеней может быть достигнута путем использования домена с цинковым пальцем RING, полученного из членов семейства IAP, для соединения химерной белковой конструкции и убиквитин-конъюгирующего фермента E2. Кроме того, для проектирования лиганда E2 можно использовать следующие последовательности:

домен	RING,	полученный	из	XIAP:
СКICMDRNIAIVFVPCGHLVTCKQCAEAVDKCPMCY (SEQ ID NO.155);				
домен	RING,	полученный	из	cIAP1:
СКVCMДKEVSVVFIPCGHLVVCQECAPSLRKCPICR (SEQ ID NO.156);				
домен	RING,	полученный	из	cIAP2:
СКVCMДKEVSVVFIPCGHLVVCQECAPSLRKCPICR (SEQ ID NO.157);				
домен	RING,	полученный	из	Livin:
СКVCLDRAVSIVFVPCGHLVCAECAPGLQLCPICR (SEQ ID NO.158);				
домен	RING,	полученный	из	ILP-2:
СКICMDRNIAVVFIPCGHLVTCKQCAEAVDRCPMCS (EQ ID NO.159).				

1.4 Химерная белковая конструкция ER-TPD, имеющая домен лизосомного лиганда

В некоторых воплощениях используется химерная белковая (ER-TPD) конструкция TBD-TMD-ERD-LL, имеющая домен лизосомного лиганда, ее линейная схематическая диаграмма и структурная схема показаны, соответственно на Фиг. 4А и 4В, которая содержит четыре домена: (1) домен связывания белка-мишени или его функциональный вариант, который может представлять собой белковую молекулу нацеливающего аффинного лиганда или ее функциональный вариант (который может представлять собой

фрагмент антитела, полипептид, природный рецептор, лиганд или искусственный рекомбинантный белковый домен, обладающий аффинностью к белку-мишени); (2) трансмембранный домен вирусного гликопротеина, резидентного в эндоплазматическом ретикулуме, или его функциональный вариант; (3) цитоплазматический домен вирусного гликопротеина, резидентного в эндоплазматическом ретикулуме, или его функционального варианта; и (4) домен лизосомного лиганда или функциональный вариант, лизосомный лиганд может представлять собой полипептид или рекомбинантный белок. Необязательно, домен, связывающий белок-мишень, или его функциональный вариант, трансмембранный домен вирусного гликопротеина, резидентного в эндоплазматическом ретикулуме, или его функциональный вариант, цитоплазматический домен вирусного гликопротеина, резидентного в эндоплазматическом ретикулуме, или его функциональный вариант и домен лизосомного лиганда или его функциональный вариант связаны шарниром или линкером.

Как показано на Фиг. 4С, механизм работы химерной белковой (ER-TPD) конструкции TBD-TMD-ERD-LL заключается в следующем: [1] Специфическое связывание и удержание: TBD-TMD-ERD-LL экспрессируется и находится в эндомембране эндоплазматического ретикулума и связывается с белком-мишенью через домен связывания белка-мишени, что приводит к удержанию белка-мишени внутри эндоплазматического ретикулума и предотвращению транслокации синтезированного белка-мишени в аппарат Гольджи. [2] Ретро-транслокация: после того, как химерная белковая конструкция связывается с белком-мишенью, комплекс, образованный химерной белковой конструкцией и белком-мишенью, транслоцируется из эндоплазматического ретикулума в цитоплазму через ретро-транспортер по механизму ERAD. [3] Эндоцитоз и гидролиз в лизосомах: Химерная белковая конструкция напрямую связывается с лизосомным шапероном через домен лизосомного лиганда и транслоцируется в лизосому посредством шаперона. Белок-мишень разрушается различными гидролазами в лизосоме.

Домен лизосомного лиганда может представлять собой KFERQ-подобный мотив или последовательность рекомбинантного белка с KFERQ-подобным мотивом. KFERQ-подобный мотив может специфически распознаваться и связываться с помощью шаперона Hsc70, что позволяет комплексу белка-мишени ER-TPD транслоцироваться в лизосому посредством механизма шаперон-опосредованной аутофагии (chaperone mediated autophagy, CMA) и разрушаться там различными гидролазами.

Шаперон-опосредованная аутофагия (CMA) представляет собой процесс селективной аутофагии белков и лизосомной деградации. Шаперон Hsc70 транспортирует белок-мишень в лизосому для деградации путем распознавания и нацеливания KFERQ-

подобного мотива на белок-мишень и путем распознавания рецепторного белка LAMP2A на лизосомной мембране. KFERQ-подобный мотив может быть KFERQ, полученным из РНКазы А (Backer J et al., Regulation of catabolism of microinjected ribonuclease A requires the amino-terminal 20 amino acids. Proc Natl Acad Sci.1983; 80:2166-2170), QKILD (SEQ ID NO.124) и QRDKV (SEQ ID NO.125), полученных из Hsc70 (Cuervo AM et al., Unique properties of lamp2a compared to other lamp2 isoforms. J Cell Sci.2000; 113(Pt 24):4441-4450); QRFFE (SEQ ID NO.126), полученный из гемоглобина (Slot LA et al., Intracellular protein degradation in serum-deprived human fibroblasts. Journal of Biochemistry.1986; 237:491-498); QKKEL (SEQ ID NO.127), QFREL (SEQ ID NO.128) и IKLDQ (SEQ ID NO.129), полученные из альдозазы В; EFLKQ (SEQ ID NO.130), полученный из аннексина I; QKVFD (SEQ ID NO.131), полученный из аннексина II; QELLR (SEQ ID NO.132), полученный из аннексина IV; QEFIK (SEQ ID NO.133), полученный из аннексина VI; RKVEQ (SEQ ID NO.134), полученный из аспаратаминотрансферазы; NLLKE, полученный из c-fos; NRVVD (SEQ ID NO:135), полученный из GAPDH; NKKFE (SEQ ID NO:136), полученный из глутатионтрансферазы; VKELQ (SEQ ID NO.137), полученный из IκB; VDKLN (SEQ ID NO.138) и RIKEN (SEQ ID NO.139) полученные из α-2-микроглобулина; DVVRQ (SEQ ID NO.140), QRIVE (SEQ ID NO.141) и QLLRE (SEQ ID NO.142), полученные из Рах-2; IEKLQ (SEQ ID NO.143), полученный из 26S протеасомы (C8); QEKVF (SEQ ID NO:144), полученный из 19S протеасомы (PA28); QDLKF (SEQ ID NO:145), полученный из пируваткиназы; VKKDQ (SEQ ID NO.146), полученный из α-синуклеина (Massey AC. et al., Chaperone-Mediated Autophagy in Aging and Disease. Current Topics in Developmental Biology, 2006; 73:205-235).

1.5 Химерная белковая конструкция ER-TPD, имеющая убиквитинлигазу E3 и домен лизосомного лиганда

В некоторых воплощениях используется химерная белковая (ER-TPD) конструкция TBD-TMD-ERD-E3L-LL, имеющая комбинацию лиганда убиквитинлигазы E3 и лизосомного лиганда, ее линейная схематическая диаграмма и структурная схема показаны, соответственно на Фиг. 5А и 5В, и которая содержит пять доменов: (1) домен связывания белка-мишени или его функциональный вариант, который может представлять собой белковую молекулу нацеливающего аффинного лиганда или ее функциональный вариант (который может представлять собой фрагмент антитела, полипептид, природный рецептор, лиганд, или домен искусственного рекомбинантного белка, обладающий аффинностью к белку-мишени); (2) трансмембранный домен вирусного гликопротеина, резидентного в эндоплазматическом ретикулуме, или его функциональный вариант; (3) цитоплазматический домен вирусного гликопротеина, резидентного в эндоплазматическом

ретикулуме, или его функциональный вариант; (4) лиганд убиквитинлигазы E3 (лиганд для лигазы E3, E3L) или его функциональный вариант; и (5) лизосомный лиганд (лиганд для лизосомы) или функциональный вариант. Необязательно, домен, связывающий белок-мишень, или его функциональный вариант, трансмембранный домен вирусного гликопротеина, резидентного в эндоплазматическом ретикулуме, или его функциональный вариант, цитоплазматический домен вирусного гликопротеина, резидентного в эндоплазматическом ретикулуме, или его функциональный вариант, лиганд убиквитинлигазы E3 или его функциональный вариант, и домен лизосомного лиганда или его функциональный вариант связаны шарниром или линкером.

Как показано на Фиг. 5С, механизм работы химерной белковой (ER-TPD) конструкции TBD-TMD-ERD-E3L-LL заключается в следующем: [1] Специфическое связывание и удержание: TBD-TMD-ERD-E3L-LL находится в эндоплазматическом ретикулуме после экспрессии и связывается с белком-мишенью через домен связывания белка-мишени, что приводит к удержанию белка-мишени внутри эндоплазматического ретикулума и предотвращению транслокации синтезированного белка-мишени в аппарат Гольджи. [2] Ретро-транслокация: после того, как химерная белковая конструкция связывается с белком-мишенью, комплекс, образованный химерной белковой конструкцией и белком-мишенью, транслоцируется из эндоплазматического ретикулума в цитоплазму через ретро-транспортер по механизму ERAD. [3] Эндоцитоз в лизосому и ферментативная деградация, а также убиквитинирование/деградация протеасом: химерная белковая конструкция транслоцируется за пределы эндоплазматического ретикулума и напрямую связывается с лизосомным шапероном через домен лизосомного лиганда и транслоцируется в лизосому с помощью шаперона. Белок-мишень разрушается различными гидролазами в лизосомах, и часть химерного белка транслоцируется за пределы эндоплазматического ретикулума. Химерная белковая конструкция может связываться с лигазным комплексом E3 с помощью лиганда лигазы E3 и транслоцироваться в протеасомы для деградации, поскольку белок-мишень может быть убиквитинирован убиквитин-конъюгирующим ферментом E2 в комплексе.

Пример 2: Проектирование химерной конструкции нуклеиновой кислоты ER-TPD, нацеленной на TCR

В этом примере были созданы две химерные нуклеотидные конструкции ER-TPD, нацеленные на TCR.

В некоторых воплощениях были созданы две химерные белковые конструкции ER-TPD, нацеленные на TCR, TCR-ER-TPD, как показано на Фиг. 6, с использованием одного лентивирусного экспрессирующего вектора и промотора EF1 α :

(A) TCR-TPD1: анти-TCR-E3/19K TMD-ERD-P2A-EGFRt (Фиг. 6A);

(B) TCR-TPD2: анти-TCR-E3/19K TMD-ERD-G4S-E3L-P2A-EGFRt (Фиг. 6B).

Пример 3: Получение плазмиды, экспрессирующей конструкцию химерного белка ER-TPD, нацеленную на TCR

Синтез полного гена осуществляли для кодирующих нуклеотидных последовательностей химерной белковой конструкции ER-TPD, нацеленной на TCR, TCR-ER-TPD (TCR-TPD1 и TCR-TPD2), сконструированной в примере 2, где нуклеотидная последовательность TCR-TPD1 показана в SEQ ID NO.160, кодируемый ею белок показан в SEQ ID NO.161, нуклеотидная последовательность TCR-TPD2 показана в SEQ ID NO.162, а кодируемый ею белок показан в SEQ ID NO.163. Нуклеотидную последовательность TCR-TPD1 и нуклеотидную последовательность TCR-TPD2, соответственно встраивали в лентивирусный вектор pCDH-CMV-MCS-EF1 α -Puro (приобретенный у Youbao Biotech) путем молекулярного клонирования для конструирования лентивирусного вектора направленного воздействия TCR-ER-TPD. Полученные плазмиды (которые были подтверждены секвенированием) использовали для трансформации компетентных клеток DH5 α (Thermo Fisher), соответственно. Отдельные колонии собирали и культивировали в крупном масштабе. Затем плазмиды очищали и получали с использованием набора PureLink™ HiPure Plasmid Maxiprep Kit (Thermo Fisher) для получения лентивирусных плазмид TCR-ER-TPD, т.е. лентивирусной плазмиды TCR-TPD1 и лентивирусной плазмиды TCR-TPD2.

Пример 4. Получение вируса с химерной белковой конструкцией ER-TPD, нацеленной на TCR.

Клетки 293T (предоставленные ATCC, Кат. № CRL3216TM) котрансфицировали лентивирусной плазмидой TCR-ER-TPD, полученной в примере 3, а также упаковывающими плазмидами psPAX2 и pMD2.G (приобретенными у Addgene, Кат. № 12259 и 12260) при соотношении 1,64 пмоль: 1,3 пмоль: 0,72 пмоль. В качестве реагента для трансфекции использовали полиэтиленимин (408727, Sigma) в соотношении ДНК: мкг PEI=1:3. Другие подробности процесса трансфекции можно найти в инструкции к набору PureLink™ HiPure Plasmid Maxiprep Kit (K210006, Thermo). Через 16 часов после трансфекции культуральную среду заменяли на полную среду (приобретенную у Life Technologies, кат. № 11995-065). После культивирования в течение 24 часов, 48 часов и 72 часов надосадочные жидкости с лентивирусом собирали, объединяли и центрифугировали при -80 °C, 3000 об/мин в течение 10-15 минут, затем фильтровали через мембранный фильтр 0,45 мкм и, наконец, ультрацентрифугировали при 25000 об/мин, 4°C в течение 2-3 часов с получением концентрата лентивируса. Концентраты лентивируса TCR-ER-TPD

(лентивируса TCR-TPD1 или лентивируса TCR-TPD2) собирали и хранили при -80°C .

Пример 5: Получение клеток Jurkat с TCR ER-TPD

Восстановленные клетки Jurkat культивировали в среде RPMI1640, дополненной 5% FBS, в инкубаторе с температурой 37°C и 5% CO_2 . Среду меняли каждые 2-3 дня, а плотность клеток поддерживали на уровне 1×10^6 единичных клеток/мл. После восстановления состояния клеток выделенные клетки трансфицировали лентивирусом, загруженным лентивирусной плазмидой TCR-ER-TPD, полученной в примере 4. Подробности стадий представлены ниже: развести клетки Jurkat до концентрации $0,5 \times 10^6$ отдельных клеток/мл, распределить их в 24-луночной планшете и добавить концентраты лентивируса TCR-TPD1 и TCR-TPD2, приготовленные в примере 4, к клеткам ($\text{MOI} = 1$), также добавить полибрен 5 мкг/мл, центрифугировать на низкой скорости (500-1000 г/мин) в течение 30-60 минут в центрифуге с плоским углом, а затем культивировать клетки в инкубаторе при 37°C . Клетки Jurkat, экспрессирующие TCR-ER-TPD (TCR ER-TPD Jurkat cell), получали через 48 часов после заражения, фенотип клеток определяли методом проточной цитометрии. Измерение фенотипа и эксперимент по клеточной функции можно проводить после дальнейшего культивирования в течение 96 часов и 6 дней, соответственно.

Пример 6: Измерение фенотипа клеток, трансфицированных ER-TPD

Проточную цитометрию проводили на клетках TCR ER-TPD Jurkat, полученных в примере 5. На Фиг. 7 показаны результаты клеточного фенотипирования клеток TCR ER-TPD Jurkat через 48 часов (A), 96 часов (B) и на 6-й день (C). В процессе культивирования клеток и проточной цитометрии культивировали 5×10^5 нетрансфицированных клеток Jurkat и клеток Jurkat, трансфицированных лентивирусным трансфекционным вектором TCR-ER-TPD, соответственно и обрабатывали антителами CD8-Pacific Blue, CD4-APC, EGFR-PE, TCR- $\alpha\beta$ -APC-Cy7 (все антитела были приобретены у Biolegend) для окрашивания с последующим фенотипированием клеток с помощью проточного цитометра (BD FACSCanto II). Результаты показали, что (A) после 48 часов культивирования нетрансфицированные клетки Jurkat экспрессировали TCR- $\alpha\beta$, но не EGFR; в клетках Jurkat, измененных трансфекцией лентивируса TCR-TPD1, экспрессия EGFR была высокой, TCR- $\alpha\beta$ начинал деградировать со снижением уровня экспрессии на клеточной мембране; в клетках Jurkat, измененных трансфекцией лентивируса TCR-TPD2, экспрессия EGFR была высокой, снижение уровня экспрессии TCR- $\alpha\beta$ на клеточной мембране было значительно выше, чем в клетках, трансфицированных лентивирусом TCR-TPD1; (B) После 96 часов культивирования в обеих клетках Jurkat, трансфицированных вирусом TPD, TCR на поверхности клеток снизился, причем

снижение уровня экспрессии TCR в случае TCR-TPD2 было значительно ниже, чем в клетках, трансфицированных лентивирусом TCR-TPD1; (С) После 6 дней культивирования в обеих клетках Jurkat, трансфицированных вирусом TPD, TCR на поверхности клеток снизился, при этом снижение уровня экспрессии TCR в случае TCR-TPD2 было значительно ниже, чем в клетках, трансфицированных лентивирусом TCR-TPD1.

Пример 7: Создание HLA-ориентированной химерной нуклеотидной конструкции ER-TPD

В этом примере были созданы две химерные нуклеотидные конструкции ER-TPD, нацеленные на HLA.

В некоторых воплощениях были созданы три экспрессирующих вектора с использованием одного лентивирусного экспрессирующего вектора и промотора EF1 α , как показано на Фиг. 6:

(А) CNK: DAP10-CD3 ζ -T2A-NKG2D (Фиг. 8А);

(Б) HLA-TPD: E3/19К-E3L (Фиг. 8В);

(С) CNK-HLA-TPD: DAP10-CD3 ζ -T2A-NKG2D-p2A-E3/19К-E3L (Фиг. 8С).

При этом HLA-TPD представляет собой химерную белковую конструкцию ER-TPD, нацеленную на HLA, HLA-ER-TPD; CNK-HLA-TPD представляет собой химерную белковую конструкцию ER-TPD, нацеленную на HLA, CNK-HLA-ER-TPD.

Пример 8: Получение вектора, экспрессирующего химерную белковую конструкцию ER-TPD, нацеленную на HLA

Синтез полного гена осуществляли для нуклеотидных последовательностей кодирующих химерную белковую конструкцию ER-TPD, нацеленную на HLA, сконструированную в примере 7 (нуклеотидная последовательность E3/19К-E3L показана в SEQ ID NO.164, кодируемый ею белок показан в SEQ ID NO.165, нуклеотидная последовательность DAP10-CD3 ζ -T2A-NKG2D-p2A-E3/19К-E3L показана в SEQ ID NO.166, а кодируемый ею белок показан в SEQ ID NO.167). Синтез полного гена осуществляли для нуклеотидных последовательностей CNK, сконструированных в примере 7 (нуклеотидная последовательность показана в SEQ ID NO.168; кодируемый белок показан в SEQ ID NO.169). Нуклеотидные последовательности, кодирующие химерную белковую конструкцию ER-TPD, нацеленную на HLA, и нуклеотидные последовательности CNK были, соответственно вставлены в лентивирусный вектор pCDH-CMV-MCS-EF1 α -Puro (приобретенный у Youbao Biotech) путем молекулярного клонирования для конструирования лентивирусного вектора направленного воздействия HLA-TPD, лентивирусного вектора направленного воздействия CNK-HLA-TPD и

лентивирусного вектора направленного воздействия CNK. Полученные плазмиды (которые были подтверждены секвенированием) использовали для трансформации компетентных клеток DH5 α (Thermo Fisher), соответственно. Отдельные колонии собирали и культивировали в крупном масштабе. Затем плазмиды очищали и получали с использованием набора PureLink™ HiPure Plasmid Maxiprep Kit (Thermo Fisher) для получения лентивирусных плазмид TCR-ER-TPD (лентивирусной плазмиды HLA-TPD, лентивирусной плазмиды CNK-HLA-TPD и лентивирусной плазмиды CNK).

Пример 9: Получение вируса с химерной белковой конструкцией ER-TPD, нацеленной на HLA

Клетки 293T (предоставленные ATCC, Кат. № CRL3216TM) были котрансфицированы лентивирусной плазмидой TCR-ER-TPD и лентивирусной плазмидой CNK, полученными в примере 8, а также упаковывающими плазмидами psPAX2 и pMD2.G (приобретенными у Addgene, Кат. № 12259 и 12260) при соотношении 1,64пмоль:1,3пмоль:0,72пмоль. В качестве реагента для трансфекции использовали полиэтиленимин (408727, Sigma) в соотношении ДНК:мкг PEI=1:3. Подробности приготовления упаковочных плазмид можно найти в инструкции к набору PureLink™ HiPure Plasmid Maxiprep Kit (K210006, Thermo), остальные подробности процесса трансфекции можно найти в инструкции Sigma Transfections. Через 16 часов после трансфекции культуральную среду заменяли на полную среду (приобретенную у Life Technologies, кат. № 11995-065). После культивирования в течение 24 часов, 48 часов и 72 часов надосадочные жидкости с лентивирусом собирали, объединяли и центрифугировали при -80°C, 3000 об/мин в течение 10-15 минут, затем фильтровали через мембранный фильтр 0,45 мкм и, наконец, ультрацентрифугировали при 25000 об/мин, 4°C в течение 2-3 часов, чтобы получить, соответственно концентрат лентивируса. Концентрат лентивируса HLA-TPD, концентрат лентивируса CNK-HLA-TPD и концентрат лентивируса CNK, соответственно, собирали и хранили при -80°C.

Пример 10: Получение клеток 293 с HLA ER-TPD

Восстановленные клетки 293 культивировали в среде DMEM, дополненной 5% FBS, в инкубаторе с температурой 37°C и 5% CO₂. Среду меняли каждые 2-3 дня, а плотность клеток поддерживали на уровне 80% конfluence. После восстановления состояния клетки трансфицировали лентивирусом, полученным в примере 9. Подробности стадий представлены ниже: развести клетки 293T до концентрации 0,5×10⁶ отдельных клеток/мл, распределить их в 24-луночной планшете, добавить к клеткам концентрат лентивируса, приготовленный в примере 9 (MOI = 1), добавить также полибрен 5 мкг/мл, центрифугировать на низкой скорости (500–1000 г/мин) в течение 30–60 минут в

плоскоугольной центрифуге, затем культивировать клетки в инкубаторе при 37°C. Клетки 293Т, экспрессирующие CNK, HLA-TPD или CNK-HLA-TPD, получали через 48 часов после заражения, фенотип клеток определяли методом проточной цитометрии.

На Фиг. 9 показаны результаты 48-часовой проточной цитометрии для клеточного фенотипирования 293 клеток, котрансфицированных химерной нуклеотидной конструкцией ER-TPD, нацеленной на HLA-abc, и экспрессирующим вектором CNK. Культивируемые клетки 293Т трансфицировали следующим вирусом, соответственно: (1) лентивирус CNK (DAP10-CD3 ζ -T2A-NKG2D), (2) лентивирус HLA-TPD (E3/19K-E3L) и (3) лентивирус CNK-HLA-TPD (DAP10-CD3 ζ -T2A-NKG2D-p2A-E3/19K-E3L); в качестве контроля использовали нетрансфицированные клетки. Через 48 часов после трансфекции 5×10^5 нетрансфицированных клеток 293Т и клеток, трансфицированных вирусом, обрабатывали антителами HLA-abc-FITC, NKG2D-PE-Cy7 (все антитела были приобретены у Biolegend) для окрашивания с последующим фенотипированием клеток с помощью проточного цитометра (BD FACSCanto II). Результаты показали, что нетрансфицированные клетки 293 экспрессируют HLA-abc, но не NKG2D; (1) клетки 293Т, трансфицированные лентивирусом CNK, экспрессируют как HLA-abc, так и NKG2D; (2) клетки 293Т, трансфицированные лентивирусом HLA-TPD, не экспрессируют ни HLA-abc, ни NKG2D; (3) Клетки 293Т, трансфицированные лентивирусом CNK-HLA-TPD, экспрессируют NKG2D, но не HLA-abc.

Пример 11: Создание химерной нуклеотидной конструкции ER-TPD, нацеленной на CD123.

В этом примере были созданы химерные нуклеотидные конструкции ER-TPD, нацеленные на CD123.

В некоторых воплощениях химерные нуклеотидные конструкции ER-TPD, нацеленные на CD123, экспрессирующие анти-CD123scFv-E3L, были созданы с использованием одного лентивирусного экспрессирующего вектора и промотора EF1 α , как показано на Фиг. 10.

Пример 12: Получение экспрессирующего вектора с химерной белковой конструкции ER-TPD, нацеленной на CD123

Синтез полного гена осуществляли для кодирующих нуклеотидных последовательностей химерной белковой конструкции ER-TPD, нацеленной на CD123, сконструированной в примере 11 (нуклеотидная последовательность анти-CD123scFv-E3L показана в SEQ ID NO.170, ее кодируемый белок представлено в SEQ ID NO.171). Нуклеотидную последовательность встраивали в лентивирусный вектор рCDH-CMV-MCS-EF1 α -Puro (приобретенный у Youbao Biotech) путем молекулярного

клонирования для конструирования лентивирусного целевого вектора CD123-ER-TPD. Полученные плазмиды (подтвержденные секвенированием) использовали для трансформации компетентных клеток DH5 α (Thermo Fisher). Отдельные колонии собирали и культивировали в крупном масштабе. Затем плазмиды очищали и получали с использованием набора PureLink™ HiPure Plasmid Maxiprep Kit (Thermo Fisher) для получения лентивирусной плазмиды CD123 ER-TPD.

Пример 13: Получение вируса с химерной белковой конструкцией ER-TPD, нацеленной на CD123.

Клетки 293T (предоставленные ATCC, Кат. № CRL3216TM) котрансфицировали лентивирусной плазмидой CD123 ER-TPD, полученной в примере 12, а также упаковывающими плазмидами psPAX2 и pMD2.G (приобретенными у Addgene, Кат. № 12259&12260) в соотношении 1,64 пмоль: 1,3 пмоль: 0,72 пмоль. В качестве реагента для трансфекции использовали полиэтиленимин (408727, Sigma) в соотношении ДНК:мкг PEI=1:3. Подробности приготовления упаковочных плазмид можно найти в инструкции к набору PureLink™ HiPure Plasmid Maxiprep Kit (K210006, Thermo), остальные подробности процесса трансфекции можно найти в инструкции Sigma Transfections. Через 16 часов после трансфекции культуральную среду заменяли на полную среду (приобретенную у Life Technologies, кат. № 11995-065). После культивирования в течение 24 часов, 48 часов и 72 часов надосадочные жидкости с лентивирусом собирали, объединяли и центрифугировали при -80°C, 3000 об/мин в течение 10-15 минут, затем фильтровали через мембранный фильтр 0,45 мкм и, наконец, ультрацентрифугировали при 25000 об/мин, 4°C в течение 2-3 часов с получением концентрата лентивируса. Концентрат лентивируса CD123-ER-TPD собирали и хранили при -80°C.

Пример 14: Получение клеток THP1 с ER-TPD, нацеленным на CD123.

Восстановленные клетки THP1 культивировали в среде RPMI1640, дополненной 5% FBS, в инкубаторе с температурой 37°C и 5% CO₂. Среду меняли каждые 2-3 дня, а плотность клеток поддерживали на уровне 1×10⁶ единичных клеток/мл. После восстановления состояния клетки трансфицировали лентивирусом CD123-ER-TPD, полученным в примере 13. Подробности стадий представлены ниже: развести клетки THP1 до концентрации 0,5 ×10⁶ отдельных клеток/мл, распределить их в 24-луночном планшете, добавить к клеткам концентрат лентивируса, приготовленный в примере 13 (MOI = 0,5 или 1). Также добавить полибрен 5 мкг/мл, центрифугировать на низкой скорости (500–1000 г/мин) в течение 30–60 минут в центрифуге с плоским углом, затем культивировать клетки в инкубаторе при 37°C. Клетки THP1, экспрессирующие CD123 ER-TPD, получали через 48 часов после заражения, фенотип клеток определяли методом

проточной цитометрии.

На Фиг. 11 показаны результаты 48-часовой проточной цитометрии для клеток, полученных в примере 13, т.е. клеток линии THP1 клеток острого миелолейкоза, трансфицированных лентивирусом scFv TPD, нацеленным на CD123. Клетки THP1, культивированные в среде RPMI, трансфицировали, соответственно следующим вирусом: (1) анти-CD123 ERD-E3L (MOI=0,5); (2) анти-CD123 ERD-E3L (MOI=1); в качестве контроля использовали нетрансфицированные клетки. Через 48 часов после трансфекции 5×10^5 нетрансфицированных клеток THP1 и клеток, трансфицированных вирусом, обрабатывали антителами CD14-FITC, CD33-APC-Cy7, CD123-PE-Cy7 (все антитела были приобретены у Biolegend) для окрашивания с последующим фенотипированием клеток с помощью проточный цитометр (BD FACSCanto II). Результаты показали, что нетрансфицированные клетки THP1 экспрессируют CD14, CD33 и CD123 на высоком уровне; (1) в клетках THP1, трансфицированных анти-CD123 ERD-E3L (MOI=0,5), уровень экспрессии CD14 и CD33 сохранялся, тогда как уровень экспрессии CD123 значительно снижался; (2) в клетках THP1, трансфицированных анти-CD123 ERD-E3L (MOI=1), уровень экспрессии CD14 и CD33 сохранялся, тогда как уровень экспрессии CD123 значительно снижался.

Пример 15: Применение ER-TPD-CD123 CAR-T-клеток, нацеленных на CD123

CD123 является очень важной мишенью для острого миелолейкоза, ОМЛ, и были получены CAR-T-клетки, нацеленные на CD123 (Фиг. 12A1). Однако, поскольку активированные Т-клетки также экспрессируют CD123 (Фиг. 12B1), CAR-T-клетки, нацеленные на CD123, будут демонстрировать суицидальный эффект в каждом процессе активации, культивирования и уничтожения опухолевых клеток (Фиг. 12C1), что приводит к ограничению пролиферации клеток и слабому терапевтическому эффекту в клинических условиях.

Химерная белковая конструкция CD123 CAR-T-T2A-CD123 ER-TPD (Фиг. 12A2) может быть создана с помощью технологии ER-TPD настоящего раскрытия, которая позволяет эффективно разрушать эндогенный CD123 (Фиг. 12B2), что позволяет обеспечить хорошую пролиферацию клеток и достичь более точного уничтожения опухолевых клеток (Фиг. 12C2). В случае, когда CAR-T нацелен на антигены Т-клеток, аутоантиген может быть целенаправленно разрушен путем комбинирования с технологией ER-TPD. CAR и ER-TPD (которые нацелены на один и тот же антиген) могут быть сконструированы в одном и том же векторе, чтобы достичь как деградации аутоантигена, так и направленной активности Т-клеток с помощью одного единственного инженерного вмешательства в Т-клетки. Трансфицированные клетки целенаправленно разрушают

аутоантиген с помощью химерной белковой конструкции ER-TPD, в то время как нетрансфицированные клетки экспрессируют антиген, поэтому трансфицированные клетки CAR-T будут специфически уничтожать нетрансфицированные клетки, и чистота клеток будет естественным образом увеличиваться вместе с процессом культивирования клеток. В этом случае последующие стадии очистки и проверки можно пропустить, а эффективность крупномасштабного производства значительно повысится. Кроме того, по сравнению с традиционной технологией Crispr/cas9, технология ER-TPD имеет преимущества в низкой стоимости, высокой эффективности и легкости достижения крупномасштабного производства, одновременно устраняя побочные эффекты нестабильности хромосом или нецелевые эффекты, вызванные редактированием генов. Следовательно, CAR/ER-TPD-T-клетки превосходят как клеточные функции, так и жизнеспособность. Эта комбинированная технология CAR/ER-TPD может хорошо решать клинические проблемы, позволяя применять CAR-T к мишеням, специфически экспрессируемым на T-клетках (таких как CD4, CD5, CD7, CD38, CD123), не вызывая при этом суицидальных эффектов. Например, эту технологию можно использовать при T-лимфобластном лейкозе (например, остром T-лимфобластном лейкозе (Т-ОЛЛ) или хроническом T-лимфобластном лейкозе (Т-ХЛЛ), T-пролимфоцитарном лейкозе (Т-ПЛЛ), лейкозе из больших зернистых лимфоцитов (LGLL), миелолейкозе (например, остром миелолейкозе (ОМЛ), хроническом миелолейкозе (ХМЛ))), ВИЧ-инфекции, для очистки инфицированных вирусом CD4 T-клеток.

Пример 16: Применение мРНК ER-TPD, нацеленной на Тау/Аβ, для лечения нейродегенеративного заболевания, болезни Альцгеймера

Внутриклеточное накопление Тау и амилоида-β (Аβ) является патологическим признаком болезни Альцгеймера (БА) и связанных с ней таупатий, поэтому усиление направленной активности против тау-белка может способствовать разработке лекарственных средств. Внутриклеточное накопление гиперфосфорилированного тау (p-tau) и внеклеточное отложение β-амилоида (Аβ) являются патологическими признаками мозга при болезни Альцгеймера (БА). В последние несколько десятилетий разработка лекарств от БА была в основном сосредоточена на Аβ. Поэтому были разработаны и протестированы различные способы лечения, нацеленные на Аβ, такие как снижение продуцирования Аβ с помощью ингибиторов β-γ-секретазы, стимулирование деградации Аβ или удаление Аβ с помощью антител. К сожалению, ни один из способов лечения, нацеленных на Аβ, на сегодняшний день не достиг клинической эффективности. Таким образом, терапия, нацеленная на Тау, становится важной стратегией лечения БА. В настоящее время на основе технологии PROTAC разработаны лекарственные средства для

целенаправленной деградации тау в клетках головного мозга, но ни один из них не достигает наблюдаемого терапевтического эффекта в клинических условиях, поскольку молекулы часто не могут эффективно проникать в клетки. Однако технология ER-TPD по настоящему раскрытию может быть использована для разработки и конструирования мРНК или бРНК (бесконечная циклическая РНК), кодирующих химерные белковые конструкции ER-TPD, нацеленные на Тау или β -амилоид ($A\beta$). Химерные белковые конструкции ER-TPD, нацеленные на Тау и/или β -амилоид ($A\beta$), могут быть доставлены в нейроны с помощью липосом (LNP) или наночастиц (NP), нацеленных на нейроны, и генерировать стабильную экспрессию для достижения эффективной деградации Тау и β -амилоида. В этом случае можно эффективно предотвратить дегенерацию нейронов и замедлить прогрессирование болезни Альцгеймера.

Пример 17: Применение ДНК ER-TPD, нацеленного на HBx, для лечения хронического гепатита HBV.

Гепатоцеллюлярная карцинома (ГЦК) является одной из ведущих причин смертности от онкологических заболеваний в современном мире, и большинство случаев связано с хронической инфекцией вируса гепатита В (HBV). Известно, что кодируемый HBV белок X (HBx) играет ключевую роль в патогенезе вирусной ГЦК. HBx представляет собой многофункциональный белок, который регулирует экспрессию различных клеточных и вирусных генов, участвующих в выживании клеток, развитии клеточного цикла, репарации ДНК, инвазии и деградации белков. HBx также регулирует несколько сигнальных путей (таких как Ras/Raf/MAPK, PI3K/Akt, NF- κ B и JNK). Технология ER-TPD по настоящему раскрытию может быть использована для конструирования и экспрессии транспозонной ДНК химерной белковой конструкции ER-TPD, нацеленной на HBx. Эту транспозонную ДНК можно доставлять и интегрировать в клетки печени с помощью липосом или наночастиц, нацеленных на клетки печени. После интеграции долгосрочная деградация онкогенного белка HBV HBx может быть достигнута путем долгосрочной экспрессии химерных белковых конструкций HBx ER-TPD. В этом случае можно эффективно предотвратить пролиферацию HBV и устранить цитопатии и прогрессирование рака, вызванных HBx.

Пример 18. Применение ДНК ER-TPD против ДНК-полимеразы для лечения хронического гепатита HBV.

ДНК-полимераза HBV: Полимераза вируса гепатита В (HBV) представляет собой многофункциональный фермент с функциями РНК-зависимой и ДНК-зависимой полимеразы, а также функцией рибонуклеазы H. Эта полимераза преобразует прегеномную РНК HBV (pgRNA) посредством обратной транскрипции с образованием

новых молекул ркДНК внутри нового капсида. ДНК-полимераза HBV является ключевым компонентом вирусного капсида HBV. Технология ER-TPD настоящего раскрытия может быть использована для конструирования и экспрессии транспозонной ДНК химерной белковой конструкции ER-TPD, нацеленной на ДНК-полимеразу HBV. Эту транспозонную ДНК можно доставлять и интегрировать в клетки печени с помощью липосом или наночастиц, нацеленных на клетки печени. После интеграции эффективная деградация ДНК-полимеразы HBV может быть достигнута путем долгосрочной экспрессии химерной белковой конструкции ER-TPD против ДНК-полимеразы HBV. В этом случае экспрессия конструкции напрямую ингибирует репликацию ДНК после заражения HBV и интеграцию в геном, блокирует сборку и упаковку HBV, тем самым полностью подавляя ген HBV.

Пример 19: Применение ДНК ER-TPD против РНК-зависимой обратной транскриптазы HIV для лечения ВИЧ-инфекции

HIV представляет собой одноцепочечный РНК-вирус. Чтобы инфицировать клетки-хозяева, необходимо осуществить обратную транскрипцию генома одноцепочечной РНК в копию двухцепочечной ДНК с помощью обратной транскриптазы и интегрировать эту копию в хромосому хозяина. Таким образом, воздействие на РНК-зависимую обратную транскриптазу HIV может эффективно контролировать упаковку и интеграцию активного HIV. Технология ER-TPD по настоящему раскрытию может быть использована для конструирования и экспрессии транспозонной ДНК химерной белковой конструкции ER-TPD, нацеленной на обратную транскриптазу HIV-1. Эта транспозонная ДНК может быть доставлена и интегрирована в CD4+ клетки с помощью липосом или наночастиц, нацеленных на CD4+ клетки. После интеграции целенаправленная деградация обратной транскриптазы HIV-1 может быть достигнута путем долгосрочной экспрессии химерной белковой конструкции ER-TPD против обратной транскриптазы HIV-1. В этом случае данная конструкция напрямую ингибирует упаковку вируса после заражения HIV и интеграцию в геном, тем самым напрямую обеспечивая подавление генов HIV.

Пример 20: Применение ДНК ER-TPD, нацеленного на Bcl-2, для лечения опухоли

Апоптоз играет важную роль в возникновении, развитии и лекарственной устойчивости опухолей. Экспрессия и регуляция семейства Bcl-2 оказывают большее влияние на апоптоз опухолевых клеток и могут взаимодействовать с протоонкогеном *gas*, вызывая злокачественную трансформацию клеток и способствуя росту опухоли. Bcl-2 и/или Bcl-xL сверхэкспрессируются во многих опухолях человека, таких как опухоли желудочно-кишечного тракта, лимфома, нейробластома, рак мочевого пузыря и т.п. Высоко экспрессируемый Bcl-2 может ингибировать апоптоз клеток, ускорять рост клеток и приводить к возникновению злокачественных опухолей.

Сверхэкспрессия белка Bcl-2 также распространена в несолидных опухолях. Bcl-2 высоко экспрессируется при хроническом лимфоцитарном лейкозе (ХЛЛ), фолликулярной лимфоме (ФЛ), мантийноклеточной лимфоме (МКЛ) и макроглобулинемии Вальденстрема (МВ). Таким образом, антиапоптотический белок Bcl-2 стал новой мишенью для лечения опухолей. Антиапоптотические представители семейства Bcl-2 включают Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-W, Mcl-1 и т.п., имеющие общие консервативные и высоко гомологичные мотивы BH1 и BH2. Таким образом, можно разработать нанотела против мотивов BH1 и BH2, провести скрининг последовательностей антител, которые широко связываются с антиапоптотическими представителями семейства Bcl-2, а также спроектировать и экспрессировать химерные нуклеотидные конструкции ER-TPD, нацеленные на антиапоптотических представителей семейства Bcl-2 (таких как Bcl-2, Bcl-xL и Bcl-W, на основе технологии ER-TPD. Химерную нуклеотидную конструкцию загружают в онколитический вирус с получением онколитического вируса, загруженного химерной нуклеотидной конструкцией ER-TPD, нацеленной на Bcl-2. Онколитический вирус специфически инфицирует опухолевые клетки и инициирует экспрессию химерной белковой конструкции ER-TPD, нацеленной на антиапоптотический белок Bcl-2, с помощью сильного промотора в онколитическом вирусе, таком как CMV, для достижения эффективной направленной деградации антиапоптотических представителей семейства Bcl-2 и устранения антиапоптотического механизма в опухолях. В этом случае эта конструкция непосредственно индуцирует апоптоз опухолевых клеток, способствует лизису клеток и диффузии онколитических вирусов, чтобы убить и уничтожить опухолевые клетки.

По той же причине можно нацелить онколитический вирус непосредственно на онкогенные белки, например, ER-TPD против мутантного белка Kras, чтобы добиться деградации онкогенных белков.

Пример 21: Применение химерной белковой конструкции ER-TPD, нацеленной на аутоантитела, для лечения аутоиммунных заболеваний

Маркеры аутоиммунитета к бета-клеткам при диабете I типа включают четыре аутоантитела, а именно антитела к островковым клеткам (ICA), антитела к декарбоксилазе глутаминовой кислоты (GAD-65), антитела к инсулину (IAA) и антитела к ферменту тирозинфосфатазе (IA-2A), которые являются диагностическими маркерами возникновения диабета и факторами, индуцирующими прогрессирование заболевания. Антитела к инсулину обычно являются самым ранним маркером риска диабета I типа у детей. У 70% пациентов детского возраста на момент постановки диагноза имеются антитела к инсулину, у 85% — антитела против GAD65. Клинически чрезвычайно сложно

вмешаться или устранить эти аутоантитела. Транспозонная ДНК ER-TPD, нацеленная на аутоантитела к инсулину (IAA), может быть создана на основе технологии ER-TPD. Эту транспозонную ДНК можно доставлять и интегрировать в плазматические клетки с помощью липосом или наночастиц, нацеленных на плазматические клетки. После интеграции долгосрочная экспрессия химерной белковой конструкции IAA ER-TPD может обеспечить долгосрочную деградацию антитела к инсулину, увеличить скорость использования инсулина в периферической крови и тем самым эффективно предотвратить прогрессирование диабета. Как показано на Фиг. 13А, плазматические клетки у пациентов с диабетом I типа экспрессируют и высвобождают антитела к инсулину, которые связывают инсулин и выводят инсулин из периферической крови, что приводит к значительному снижению скорости использования инсулина у пациентов. На Фиг. 13В показано, что транспозонная ДНК с ER-TPD, нацеленным на аутоантитела к инсулину, может быть доставлена в плазматические клетки с помощью липосом, нацеленных на плазматические клетки, для достижения интеграции, долгосрочной экспрессии химерной белковой конструкции IAA ER-TPD, а также целевого связывания и деградации антител к островковым клеткам в эндоплазматическом ретикулуме, тем самым обеспечивая нормальную функцию инсулина в периферической крови.

Пример 22: Элементы УТ и их производные

Типичные химерные слитые белки, содержащие фрагмент, связывающий молекулы TCR $\alpha\beta$ или HLA, один или несколько трансмембранных и цитоплазматических доменов вирусного ЭПР-резидентного белка в кассетах, проиллюстрированы на Фиг. 14. Например, на Фиг. 14А, химерные слитые белки включают scFv с фрагментом анти-TCR $\alpha\beta$ HLA антитела, шарнир/линкер (например, SEQ NO. 5. шарнир IgG4; и SEQ ID NO.15 (Gly 4 Ser)₂, которые объединены с любым трансмембранным доменом и цитоплазматическим доменом ЭПР-резидентного гликопротеина, например, US2 HCMV (SEQ ID NO.19 и NO.20). Например, на Фиг. 14В, химерные слитые белки включают scFv с фрагментом анти-TCR $\alpha\beta$ или HLA антитела, шарнир/линкер (например, SEQ NO. 5. шарнир IgG4; и SEQ ID NO.15 (Gly 4 Ser)₂, которые объединены с двумя или несколькими трансмембранными доменами и цитоплазматическим доменом ЭПР-резидентного гликопротеина, например, US2 HCMV (SEQ ID NO.19 и NO.20) и US3 HCMV (SEQ ID NO.20 и NO.21). Например, на Фиг. 14С, химерные слитые белки включают scFv с фрагментом анти-TCR $\alpha\beta$ или HLA антитела, шарнир/линкер (например, SEQ NO. 5. шарнир IgG4; и SEQ ID NO.15 (Gly 4 Ser)₂, которые объединены с рекомбинантным мотивом трансмембранного домена и цитоплазматического домена, полученного из различных ЭПР-резидентных гликопротеинов, например, US2 HCMV (SEQ ID NO.19 и

NO.20) и US11 HCMV (SEQ ID NO.19, NO.20, NO.22, NO.23).

Эти элементы UT, кодирующие молекулу нуклеиновой кислоты, клонировали в лентивирусный вектор и затем трансдуцировали в клетки Jurkat или Т-клетки человека.

Пример 23: Трансдуцированные элементы UT эффективно блокируют экспрессию TCR $\alpha\beta$ в клетках Jurkat.

Была разработана типовая лентивирусная конструкция, кодирующая элемент UT, содержащая анти-TCR $\alpha\beta$, объединенное с трансмембранным и цитоплазматическим доменом US2 HCMV или US11 HCMV и/или E19 аденовируса, пептид саморасщепления T2A, укороченный EGFR (названная анти-TCR-US2 TM/CT-T2A-EGFRt; анти-TCR-US11 TM/CT-T2A-EGFRt; анти-TCR-E19 TM/CT-T2A-EGFRt; анти-TCR-US2-TM/CT-T2A-анти-TCR-E19 TM /CT-T2A-EGFRt). ДНК синтезировали и клонировали в лентивирусный вектор (такой как pLenti CMV GFP-puro), а лентивирус продуцировали в клетках 293Т с использованием упаковочных векторов (таких как psPAX и pMD2G). Клетки Jurkat культивировали в среде RPMI, 10% человеческой сыворотки, 2 мМ L-глутамина и 1% пенициллин-стрептомицина (среда CTL), а затем трансдуцировали лентивирусной надосадочной жидкостью (как указано) (MOI=3), дополненной 0,8 мкг/мл полибрена (Millipore, Бедфорд, Массачусетс). После 3-дневного размножения клетки подвергли проточной цитометрии для изучения экспрессии укороченного EGFR и TCR $\alpha\beta$ в клетках Jurkat (Фиг. 15). Для фенотипирования и анализа методом проточной цитометрии использовали следующие конъюгированные антитела: CD4-APC, CD8-Pacific Blue, TCR-ab-APC-Cy7, EGFR-PE (Biolegend). Окрашивание йодидом пропидия (PI, BD Biosciences) проводили для распознавания живых/мертвых клеток в соответствии с указаниями производителя. Анализы потока были выполнены на FACS Canto II, сортировка-очистка - на FACS Ariall (Becton Dickinson, Франклин Лейкс, Нью-Джерси), а данные проанализированы с использованием программного обеспечения FlowJo (Treestar, Эшленд, Орегон). Результат показал, что трансдуцированные клетки экспрессируют укороченный EGFR. и имеет место значительное подавление TCR $\alpha\beta$ как на CD8+, так и на CD4+ Т-клетках, в то время как нетрансдуцированные клетки Jurkat экспрессируют высокий уровень TCR $\alpha\beta$ в отсутствие укороченного EGFR.

Пример 24: Принудительная экспрессия элементов UT может эффективно подавлять экспрессию TCR в Т-клетках человека.

Как показано на Фиг. 16А, была разработана типовая лентивирусная конструкция, кодирующая элемент UT, содержащая анти-TCR $\alpha\beta$, объединенный с трансмембранным и цитоплазматическим доменом US2 HCMV, пептид саморасщепления T2A и укороченный EGFR (названная анти-TCR-US2 TM/CT-T2A-EGFRt), которую клонировали в

лентивирусный вектор (такой как pLenti CMV GFP-puro), и лентивирус продуцировали в клетках 293Т с использованием упаковочных векторов (таких как psPAX и pMD2G). Человеческие CD8⁺ и CD4⁺ выделяли из PBMC нормальных доноров с использованием набора для выделения CD3⁺ Т-клеток (MilteNY Biotec), активировали гранулами анти-CD3/CD28 (Life Technologies) в соответствии с инструкциями производителя и трансдуцировали лентивирусной надосадочной жидкостью (как указано в каждом Примере) (MOI=3) с добавлением 0,8 мкг/мл полибреана (Millipore, Бедфорд, Массачусетс) на 3-й день после активации центрифугированием при 2100 об/мин в течение 45 минут при 32°C. Т-клетки размножали в RPMI с 10% сывороткой человека, 2 mM L-глутамина и 1% пенициллин-стрептомицина (среда CTL), дополненной рекомбинантным человеческим (rh) IL-2 до конечной концентрации 50 Ед/мл каждые 48 часов. После 12-дневного размножения аликвоту каждой трансдуцированной линии Т-клеток окрашивали CD8-Pacific Blue, CD4-APC, TCR-ab-APC-Cy7, EGFR-PE (Biolegend) и затем подвергали анализу проточной цитометрией.

Результат показывает, что трансдуцированные Т-клетки (EGFR⁺) значительно подавляют экспрессию TCR $\alpha\beta$ как на поверхности CD8⁺, так и CD4⁺ клеток по сравнению с нетрансдуцированными Т-клетками. В заключение необходимо отметить, что элементы US, содержащие анти-TCR-US2 TM/CT, могут эффективно подавлять экспрессию TCR $\alpha\beta$ в Т-клетках человека, что может ингибировать TCR-опосредованную РТПХ *in vivo* после переливания другому реципиенту.

Как показано на Фиг. 16В, разработали типовую лентивирусную конструкцию, кодирующую элемент UT, содержащую анти-TCR $\alpha\beta$, объединенный с трансмембранным и цитоплазматическим доменом аденовируса E19, пептидом саморасщепления T2A и укороченный EGFR (названная антиTCR-E19 TM/CT-T2A-EGFRt), которую клонировали в лентивирусный вектор (такой как pLenti CMV GFP-puro), и лентивирус продуцировали в клетках 293Т. Человеческие CD8⁺ и CD4⁺ трансдуцировали двумя дозами лентивирусной надосадочной жидкости (1 \times , 2 \times) и размножали в среде CTL, дополненной рекомбинантным человеческим (rh) IL-2. После 12-дневного размножения аликвоту каждой трансдуцированной линии Т-клеток окрашивали CD8-Pacific Blue, CD4-APC, TCR-ab-APC-Cy7, EGFR-PE (Biolegend) и затем подвергали анализу проточной цитометрией.

Результат показывает, что Т-клетки, трансдуцированные UT(E19) (EGFR⁺), также могут эффективно блокировать экспрессию TCR $\alpha\beta$ на поверхности CD8⁺ и CD4⁺ клеток по сравнению с нетрансдуцированными Т-клетками. При увеличении дозы трансдукции вируса подавление экспрессии TCR $\alpha\beta$ может быть значительно улучшено за счет

увеличения эффективности трансдукции и количества копий элементов UT в клетках. В заключение необходимо отметить, что элементы US, содержащие анти-TCR-E19 TM/CT, могут эффективно подавлять экспрессию TCR $\alpha\beta$ в Т-клетках человека, что также может ингибировать TCR-опосредованную РТПХ *in vivo* после переливания другому реципиенту.

Пример 25: Фенотип CNK-Т-клеток, экспрессирующих элементы UT

Как показано на Фиг. 17, разработали типовую лентивирусную конструкцию, кодирующую последовательность CNK, последовательность T2A и элемент UT, содержащую анти-TCR $\alpha\beta$, объединенный с доменом TM и CT аденовируса E19, пептидом саморасщепления T2A (названная CNK-UT-E19, которую клонировали в лентивирусную вектор (такой как pLenti CMV GFP-*puro*) и лентивирус продуцировали в клетках 293T. CD8⁺ и CD4⁺ человека трансдуцировали двумя дозами лентивирусной надосадовой жидкости и размножали в среде CTL, дополненной IL-2. После 12-дневного размножения аликвоту каждой трансдуцированной линии Т-клеток окрашивали CD8-Pacific Blue, CD4-APC, TCR-ab-APC-Cy7, NKG2D-PE-Cy7 (Biolegend), а затем подвергали анализу проточной цитометрией. Результаты показывают, что включение элементов UT в CNK-Т-клетки может значительно подавлять экспрессию TCR $\alpha\beta$ в клетках CNK-Т, не мешая экспрессии NKG2D как в CD8⁺, так и в CD4⁺ Т-клетках.

Пример 26: Цитотоксичность CNK-Т-клеток, экспрессирующих элементы UT

Эффекторную функцию *in vitro* CD3⁺ Т-клеток, сконструированных для экспрессии CNK или CNK-UT, сравнивали с нетрансдуцированными Т-клетками, соответственно — в анализе совместного культивирования с клеточной линией ГЦК, клетками HerG2. Вкратце, $0,5 \times 10^6$ клеток HerG2 высевали на 24-луночные планшеты за 24 часа до совместного культивирования. К клеткам HerG2 добавляли 1×10^5 эффекторных клеток (Е:Т=1:5) и инкубировали при 37 градусах еще в течение 24 часов перед анализом. После совместного культивирования клетки собирали и окрашивали CD8-Pacific Blue, CD4-APC, CD45-PerCP-Cy5.5, CD25-APC-Cy7 и CD137-PE-Cy7 (Biolegend), а затем подвергали анализу проточной цитометрией. Результаты показывают, что как CNK-Т, так и CNK-UT(E19) могут эффективно устранять HerG2 в анализе совместного культивирования по сравнению с нетрансдуцированными Т-клетками (Фиг. 18). Кроме того, CNK-UT-клетки значительно активируют CD25 и CD137, маркеры активации Т-клеток, как и обычные CNK-Т. В заключение необходимо отметить, что включение элементов UT не будет влиять на функцию Т-клеток, например, на цитотоксичность в отношении опухолевых клеток.

Пример 27: Проектирование многофункционального комплекса CNK-UT.

В данном примере спроектированы четыре многофункциональных комплекса CNK-UT. Среди них первая структура представляет собой базовый многофункциональный

комплекс «CNK-UT», а остальные три структуры представляют собой многофункциональный комплекс «CNK-UT», имеющий дополнительные функции, образованные путем добавления к первой структуре других модулей.

3.1 Базовый многофункциональный комплекс CNK-UT

В некоторых воплощениях используется базовый многофункциональный комплекс CNK-UT, принципиальная схема которого представлена на Фиг. 19А, который содержит три модуля: (1) модуль рецепторов, активирующих НК, (2) модуль передачи сигнала CNK и (3) модуль UT. Необязательно, шарниры или линкеры включены между модулем рецептора, активирующего НК, модулем передачи сигнала CNK и/или модулем UT.

Где,

(1) модуль рецептора, активирующего НК, по меньшей мере, содержит рецептор, активирующий НК-клетки, или его функциональный вариант, рецептор, активирующий НК-клетки, содержит: (a) внеклеточный домен (ED) рецептора, активирующего НК-клетки или его функциональный вариант, (b) трансмембранный домен (TMD) рецептора, активирующего НК-клетки, или его функциональный вариант, и (c) внутриклеточный домен (ICD) рецептора, активирующего НК-клетки, или функциональный вариант его вариант; и необязательно шарнир или линкер включен между внеклеточным доменом рецептора, активирующего НК-клетки, или его функциональным вариантом, трансмембранным доменом рецептора, активирующего НК-клетки, или его функциональным вариантом, и/или внутриклеточным доменом рецептора, активирующего НК-клетки, или его функциональным вариантом.

В некоторых предпочтительных воплощениях многофункциональный комплекс CNK содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO. 1-24.

(2) модуль передачи сигнала CNK по меньшей мере содержит (i) сигнальный адаптер НК-клетки или его функциональный вариант, сигнальный адаптер НК-клетки содержит: (a) внеклеточный домен (ED) сигнального адаптера НК-клетки или функциональный вариант, (b) трансмембранный домен (TMD) сигнального адаптера НК-клетки или его функциональный вариант и (c) внутриклеточный домен (ICD) сигнального адаптера НК-клетки или его функциональный вариант; необязательно, шарнир или линкер включен между внеклеточным доменом сигнального адаптера НК-клетки или его функциональным вариантом, трансмембранным доменом сигнального адаптера НК-клетки или его функциональным вариантом и/или внутриклеточным доменом сигнального адаптера НК-клетки или его функциональным вариантом.

(3) модуль UT по меньшей мере содержит (1) молекулу рекомбинантного белка для

направленной деградации TCR или его функционального варианта, где молекула рекомбинантного белка для направленной деградации TCR содержит: (а) домен связывающей белковой молекулы, нацеленный на TCR, или его функциональный вариант, (b) трансмембранный домен вирусного гликопротеина, резидентного в эндоплазматическом ретикулуме (ЭПР) или его функционального варианта и (с) цитоплазматический домен вирусного гликопротеина, резидентного в эндоплазматическом ретикулуме (ЭПР) или его функционального варианта; трансмембранный домен вирусного гликопротеина, резидентного в эндоплазматическом ретикулуме, или его функционального варианта и цитоплазматический домен вирусного гликопротеина, резидентного в эндоплазматическом ретикулуме, или его функционального варианта образуют домен деградации ERAD; необязательно, шарнир или линкер включен между доменом молекулы связывающего белка, нацеленным на TCR или его функциональным вариантом, трансмембранным доменом вирусного гликопротеина, резидентного в эндоплазматическом ретикулуме, или его функциональным вариантом и/или цитоплазматическим доменом вирусного гликопротеина, резидентного в эндоплазматическом ретикулуме, или его функциональным вариантом.

В молекуле рекомбинантного белка для направленной деградации TCR, содержащейся в модуле UT, домен связывающей белковой молекулы, нацеленный на TCR или его функциональный вариант, получен из антитела к TCR или его функционального варианта или их комбинации.

В некоторых предпочтительных воплощениях антитело выбрано из антитела к TCR α , антитела к TCR β , антитела к TCR $\alpha\beta$, антитела к TCR γ , антитела к TCR δ , антитела к TCR $\gamma\delta$, антитела к TCR V δ 2, антитела к TCR C β 1; функциональный вариант антитела выбран из Fd, Fv, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv(scFv), одноцепочечного антитела (scFv) или нанотела, диатела, тритела и тетратела; предпочтительно антитело TCR представляет собой одноцепочечное антитело к TCR. В некоторых предпочтительных воплощениях молекула связывающего белка, нацеленная на TCR, представляет собой антитело к TCR $\alpha\beta$. В некоторых предпочтительных воплощениях аминокислотная последовательность одноцепочечного антитела к TCR содержит аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO. 113.

В некоторых предпочтительных воплощениях домен деградации ERAD, содержащийся в модуле UT, получен из гликопротеина US2, US3, US11, US10 из HCMV, E3-K19 из аденовируса или US21 из HHV-7.

В некоторых предпочтительных воплощениях домен деградации ERAD, содержащийся в модуле UT, содержит аминокислотную последовательность,

представленную SEQ ID NO. 46-63.

Фрагменты генетических элементов различных модулей базового многофункционального комплекса CNK-UT могут быть синтезированы методами генного синтеза. Используя полицистронную систему экспрессии, фрагменты генетических элементов разных модулей соединяются такими элементами, как саморасщепляющийся пептид 2A (2A: T2A, p2A, E2A, F2A), с получением фрагмента гена базового многофункционального комплекса CNK-UT; Синтезированный фрагмент гена базового многофункционального комплекса CNK-UT был клонирован в лентивирусный вектор путем молекулярного клонирования и использован для трансфекции Т-клеток для одновременной экспрессии множества различных элементов, тем самым позволяя Т-клеткам не только специфически распознавать и уничтожать НК-мишени, но также эффективно ингибировать и деградировать TCR с помощью элементов UT. Альтернативно, одновременная экспрессия множества элементов CNK-UT может быть достигнута путем трансфекции Т-клеток лентивирусным вектором, содержащим различные функциональные элементы под разными промоторами. Альтернативно, одновременной экспрессии множества элементов CNK-UT также можно достичь путем одновременной трансфекции Т-клеток двумя разными лентивирусными векторами, каждый из которых содержит разные функциональные элементы.

3.2 Многофункциональный комплекс CNK-UT, содержащий домен связывающей белковой молекулы, нацеленный на МНС

В некоторых воплощениях используется многофункциональный комплекс CNK-UT, который одновременно разрушает или ингибирует TCR и МНС I и/или МНС II, его принципиальная схема показана на Фиг. 19B, который также содержит три модуля: (1) модуль рецептора, активирующего НК, (2) модуль передачи сигнала CNK и (3) модуль UT, который содержит как домен рекомбинантной белковой молекулы для направленной деградации TCR или его функциональный вариант, так и домен связывающей белковой молекулы, нацеленный на МНС I и/или МНС II, или функциональный его вариант. Этот многофункциональный комплекс отличается от базового многофункционального комплекса CNK-UT тем, что (3) модуль UT дополнительно содержит домен связывающей белковой молекулы, нацеленный на МНС I и/или МНС II или его функциональный вариант. Необязательно, шарниры или линкеры включены между модулем рецептора, активирующего НК, модулем передачи сигнала CNK и модулем UT.

В некоторых воплощениях домен связывающей белковой молекулы, нацеленный на МНС I и/или МНС II, или его функциональный вариант, представляет собой домен связывающей белковой молекулы, нацеленный на HLA, или его функциональный вариант.

В некоторых воплощениях домен связывающей белковой молекулы, нацеленный на МНС I, может происходить из вирусного белка эндоплазматического ретикулула, который ингибирует молекулы МНС I. В некоторых воплощениях вирусный гликопротеин эндоплазматического ретикулула, который ингибирует молекулы МНС I, выбран из цитомегаловируса человека (HCMV) US6, вируса простого герпеса (HSV) ICP47, вируса коровьей оспы (CPXV) CPXV12, бычьего герпесвируса (BHV) UL49.5, вируса Эпштейна-Барр. вирус (EBV) BNFL2a и т.п. Вышеупомянутый вирусный белок эндоплазматического ретикулула, связывается с транспортером, связанным с процессингом антигена (TAP), тем самым предотвращая TAP-опосредованную транслокацию полипептида в эндоплазматический ретикулум и ингибируя компонент молекул МНС, тем самым приводя к ингибированию экспрессии МНС I. В некоторых предпочтительных воплощениях домен связывающей белковой молекулы, нацеленный на МНС I и/или МНС II, или его функциональный вариант, включает TAP-связывающий домен. В некоторых предпочтительных воплощениях TAP-связывающий домен содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO. 64-73.

В некоторых воплощениях домен связывающей белковой молекулы, нацеленный на МНС I, может происходить из вирусного гликопротеина, который разрушает молекулы МНС I. В некоторых воплощениях вирусный гликопротеин выбран из гликопротеина US2, US3, US11, US10 из HCMV, E19 аденовируса и т.п. В некоторых предпочтительных воплощениях домен связывающей белковой молекулы, нацеленный на МНС I и/или МНС II или его функциональный вариант, включает связывающий домен МНС. В некоторых предпочтительных воплощениях связывающий домен МНС содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO. 74-82.

В некоторых воплощениях домен связывающей белковой молекулы, нацеленный на МНС I, может быть получен из вирусного белка, который направленно ингибирует или разрушает белки-мишени в НК, такие как MICA, MICB, ULBP1-6 и т.п. В некоторых воплощениях вирусный белок выбран из UL16, UL141, UL142 из HCMV, E3-19K9 аденовируса и т.п. В некоторых предпочтительных воплощениях аминокислотная последовательность вирусного белка представляет собой аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO. 83-91.

В некоторых воплощениях домен связывающей белковой молекулы, нацеленный на МНС I, может быть получен из вирусного белка, который транслоцирует молекулу МНС I из аппарата Гольджи в лизосому для деградации. В некоторых воплощениях вирусный белок выбран из Nef HIV, Vpr HIV, U21 HHV-7, KK3 HHV-8, KK5 HHV-8, MK3 MHV-68, p12 HTLV-1 и т.п. В некоторых предпочтительных воплощениях вирусный белок содержит

аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO. 92-97.

В некоторых воплощениях домен связывающей белковой молекулы, нацеленный на МНС I и/или МНС II, или его функциональный вариант, может содержать вирусный белок, который опосредует возврат молекулы МНС-полипептида из аппарата Гольджи в эндоплазматический ретикулум и способствует деградации молекулы. Предпочтительно вирусный белок содержит связывающий домен МНС и домен, связывающий рецептор KDEL. В некоторых воплощениях вирусный белок представляет собой белок CPXV203 вируса коровьей оспы. В некоторых предпочтительных воплощениях вирусный белок содержит аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO. 98-103.

Многофункциональный комплекс CNK-UT, дополнительно включающий домен связывающей белковой молекулы для нацеливания на МНС I, был получен таким же образом, как и базовый многофункциональный комплекс CNK-UT. Синтезированный фрагмент гена многофункционального комплекса CNK-UT был клонирован в лентивирусный вектор путем молекулярного клонирования и использован для трансфекции Т-клеток, чтобы одновременно экспрессировать множество различных элементов, тем самым позволяя Т-клеткам не только специфически распознавать и уничтожать НК-мишени, но также эффективно ингибируют и разрушают TCR и МНС I с помощью элементов UT.

3.3 Многофункциональный комплекс CNK-UT, дополнительно содержащий как домен связывающей белковой молекулы, нацеленный на МНС I, так и химерный адаптер

В некоторых воплощениях используется многофункциональный комплекс, который способен обеспечить одновременную деградацию TCR и МНС I, а также специфическое распознавание и активацию опухолевого антигена CNK-Т-клеток, его схематическая диаграмма показана на Фиг. 19С, которая содержит четыре модуля: (1) модуль рецептора, активирующего НК, (2) модуль передачи сигнала CNK, (3) модуль UT и (4) модуль химерного адаптера. Этот многофункциональный комплекс отличается от многофункционального комплекса CNK-UT, содержащего домен связывающей белковой молекулы, нацеленного на МНС I, тем, что он дополнительно содержит (4) химерный адаптерный модуль. Необязательно, модуль рецептора, активирующего НК, модуль передачи сигнала CNK, модуль UT и/или модуль химерного адаптера связаны шарниром или линкером.

(4) Химерный адаптерный модуль содержит: (i) внеклеточный домен узнавания, нацеленный на опухоль, (ii) трансмембранный домен и (iii) домен внутриклеточной передачи сигнала. Необязательно, шарниры или линкеры включаются между внеклеточным доменом распознавания, нацеленным на опухоль, трансмембранным

доменом и/или доменом внутриклеточной передачи сигнала.

В некоторых воплощениях внеклеточный домен узнавания, нацеленный на опухоль, химерного адаптерного модуля, выбран из домена специфического связывания опухолевого антигена, антигенсвязывающего домена, нацеленного на микроокружение опухоли, и/или хемотаксического рецептора, нацеленного на микроокружение опухоли.

В некоторых воплощениях домен внеклеточного узнавания, нацеленный на опухоль, выбран из антител, которые могут нацеливать и распознавать ассоциированный с опухолью антиген или его функциональные фрагменты, TCR или их комбинацию. Функциональный фрагмент антитела выбран из Fd, Fv, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv(scFv), одноцепочечного антитела (scFv) или нанотела, диатела, тритела и тетратела.

В некоторых воплощениях трансмембранный домен химерного адаптерного модуля выбран из трансмембранного домена рецептора, активирующего NK-клетки, трансмембранного домена DAP10, трансмембранного домена DAP12, трансмембранного домена CD8, трансмембранного домена CD28, трансмембранного домена CD4, трансмембранного домена 4-1BB, трансмембранного домена OX40, трансмембранного домена ICOS, трансмембранного домена CTLA-4, трансмембранного домена PD-1, трансмембранного домена LAG-3, трансмембранного домена 2B4 и трансмембранного домена BTLA и их комбинацию.

В некоторых воплощениях домен внутриклеточной передачи сигнала химерного адаптерного модуля содержит домен внутриклеточной передачи сигнала и/или костимулирующий домен передачи сигнала рецептора, активирующего NK-клетки.

В некоторых воплощениях домен внутриклеточной передачи сигнала дополнительно содержит костимулирующий домен передачи сигнала. Предпочтительно костимулирующий домен передачи сигнала выбран из T-клеточного костимулирующего домена передачи сигнала, включая, без ограничения указанным, домен внутриклеточной передачи сигнала, полученный из молекулы MHC класса I, белка рецептора TNF, иммуноглобулиноподобного белка, цитокинового рецептора, интегрина, сигнальной молекулы активации лимфоцитов (белок SLAM), активированного рецептора NK-клеток, BTLA, рецептора Toll-лиганда, OX40, CD2, CD7, CD16, CD27, CD28, CD30, CD40, CD38, CD35, CD79A, CD79B, CDS, ICAM -1, LFA-1 (CD11a/CD18), 4-1BB (CD137), B7-H3, CDS, ICAM-1, ICOS (CD278), GITR, BAFFR, LIGHT, HVEM (LIGHTR), KIRDS2, SLAMF7, NKp80 (KLRF1), NKp44, NKp30, NKp46, CD19, CD4, CD8 α , CD8 β , IL2R β , IL2R γ , IL7R α , ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, LFA-1, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, NKG2D, NKG2C, NCR, DAP10, DAP12, TNFR2,

TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (тактильный), CEACAM1, CRTAM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1), CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, CD19a и рецептора, специфически связывающегося с CD83, CARD11, FcRa, FcRp, FcRy, Fyn, HVEM, ICOS, Lck, LAG3, LAT, LRP, NOTCH1, Wnt, OX40, ROR2, Ryk, SLAMF1, Slp76, pTa, TCRa, TCRp, TRIM, ZAP70, PTCH2 и т.п. Более предпочтительно костимулирующий домен передачи сигнала выбран из домена внутриклеточной передачи сигнала NKG2D, домена внутриклеточной передачи сигнала DAP10, домена внутриклеточной передачи сигнала DAP12, домена внутриклеточной передачи сигнала NCR, домена внутриклеточной передачи сигнала CD28, домена внутриклеточной передачи сигнала 4-1BB, домена внутриклеточной передачи сигнала OX40, домена внутриклеточной передачи сигнала ICOS.

Многофункциональный комплекс CNK-UT, дополнительно включающий домен связывающей белковой молекулы, нацеленный на МНС I, и химерный адаптер, был получен также как и базовый многофункциональный комплекс CNK-UT. Синтезированный фрагмент гена многофункционального комплекса CNK-UT был клонирован в лентивирусный вектор путем молекулярного клонирования и использован для трансфекции Т-клеток, чтобы одновременно экспрессировать четыре различных элемента, тем самым позволяя Т-клеткам не только специфически распознавать и уничтожать НК-мишень, а также эффективно ингибировать и разрушать TCR и МНС I с помощью элементов UT, а также специфически распознавать опухолевые антигены и активировать их посредством химерного адаптера.

3.4 Многофункциональный комплекс CNK-UT, дополнительно содержащий как домен связывающей белковой молекулы, нацеленный на МНС I, так и рецепторы с направленной цитолитической активностью в отношении опухолевых клеток (такие как CAR или TCR)

В некоторых воплощениях используется многофункциональный комплекс, способный обеспечить одновременную деградацию TCR и МНС I, а также специфическое распознавание и активацию опухолевого антигена, его схематическая диаграмма показана на Фиг. 19D, которая содержит четыре модуля: (1). Модуль рецептора, активирующего НК, (2) модуль передачи сигнала CNK, (3) модуль UT и (4) модуль рецептора с направленной цитолитической активностью в отношении опухолевых клеток. Этот комплекс отличается от многофункционального комплекса CNK-UT, содержащего домен связывающей белковой молекулы, нацеленного на МНС I, тем, что дополнительно содержит (4) рецепторный модуль с направленной цитолитической активностью в отношении

опухолевых клеток. Необязательно, модуль рецептора, активирующего NK, модуль передачи сигнала CNK, модуль UT и/или рецепторный модуль с направленной цитолитической активностью в отношении опухолевых клеток связаны шарниром или линкером.

(4) Рецепторный модуль с направленной цитолитической активностью в отношении опухолевых клеток содержит (i) домен внеклеточного узнавания, нацеленный на опухолевый антиген, (ii) трансмембранный домен и (iii) внутриклеточный костимулирующий домен передачи сигнала, (iv) домен передачи сигнала активации Т-клеток (ITAM). Необязательно, шарниры или линкеры включены между доменом внеклеточного узнавания, нацеленным на опухолевый антиген, трансмембранным доменом, внутриклеточным костимулирующим доменом передачи сигнала и/или доменом передачи сигнала активации Т-клеток (ITAM).

Трансмембранный домен рецепторного модуля с направленной цитолитической активностью в отношении опухолевых клеток выбран из трансмембранного домена CD8, трансмембранного домена α -цепи и/или β -цепи Т-клеточного рецептора, трансмембранного домена CD28, трансмембранного домена CD3 ϵ , трансмембранного домена CD45, трансмембранного домена CD4, трансмембранного домена CD5, трансмембранного домена CD8, трансмембранного домена CD9, трансмембранного домена CD16, трансмембранного домена CD22, трансмембранного домена CD33, трансмембранного домена CD37, трансмембранного домена CD64, трансмембранного домена CD80, трансмембранного домена CD86, трансмембранного домена CD134, трансмембранного домена CD137, трансмембранного домена CD154, трансмембранного домена GITR и их комбинации.

Домен передачи сигнала активации Т-клеток происходит из внутриклеточного домена передачи сигнала CD3 ζ , общего FcR γ (FCER1G), Fc γ RIIa, FcR β , CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ , CD5, CD22, CD79a, CD79b, CD278 («ICOS»), Fc ϵ RI, CD66d, DAP10 и DAP12 и т.п.

В некоторых предпочтительных воплощениях (4) рецепторный модуль с направленной уничтожающей активностью в отношении опухолевых клеток представляет собой рецептор CAR или TCR с направленной уничтожающей активностью в отношении опухолевых клеток.

Фрагмент гена многофункционального комплекса CNK-UT, дополнительно включающий домен связывающей белковой молекулы для нацеливания на рецептор MHC I и CAR или TCR с направленной цитолитической активностью в отношении опухолевых клеток, был получен таким же образом, как и базовый многофункциональный комплекс CNK-UT. Синтезированный фрагмент гена многофункционального комплекса CNK-UT

был клонирован в лентивирусный вектор путем молекулярного клонирования и использован для трансфекции Т-клеток, чтобы одновременно экспрессировать четыре различных элемента, тем самым не только позволяя Т-клеткам специфически распознавать и уничтожать НК-мишень, но и позволяя эффективно ингибировать и разрушать TCR и MHC I с помощью элементов UT, а также получить специфический эффект распознавания и уничтожения опухолевых клеток посредством структуры CAR или TCR, а также повысить эффективность очистки опухолевых клеток в кооперации с элементом CNK.

Пример 28: Проектирование элемента CNK-UT для экспрессии многофункционального комплекса CNK-UT

В данном примере были спроектированы четыре элемента CNK-UT для экспрессии многофункционального комплекса CNK-UT.

4.1 Проект структуры элемента CNK-UT - 1

В некоторых воплощениях, как показано на Фиг. 20А, экспрессия множества функциональных элементов с помощью одного вектора достигается за счет комбинации элементов CNK-UT: DAP10-DAP12 ICD-T2A-NKG2D-p2A-анти-TCR-AdE3 ERAD, комбинации получают с использованием одного лентивирусного экспрессирующего вектора с промотором EF1 α и такими элементами, как саморасщепляющийся пептид 2А.

4.2 Проект структуры элемента CNK-UT - 2

В некоторых воплощениях, как показано на Фиг. 20В, экспрессия множества функциональных элементов с помощью одного вектора достигается за счет комбинации элементов CNK-UT: DAP10-DAP12 ICD-T2A-NKG2D-p2A-анти-TCR-US2 ERAD, комбинации получают с использованием одного лентивирусного экспрессирующего вектора с промотором EF1 α и такими элементами, как саморасщепляющийся пептид 2А.

4.3 Проект структуры элемента CNK-UT - 3

В некоторых воплощениях, как показано на Фиг. 20С, экспрессия множества функциональных элементов с помощью одного вектора достигается с помощью полицистронной системы экспрессии с двойными промоторами, которая содержит как промотор EF1 α , так и промотор CMV в одном лентивирусном экспрессирующем векторе, при этом промоторами регулируется экспрессия мультигенов DAP10-CD3 ζ -T2A-NKG2D-p2A-анти-TAA scFv-DAP10 и анти-TCR-AdE3 ERAD-E2A-AdE3, соответственно.

4.4 Проект структуры элемента CNK-UT - 4

В некоторых воплощениях, как показано на Фиг. 20D, экспрессия нескольких функциональных элементов в одной и той же Т-клетке достигается путем совместной трансфекции Т-клетки разными лентивирусами, которые получены из двух разных лентивирусных экспрессирующих векторов, которые, соответственно регулируют

экспрессию анти- TAA scFv-CD28/4-1BB-CD3 ζ -T2A-DAP10-CD3 ζ -T2A-NKG2D и анти-TCR-AdE3 ERAD-T2A-AdE3.

Пример 29: Получение экспрессирующей плазмиды специфического химерного антигенного рецептора, нацеленного на NKG2DL

Синтез полного гена осуществляли для кодирующих нуклеотидных последовательностей CNK-UT (нуклеотидная последовательность показана в SEQ ID NO.118; кодируемый ею белок показан в SEQ ID NO.117). Нуклеотидную последовательность встраивали в лентивирусный вектор pCDH-CMV-MCS-EF1 α -Pu ρ (приобретенный у Youbao Biotech) или pLVX-EF1 α -AcGFP1-C1Vector (Takara) путем молекулярного клонирования для конструирования лентивирусного целевого вектора CNK-UT. Полученные плазмиды (подтвержденные секвенированием) использовали для трансформации компетентных клеток DH5 α (Thermo Fisher). Отдельные колонии собирали и культивировали в крупном масштабе. Затем плазмиды очищали и получали с использованием набора PureLinkTM HiPure Plasmid Maxiprep Kit (Thermo Fisher) для получения лентивирусной плазмиды CNK-UT.

Пример 30: Получение вируса CNK-UT

Клетки 293T (предоставленные ATCC, Кат. № CRL3216TM) котрансфицировали лентивирусной плазмидой CNK-UT, полученной в Примере 29, а также упаковывающими плазмидами psPAX2 и pMD2.G (приобретенными у Addgene, Кат. № 12259&12260) в соотношении 1,64 пмоль: 1,3 пмоль: 0,72 пмоль. В качестве реагента для трансфекции использовали полиэтиленимин (408727, Sigma) в соотношении ДНК:мкг PEI=1:3. Подробности приготовления упаковочных плазмид можно найти в инструкции к набору PureLinkTM HiPure Plasmid Maxiprep Kit (K210006, Thermo), остальные подробности процесса трансфекции можно найти в инструкции Sigma Transfections. Через 16 часов после трансфекции культуральную среду заменяли на полную среду (приобретенную у Life Technologies, кат. № 11995-065). После культивирования в течение 24 часов, 48 часов и 72 часов надосадочные жидкости с лентивирусом собирали, объединяли и центрифугировали при -80°C, 3000 об/мин в течение 10-15 минут, затем фильтровали через мембранный фильтр 0,45 мкм и, наконец, ультрацентрифугировали при 25000 об/мин, 4°C в течение 2-3 часов с получением концентрата лентивируса. Концентрат лентивируса собирали и хранили при -80°C.

Пример 31: Получение клеток CNK-UT

Собирали свежую периферическую кровь от здоровых доноров, добавляли PBS+EDTA 1:1 и отделяли свежие мононуклеарные клетки периферической крови центрифугированием в градиенте плотности фиколла. Затем CD3⁺ Т-клетки подвергали

положительной сортировке и элюированию с использованием сортирующих CD3 магнитных шариков, разделительной колонки MS и разделительного устройства MiniMACS™ (MilteNY Biotec). Выделенные CD3+ Т-клетки стимулировали путем культивирования с помощью магнитных шариков, конъюгированных с анти-CD3/анти-CD28-антителами (Т-активатор CD3/CD28 человека, Invitrogen, Кат. № 11161D), в соответствии со следующими стадиями: Разбавить мононуклеарную жидкость периферической крови. клеток до концентрации 1×10^6 отдельных клеток/мл, распределить их в 24-луночной планшете, добавить к клеткам магнитные шарики в соотношении 1:1 и хорошо перемешать. Смесь ресуспендировали в культуральной среде (OpTmizer™ T-Cell Expansion SFM, A1048503, Life Technologies), содержащей IL2 50 ед./мл и IL15 5 нг/мл, и культивировали в инкубаторе с температурой 37°C и 5% CO₂ в течение 1 дня. Затем клетки трансфицировали лентивирусом, полученным в примере 4, который нес элементы CNK-UT, в соответствии со следующими стадиями: добавить к клеткам концентрат лентивируса, приготовленный в примере 4 (MOI=3-5), добавить 10 мкг/мл полибрена, центрифугировать на низкой скорости (500–1000 г/мин) в течение 30–60 минут в плоскоугольной центрифуге, затем культивировать клетки в инкубаторе при 37°C. Клетки, экспрессирующие CNK-UT, получали через 48 часов после заражения, и их можно было использовать для фенотипирования клеток проточной цитометрией. Клетки, культивированные еще 8 дней, можно использовать для определения фенотипа и экспериментов по клеточным функциям.

Пример 32: Детектирование фенотипа клеток CNK-UT

На Фиг. 21 показаны результаты проточной цитометрии для фенотипирования клеток CNK-UT (DAP10-CD3ζ-T2A-NKG2D-p2A-анти-TCR scFv-AdE3) (нуклеотидная последовательность показана в SEQ ID NO.118; кодируемый белок показан в SEQ ID NO.117). Клетки, полученные в примере 2, культивировали в течение 10 дней и собирали для получения 5×10^5 нетрансфицированных Т-клеток и клеток, трансфицированных вирусным вектором CNK-UT. Клетки обрабатывали антителами CD8-Pacific Blue, CD4-APC, NKG2D-PE-Cy7, TCR-αβ-APC-Cy7 (все антитела были приобретены у Biolegend) для окрашивания с последующим фенотипированием клеток с помощью проточного цитометра (BD FACSCanto II). Результаты показали, что нетрансфицированные Т-клетки CD8 Т-клетки экспрессируют NKG2D и TCR-αβ, CD4 Т-клетки не экспрессируют NKG2D, но в высокой степени экспрессируют TCR-αβ; в то время как в клетках, трансфицированных модифицированной CNK-UT, как CD8, так и CD4 Т-клетки в высокой степени экспрессируют NKG2D, но не экспрессируют TCR-αβ.

Пример 33: Обнаружение функции уничтожения широкого спектра опухолей у

клеток CNK-UT

В этом примере изучали функцию уничтожения широкого спектра опухолей клетками CNK-UT, полученными в примере 5. Линия клеток аденомы толстой кишки человека HT29 была приобретена у Procell (CL-0118), клетки трижды негативного рака молочной железы MDA-MB453 были приобретены у Procell (CL-0152), клеточная линия острого миелолейкоза THP1 была приобретена у Procell (CL-0233), гепатоцеллюлярная карцинома (ГЦК) HepG2 была приобретена у Procell (CL-0103), гепатоцеллюлярная карцинома (ГЦК) PLC была приобретена у Procell (CL-0415).

33.1 CNK-UT-клетки распознают и специфически убивают линию клеток аденомы толстой кишки человека HT29.

CNK-UT-клетки, используемые в этом примере, представляют собой клетки, полученные в Примере 5.

На Фиг. 22 показано, что CNK-UT-клетки распознают и специфически уничтожают линию клеток аденомы ободочной кишки человека HT29.

А: Экспрессия различных белков-мишеней НК в клеточной линии аденомы ободочной кишки человека HT29.

Для линии клеток аденомы толстой кишки человека HT29 $0,5 \times 10^6$ клеток расщепляли трипсином и, соответственно обрабатывали антителами MICA-APC, MICB-APC, ULBP1-APC, ULBP2-APC, ULBP3-APC для окрашивания, в то время как изотип IgG (купленный от R&D Systems) использовали в качестве контроля. Затем фенотипы клеток определяли с помощью проточного цитометра (BD FACSCanto II). Результаты показали, что клетки HT29 высоко экспрессируют ULBP2, но слабо экспрессируют MICA, MICB, ULBP1 и ULBP3.

В: CNK-UT-клетки активируются HT29 и оказывают эффективное цитолитическое действие на HT29.

В эксперименте по совместному культивированию Т-клеток и опухолевых клеток, отсчитывали $0,5 \times 10^6$ клеток/лунку клеточной линии аденомы толстой кишки человека HT29 и распределяли их в 24-луночном планшете, культивировали клетки до тех пор, пока плотность клеток не достигнет 80% конфлюэнтности. Добавляли, соответственно нетрансфицированные Т-клетки и CNK-UT-клетки (DAP10-CD3 ζ -T2A-NKG2D-p2A-ant-TCR scFv-AdE3) при соотношении эффектора к мишени 1:5 к опухолевым клеткам. Через 24 часа все клетки обрабатывали расщепляющими ферментами, собирали и обрабатывали антителами CD45-PerCP-Cy5.5, CD8-Pacific Blue, CD4-APC, NKG2D-PE-Cy7, CD25-APC-Cy7 (приобретенными у Biolegend) для окрашивания с последующей детекцией с помощью проточного цитометра (BD FACSCanto II). Для анализа результатов CD45(-)

опухолевые клетки и CD45(+) Т-клетки различали по CD45, а также по поверхностной экспрессии NKG2D и маркеру активации CD25 на CD8, CD4 Т-клетках. Экспериментальные данные показали, что 59,0% клеток HT29 имеют положительную регуляцию экспрессии MICA, 40,1% имеют повышенную экспрессию MICB, 56,1% имеют повышенную экспрессию ULBP1, 84,4% имеют положительную регуляцию экспрессии ULBP2, 23,7% имеют положительную регуляцию экспрессии ULBP3 (Фиг. 22А), CNK-UT-клетки оказывают хорошее цитолитическое действие на клетки HT29. В контрольной группе системы совместного культивирования 69,5% клеток представляли собой опухолевые клетки, Т-клетки не экспрессировали CD25. Однако в системе совместного культивирования клеток CNK-UT по результатам FSC/SSC большинство опухолевых клеток элиминировали, доля Т-клеток значительно увеличилась до 84,1%, 36,345% CD8+Т-клеток имеют положительную регуляцию экспрессии CD25, и 19,08% CD4+ Т-клеток имеют положительную регуляцию экспрессии CD25 (Фиг. 22В).

33.2 CNK-UT-клетки распознают и специфически убивают MDA-MB453.

CNK-UT-клетки, используемые в этом примере, представляют собой клетки, полученные в Примере 5.

На Фиг. 23 показано, что CNK-UT-клетки распознают и специфически уничтожают MDA-MB453.

А: Экспрессия различных белков-мишеней НК в клеточной линии трижды негативного рака молочной железы MDA-MB453.

Для MDA-MB453 $0,5 \times 10^6$ клеток расщепляли трипсином и, соответственно, обрабатывали антителами MICA-APC, MICB-APC, ULBP1-APC, ULBP2-APC, ULBP3-APC для окрашивания, при этом изотип IgG (приобретенный у R&D Systems) использовали в качестве контроля. Затем фенотипы клеток определяли с помощью проточного цитометра (BD FACSCanto II). Результаты показали, что клетки MDA-MB453 высоко экспрессируют MICA, ULBP2, но слабо экспрессируют MICB, ULBP1 и ULBP3.

В: CNK-UT-клетки активируются MDA-MB453 и оказывают эффективное цитолитическое действие на MDA-MB453.

В эксперименте по совместному культивированию Т-клеток и опухолевых клеток отсчитывали $0,5 \times 10^6$ клеток/лунку линии клеток рака молочной железы MDA-MB453 и распределяли их в 24-луночной планшете, культивировали клетки до тех пор, пока плотность клеток не достигнет 80% конфлюэнтности. Добавили, соответственно, нетрансфицированные Т-клетки и CNK-UT-клетки (DAP10-CD3 ζ -T2A-NKG2D-p2A-анти-TCR scFv-AdE3) в соотношении эффектор-мишень 1:5. Через 24 часа все клетки обрабатывали расщепляющими ферментами, собирали и обрабатывали антителами CD45-

PerCP-Cy5.5, CD8-Pacific Blue, CD4-APC, NKG2D-PE-Cy7, CD25-APC-Cy7 (приобретенными у Biolegend) для окрашивания с последующей детекцией с помощью проточного цитометра (BD FACSCanto II). Экспериментальные данные показали, что 83,7% клеток MDA-MB453 имеют положительную регуляцию экспрессии MICA, 33,6% имеют положительную регуляцию экспрессии MICB, 31,2% имеют положительную регуляцию экспрессии ULBP1, 95,0% имеют положительную регуляцию экспрессии ULBP2, 6,23% имеют положительную регуляцию экспрессии ULBP3 (Фиг.23А), CNK-UT-клетки оказывают хорошее цитолитическое действие на клетки MDA-MB453. В контрольной группе системы совместного культивирования 48,9% клеток представляют собой опухолевые клетки, Т-клетки не экспрессируют CD25. Однако в системе совместного культивирования с клетками CNK-UT опухолевые клетки составляют только 6,74%, 14,8% CD8+Т-клеток имеют положительную регуляцию экспрессии CD25, а 28,1% CD4+Т-клеток имеют положительную регуляцию экспрессии CD25 (Фиг. 23В). Экспериментальные данные показали, что CNK-UT-клетки оказывают хорошее цитолитическое действие на клетки MDA-MB453 и могут привести к специфической активации.

Пример 34: Функциональное детектирование клеток CNK-UT в моделях опухолей

В этом примере мышей с иммунодефицитом (мыши NSG, приобретенных у Jiangsu Jicui Yaokang Biotechnology Co., Ltd., Кат. № T001475) использовали в качестве модели с опухолью для проведения фармакодинамических исследований *in vivo*.

8.1 Терапевтический эффект клеток CNK-UT на животной модели линии клеток рака печени HepG2

Экспериментальные животные были разделены на три группы следующим образом:

Группе отрицательного контроля: вводили контрольные Т-клетки, Т-клетки, полученные от того же донора, нетрансфицированные Т-клетки, пролиферирующие после стимуляции магнитными шариками;

Изотипической контрольной группе: Вводили обычные клетки GPC3 CAR-T; GPC3 CAR-T-клетки получали следующим образом: плазмиду и лентивирус получали путем клонирования синтезированного гена анти-GPC3 41BB-CD3 ζ в лентивирусный вектор CDH-CMV-MCS-EF1 α -Puго и использовали для трансфекции Т-клеток для получения обычных GPC3 CAR-T клеток. Конкретный способ приготовления был таким же, как и для клеток CNK-UT.

Группе CNK-UT: Вводили клетки GPC3 CAR/CNK-UT.

Клетки GPC3 CAR/CNK-UT получали следующим образом: плазмиду и лентивирус получали путем клонирования синтезированного гена анти-anti-GPC3 41BB-Z-T2A-

DAP10-CD3 ζ -T2A-NKG2D-p2A-анти-TCR scFv-AdE3 в лентивирусный вектор CDH-CMV-MCS-EF1 α -Puго и использовали для трансфекции Т-клеток. После пролиферации и культивирования получали клетки GPC3 CAR/CNK-UT. Конкретный способ приготовления был таким же, как и для клеток CNK-UT.

Экспериментальных животных разделили на группы и, соответственно вводили контрольные Т-клетки, обычные клетки GPC3 CAR-T и клетки GPC3 CAR/CNK-UT. Животных взвешивали. 3×10^6 клеток HepG2 инокулировали 15 мышам NSG в правую подмышку, день инокуляции записывали как день 0. Через 7 дней было отмечено, что все мыши соответствуют критериям модели. Мышей разделили на 3 группы и получили первичные Т-клетки от нормального донора (контрольные Т-клетки), обычные GPC3-CAR-T-клетки и GPC3 CAR/CNK-UT клетки, соответственно. Наблюдали исчезновение флуоресценции опухоли *in vivo* клетками. Клетки вводили путем инъекции в хвостовую вену в дозе 2×10^6 на мышь три раза (т.е. на 7, 9 и 11 день, соответственно). Дату первого введения записывали как день 7, а флуоресценцию наблюдали каждые 7 дней после дня 7.

На Фиг. 24 показано, что клетки GPC3 CAR/CNK-UT обладают более высокой способностью к удалению опухоли у мышей, чем клетки GPC3 CAR-T.

Создали модель на основе клеточной линии гепатокарциномы HepG2-Ffluc. Затем вводили 2×10^6 нетрансфицированных Т-клеток (слева), GPC3 CAR-T (в центре) и GPC3 CAR/CNK-UT (справа), а рост опухоли еженедельно контролировали с помощью системы флуоресцентной визуализации животных IVIS. Результаты эксперимента показали, что флуоресценция в контрольной группе Т-клеток продолжала увеличиваться, флуоресценция в группе GPC3 CAR-T-клеток увеличивалась медленно, в то время как флуоресценция опухоли в группе CNK-T001 продолжала уменьшаться, пока не исчезла. Результаты подтвердили, что клетки GPC3 CAR/CNK-UT обладают более значимым противоопухолевым эффектом, чем обычные клетки CART в мышинной модели.

На Фиг. 25 показано, что клетки GPC3 CAR/CNK-UT обладают более высокой способностью к удалению опухоли, чем клетки GPC3 CAR-T.

С учетом кривой флуоресценции опухоли, построенной на основе количественной оценки флуоресцентного изображения Фиг. 25, можно видеть, что контрольные Т-клетки (синие) и GPC3 CAR-T (красные) не способны полностью ингибировать рост опухоли, однако (зеленые) могут значительно ингибировать рост опухоли. Флуоресценция опухоли постепенно уменьшалась, пока не стала невидимой, что подтверждает противоопухолевый эффект клеток GPC3 CAR/CNK-UT на мышинных моделях.

Результаты вышеупомянутых экспериментов были следующими. У мышей отрицательного контроля размер опухоли постепенно увеличивался, первый случай

смерти был между 28 и 42 днями, и ни одна из мышей не пережила 42 день. В контрольной изотипической группе с введением клеток GPC3 CAR/CAR-T на 14-й день наблюдалось ингибирование роста опухоли, но полная элиминация опухоли не наблюдалась; увеличение размера опухоли наблюдалось на 21-й день; и после 28-го дня почти не наблюдалось различий по сравнению с группой отрицательного контроля; все мыши погибли между 42 и 56 днями; что указывает на то, что GPC3 CAR-T против одной мишени может лишь частично ингибировать опухоль, но не может полностью очистить ее, не говоря уже о предотвращении рецидива. В группе CNK-UT с введением клеток GPC3 CAR/CNK-UT флуоресцентный сигнал опухоли *in vivo* значительно уменьшался на 14 день и полностью исчезал на 21 день; все мыши выжили до контрольного дня (56-го дня) без рецидива опухоли. Результаты подтвердили, что клетки GPC3 CAR/CNK-UT обладают хорошей противоопухолевой активностью *in vivo*, которая значительно превосходит активность GPC3 CAR-T, и такой противоопухолевый эффект может сохраняться в течение как минимум 56 дней даже после того, как опухоли были удалены.

Кроме того, изучали изменения массы тела мышей после введения различных клеток. По сравнению с массой тела в день 0, экспериментальные животные в группе CNK-UT показали небольшое увеличение массы тела после инфузии клеток CNK-UT, в то время как животные в группе изотипического контроля (введение GPC3-CAR-T) и группе отрицательного контроля (введение контрольных T-клеток) показали постепенное снижение массы тела по мере прохождения эксперимента.

Вышеупомянутые экспериментальные результаты позволяют предположить, что после различных видов обработки, опухоли у мышей, которым вводили контрольные T-клетки или GPC3 CAR-T-клетки, продолжали расти, в то время как инъекция клеток GPC3 CAR/CNK-UT могла уничтожить опухолевые клетки в течение 21 дня без рецидивов, поскольку клетки GPC3 CAR/CNK-UT обладают более высокой цитолитической активностью по сравнению с клетками GPC3 CAR-T. Кроме того, инфузия GPC3 CAR/CNK-UT не вызывает цитотоксичности, у животных продлевается период выживания, улучшается качество жизни и увеличивается масса тела.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Химерная белковая конструкция, содержащая домен, связывающий белок механизма деградации, ассоциированной с эндоплазматическим ретикуломом (ЭПР-ассоциированной деградации, ERAD), и нацеливающий домен.

2. Химерная белковая конструкция по п. 1, отличающаяся тем, что домен, связывающий белок механизма ERAD, содержит: трансмембранный домен вирусного белка, резидентного в эндоплазматическом ретикулуме, или его функциональный вариант, и,

домен, резидентный в эндоплазматическом ретикулуме, или его функциональный вариант.

3. Химерная белковая конструкция по п. 1 или 2, отличающаяся тем, что вирусный белок, резидентный в эндоплазматическом ретикулуме, является E3-19K аденовируса.

4. Химерная белковая конструкция по п. 1 или 2, отличающаяся тем, что вирусный белок, резидентный в эндоплазматическом ретикулуме, не является E3-19K аденовируса.

5. Химерная белковая конструкция по п. 4, отличающаяся тем, что вирусный белок, резидентный в эндоплазматическом ретикулуме, выбран по меньшей мере из одного из группы, состоящей из: гликопротеинов US2, US11, US3, US10, US6 из HCMV, ICP47 HSV, CPXV12, UL49.5 BHV, BNFL2a EBV, UL16, UL141, UL142 из HCMV, Nef HIV, Vpu HIV, U21 HHV-7, KK3 HHV-8, KK5 HHV-8, MK3 MHV-68, p12 HTLV-1 и белка CPXV203 вируса коровьей оспы.

6. Химерная белковая конструкция по любому из предыдущих пп., дополнительно содержащая домен, связывающий участника пути деградации белков (например, убиквитинлигазы E3, протеасомы, лизосомы), и, необязательно, домен, связывающий участника пути деградации белков, соединенный с доменом, связывающим белок механизма ERAD.

7. Химерная белковая конструкция по любому из предыдущих пп., отличающаяся тем, что нацеливающий домен содержит антитело, специфически нацеленное на белок-мишень, или его функциональный фрагмент (например, Fd, Fv, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv(scFv), одноцепочечные антитела (scFv), нанотела, диатела, триатела или тетратела).

8. Химерная белковая конструкция по п. 7, отличающаяся тем, что белок-мишень представляет собой патогенный белок, необязательно являющийся опухолеассоциированным белком, вирус-ассоциированным белком, белком, связанным с иммунной функцией (включая иммуносупрессивные и иммуностимулирующие белки),

аутоантигенным белком, или белком, ассоциированным с нейродегенеративными заболеваниями.

9. Химерная белковая конструкция по п. 8, отличающаяся тем, что белок аутоантигена выбран из группы, состоящей из:

аутоантигена, ассоциированного с диабетом 1 типа, например, антигена островковых клеток (ICA), инсулина (IAA), декарбоксилазы глутаминовой кислоты 65 (GAD65), антигена-2 инсулиномы (IA-2);

аутоантигена, ассоциированного с ревматоидным артритом (РА), например, цитруллинированного белка/пептидного антитела, гетерорибонуклеопротеина (гетерогенного ядерного рибонуклеопротеина A2/B1), альдолазы, альфа-енолазы, кальретикулина, термоактивируемого белка (HSP60), ViP, PGK1, стресс-индуцированного фосфопротеина 1, FUSE-BP1/2;

аутоантигена, ассоциированного с системной красной волчанкой (SLE), например, дезоксирибонуклеопротеина, SmD1, SmD3, Clq, воспалительного антикоагулянта (LA), кардиолипина (CL), β 2-гликопротеина I (β 2 GPI), протромбина (PT) и фосфатидилсерина (PS);

аутоантигена, связанного с системным склерозом (SSc)/склеродермией (SD), например, Scl-70, SSA, Ro52;

антигена, связанного с аутоиммунными заболеваниями печени, например, митохондриального антигена, Spl00, PML, gp210, p62;

аутоантигена, связанного с тяжелой миастенией, например, рецептора ацетилхолина;

аутоантигена, связанного с аутоиммунным заболеванием центральной нервной системы (лимбического энцефалита, энцефаломиелита, мозжечковой атаксии), например, комплекса потенциалзависимых калиевых каналов (VGKC), рецептора потенциалзависимых кальциевых каналов, рецептора α -амино-3-гидрокси-5-метилизоксазол-4-пропионовой кислоты (AMPA), рецепторов γ -аминомасляной кислоты-B (GABA_B), глициновых рецепторов;

аутоантигена, связанного с рассеянным склерозом, например, основного белка миелина (MBP), гликопротеина миелиновых олигодендроцитов (MOG);

аутоантигена, связанного с полимиозитом (ПМ) и дерматомиозитом (ДМ), например, Jo-1, Mi-2, PM-Scl, Ro-52;

аутоантигена, связанного с глютеночувствительной энтеропатией, например, эндомизиального антитела (EMA), тканевой трансглутаминазы (tTG);

аутоантигена, связанного с энцефалитом с анти-NMDAR антителом, например,

рецептора N-метил-D-аспартата;

аутоантигена, связанного с оптикомиелитом (НМО), например, аквапорина 4 (AQP4); и

аутоантигена, связанного с репродукцией, например, антигена яичников, антигена сперматозоидов.

10. Химерная белковая конструкция по п. 9, отличающаяся тем, что опухолеассоциированный белок кодируется онкогеном, выбранным из группы, состоящей из: BCL-2, c-MYC, Ras, HER2, BCR/ABL, ABL1/BCR, TGFB1, TLX1, P53, WNT1, WNT2, WT1, α v- β 3, PKCa, ABL, BCL1, CD24, CDK4, EGFR/ERBB-1, HSTF1, INT1/WNT1, INT2, MDM2, MET, MYB, MYC, MYCN, MYCL1, RAFI, NRAS, REL, AKT2, APC, BCL2-ALPHA, BCL2-BETA, BCL3, BCR, BRCA1, BRCA2, CBL, CCND1, CDKN1A, CDKN1C, CDKN2A, CDKN2B, CRK, CRK-II, CSF1R/FMS, DBL, DDOST, PMS-2, PRAD-1, RAF, RHOM-1, RHOM-2, SIS, TAL2, TANI, TIAM1, TSC2, TRK, TSC1, STK11, PTCH, MEN1, MEN2, P57/KIP2, PTEN, HPC1, ATM, XPA/XPG, BCL6, DEK, AKAP13, CDH1, BLM, EWSR1/FLI1, FES, FGF3, FER, FGR, FLI1/ERGB2, FOS, FPS/FES, FRA1, FRA2, FYN, HCK, HEK, HER3/ERBB-2, ERBB-3, HER4/ERBB-4, HST2, INK4A, INK4B, JUN, JUNB, JUND, KIP2, KIT, KRAS2A, KRAS2B, LCK, LYN, MAS, MAX, MCC, MLH1, MOS, MSH2, MYBA, MYBB, NF1, NF2, P53, PDGFB, PIM1, PTC, RBI, RET, ROS1, SKI, SRC1, TALI, TGFB2, THRA1, THRB, TIAM1, TRK, VAV, VHL, WAF1, WNT2, WT1, YES1, ALK/NPM1, AMI1, AXL, FMS, GIP, GLI, GSP, HOX11, HST, IL3, INT2, KS3, K-SAM, LBC, DCC, DPC4/SMAD4, E-CAD, E2F1/RBAP, ELK1, ELK3, EPH, EPHA1, E2F1, EPHA3, ERG, ETS1, ETS2, LMO-1, LMO-2, L-MYC, LYL1, LYT-10, MDM-2, MLH1, MLL, MLM, N-MYC, OST, PAX-5, PMS-1, FGF4, FGF6, FANCA, FLI1/ERGB2, FOSL1, FOSL2, GLI, HRAS1, HRX/MLLT1, HRX/MLLT2, KRAS2, MADH4, MASI, MCF2, MLLT1/MLL, MLLT2/HRX, MTG8/RUNX1, MYCLK1, MYH11/CBFB, NFKB2, NOTCH1, NPM1/ALK, NRG/REL, NTRK1, PBX1/TCF3, PML/RARA, PRCA1, RUNX1, RUNX1/CBFA2T1, SET, SHP2, TCF3/PBX1, TNFa, кластерина, сурвивина, TOE β , c-fos, c-SRC, гена рецептора эстрогена (рецептор эстрогена ER- α), гена рецептора андрогена (рецептора андрогена, AR) и INT-1, необязательно, опухолеассоциированного белка выбранного из группы, состоящей из: представителей семейства Bcl-2 (таких как: Bcl-2, Bcl-xL и Bcl-w), VEGF/VEGFR, PDGFR β , EGFR, мутантов EGFR, IGF-1R, HDAC, HER2, MYC, KRAS, AFP, CEA, CA199, рецептора эстрогена (рецептора эстрогена ER- α), рецептора андрогена (рецептора андрогена, AR), тирозинкиназы (c-ABL, BCR-ABL, BTK, FAK, PTK6, Wee1, трансмембранных рецепторов TRK), серин/треониновых киназных рецепторов (IRAK4, LRRK2, B-Raf, RIPK2, CDK4/6, CDK7, CDK8, CDK8/19, CDK9, TBK1), протеинкиназы II

(СК2), эпигенетически родственных белков (BRD2, BRD3, BRD4, BRDT, TRIM24, BRD9, PBRM1, SMARCA2, SMARCA4, EP300, EZH2, WDR5), адреномедуллина (ADM), DPP3.

11. Химерная белковая конструкция по п. 8, отличающаяся тем, что патогенный белок представляет собой вирус-ассоциированный белок, выбранный из группы, состоящей из: поверхностного антигена HBV, капсидного гликопротеина HBV, HBeAg, ДНК-полимеразы HBV, белка X, кодируемого HBV (HBx), белка Gag HIV, белка Env HIV, gp120 HIV, обратной транскриптазы HIV-1, gp120 HIV, протеазы NS3-4A HCV, РНК-полимеразы HCV, белка оболочки HCV, ДНК-полимеразы EBV, EBNA1 EBV, РНК-синтетазы коронавируса, шиповидного белка коронавируса, белка оболочки коронавируса, мембранного белка коронавируса, нуклеокапсидного белка коронавируса, РНК-зависимой РНК-полимеразы (RdRp), такой как новая РНК-зависимая РНК-полимераза коронавируса, ДНК и РНК-полимераз герпесвирусов, капсидного гликопротеина герпесвируса, ДНК-полимеразы CMV, капсидного гликопротеина CMV, белка оболочки RSV, белка капсида RSV, РНК-полимеразы RSV, РНК-полимеразы вируса гриппа, белка оболочки вируса гриппа, ДНК-полимеразы HPV и белка капсида HPV.

12. Химерная белковая конструкция по п. 7, отличающаяся тем, что белок-мишень представляет собой белок, связанный с иммунной функцией, выбранный из группы, состоящей из: антигенпрезентирующей молекулы (например, молекулы МНС класса I, молекулы МНС класса II, молекулы MICA/B и т.п.), молекулы распознавания антигена (например, TCR, CD123, NKG2D и т.п.), молекулы иммунной контрольной точки (например, PD-1, PD-L1, CTLA4, TIM3, TIGIT, LAG3, A2AR, VTLA, IDO1, IDO2, TDO, KIR, NOX2, VISTA, SIGLEC7, PVR и т.п.), иммуностимулирующей/костимулирующей молекулы (например, CD3, CD80/86, CD28 и т.п.).

13. Химерная белковая конструкция по п. 7, отличающаяся тем, что белок-мишень представляет собой белок-мишень, связанный с заболеванием нервной системы, и выбран из группы, состоящей из: Тау, β -амилоидного белка (β -амилоида (A β)), α -синуклеина, мутантного хантингина (mHTT), α -синуклеина, РНК-связывающего белка TAR (TARDBP) и РНК-связывающего белка FUS (FUS).

14. Химерная белковая конструкция по п. 2, 4 или 5, отличающаяся тем, что нацеливающий домен специфически не связывает TCR.

15. Химерная белковая конструкция по п. 14, отличающаяся тем, что нацеливающий домен специфически связывает МНС I, МНС II, MICA, MICB, ULBP1, ULBP2, ULBP3, ULBP4, ULBP5 и/или ULBP6; и где МНС I предпочтительно представляет собой HLA I; и где МНС II предпочтительно представляет собой HLA II.

16. Химерная белковая конструкция по п. 4, отличающаяся тем, что нацеливающий

домен специфически связывает TCR.

17. Химерная белковая конструкция по п. 16, отличающаяся тем, что вирусный белок, резидентный в эндоплазматическом ретикулуме, выбран по меньшей мере из одного из группы, состоящей из: гликопротеинов US2, US11, US3, US10, US6 из HCMV, ICP47 HSV, CPXV12, UL49.5 BHV, BNFL2a EBV, UL16, UL141, UL142 из HCMV, Nef HIV, V_{pu} HIV, U21 HHV-7, KK3 HHV-8, KK5 HHV-8, MK3 MHV-68, p12 HTLV-1 и белка CPXV203 вируса коровьей оспы.

18. Химерная белковая конструкция по любому из предыдущих пп., которая связана по меньшей мере с одним фрагментом коэкспрессии.

19. Химерная белковая конструкция по п. 18, отличающаяся тем, что по меньшей мере один фрагмент коэкспрессии независимо выбран из группы, состоящей из: интактного вирусного гликопротеина, резидентного в ЭПР (например, US2, US3, US11, US10 из HCMV, E3-K19 аденовируса, US6 HCMV, ICP47 HSV), химерного антигенного рецептора (CAR), функционального Т-клеточного рецептора (TCR), хемокинового рецептора или рецептора, активирующего NK-клетки.

20. Химерная белковая конструкция по п. 19, отличающаяся тем, что хемокиновый рецептор выбран из группы, состоящей из: CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR9, CCR2b, CXCR1, CXCR2 или CXCR4.

21. Химерная белковая конструкция по п. 20, отличающаяся тем, что рецептор, активирующий NK-клетки, содержит: (а) внеклеточный домен (ED) рецептора, активирующего NK-клетки, или его функциональный вариант, (b) трансмембранный домен (TMD) рецептора, активирующего NK-клетки, или его функциональный вариант, и (c) внутриклеточный домен (ICD) рецептора, активирующего NK-клетки, или его функциональный вариант; и где, необязательно, шарнир или линкер включен между внеклеточным доменом рецептора, активирующего NK-клетки, или его функциональным вариантом, трансмембранным доменом рецептора, активирующего NK-клетки, или его функциональным вариантом, и/или внутриклеточным доменом рецептора, активирующего NK-клетки, или его функциональным вариантом.

22. Химерная белковая конструкция по п. 21, отличающаяся тем, что рецептор, активирующий NK-клетки, выбран из группы, состоящей из NKG2D, NKG2C, NKG2E, NKG2F, NKG2H, CD94, KIR2DL4, KIR2DS1, KIR2DS2, KIR2DS4, KIR3DS1, натурального цитотоксического рецептора, TRAIL, DNAM-1, CD16a, 2B4, NTB-A, CRACC и NKp80.

23. Химерная белковая конструкция по п. 21 или 22, отличающаяся тем, что рецептор, активирующий NK-клетки, находится в комплексе с модулем передачи сигнала CNK.

24. Химерная белковая конструкция по любому из пп. 18-23, отличающаяся тем, что по меньшей мере один фрагмент коэкспрессии связан с химерной белковой конструкцией расщепляемым линкером.

25. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая химерную белковую конструкцию по любому из пп. 1-24.

26. Молекула нуклеиновой кислоты по п. 25, отличающаяся тем, что молекула нуклеиновой кислоты представляет собой дезоксирибонуклеиновую кислоту (ДНК), рибонуклеиновую кислоту (РНК) (например, мРНК, кольцевую РНК, ссRNA), треозонуклеиновую кислоту (ТНК), гликолевую нуклеиновую кислоту (ГНК), пептидную нуклеиновую кислоту (ПНК), закрытую нуклеиновую кислоту (ЗНК, в том числе ЗНК с конфигурацией β -D-рибозы, α -ЗНК с конфигурацией α -L-рибозы (диастереоизомеры ЗНК), с 2'-аминофункционализированной 2'-амино-ЗНК и 2'-амино- α -ЗНК с 2'-аминофункционализацией), этиленнуклеиновую кислоту (ЭНК), циклогексенилнуклеиновую кислоту (CeNA) и/или химеры и/или их комбинации.

27. Вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по п. 25 или 26, отличающийся тем, что молекула нуклеиновой кислоты функционально связана по меньшей мере с одним полинуклеотидным регуляторным элементом для экспрессии химерной белковой конструкции, кодируемой молекулой нуклеиновой кислоты.

28. Вектор по п. 27, отличающийся тем, что вектор выбран из группы, состоящей из: плазмиды, наноплазмиды, космиды, вирусного вектора (например, онколитических вирусных векторов), миникольца, РНК-вектора или линейной или кольцевой ДНК (например, транспозонной ДНК) или молекул РНК.

29. Вектор по п. 28, отличающийся тем, что вектор представляет собой вирусный вектор, выбранный из группы, состоящей из ретровируса, лентивирусного вектора, аденовируса, парвовируса (например, аденоассоциированного вируса), вектора на основе аденоассоциированного вируса (AAV), коронавируса, РНК-вируса с отрицательной цепью, такого как ортомиксовирус (например, вирус гриппа), рабдовируса (например, вирусов бешенства и везикулярного стоматита), парамиксовируса (например, Мачи и Сендай), РНК-вируса с положительной цепью, такой как пикорнавирус и альфавирус, и вируса с двухцепочечной ДНК, при этом вирус с двухцепочечной ДНК включает аденовирус, вирус герпеса (например, вирус простого герпеса типов I и II, вирус Эпштейна-Барр, цитомегаловирус) и вируса оспы (например, осповакцины, оспы кур и оспы канареек), вируса Норвалка, тогавируса, флавивируса, реовируса, паповавируса, гепаднавируса, бакуловируса и вируса гепатита, вирусоподобной частицы (VLP).

30. Вектор по п. 29, отличающийся тем, что вирусный вектор представляет собой

ретровирусный вектор.

31. Вектор по п. 30, отличающийся тем, что ретровирусный вектор выбран из: вируса лейкопролиферативной саркомы птиц, вируса С-типа млекопитающих, вируса В-типа, вируса D-типа, коллекции HTLV-BLV, лентивируса, спумавируса.

32. Вектор по п. 29, отличающийся тем, что вирусный вектор представляет собой лентивирусный вектор.

33. Вектор по п. 32, отличающийся тем, что лентивирусный вектор выбран из группы, состоящей из HIV-1, HIV-2, SIV, FIV, BIV, EIAV, CAEV или лентивируса демиелинизирующего лейкоэнцефалита овец.

34. Вектор по любому из воплощений 27-33, отличающийся тем, что вектор дополнительно комбинируют с другими векторами, содержащими другие молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие по меньшей мере один фрагмент коэкспрессии.

35. Сконструированная клетка, экспрессирующая химерную белковую конструкцию по любому из пп. 1-25, или содержащая молекулу нуклеиновой кислоты по п. 26, или содержащая вектор по любому из пп. 27-33.

36. Сконструированная клетка по п. 35, экспрессирующая химерную белковую конструкцию по любому из пп. 1-18 и фрагмент коэкспрессии.

37. Сконструированная клетка по п. 35 или 36, отличающаяся тем, что клетка представляет собой иммунную клетку, выбранную из: Т-клетки, естественной клетки-киллера (NK), В-клетки, макрофага, моноцита, дендритной клетки, нейтрофила или $\gamma\delta$ Т-клетки.

38. Сконструированная клетка по п. 37, отличающаяся тем, что Т-клетка выбрана из группы, состоящей из: CD8⁺ Т-клетки, CD4⁺ Т-клетки, цитотоксической Т-клетки, терминальной эффекторной Т-клетки, Т-клетки памяти, наивной Т-клетки, группы клеток, состоящей из регуляторной Т-клетки, Т-клетки натурального киллера, гамма-дельта Т-клетки, Т-клетки-киллера, индуцированной цитокинами (СИК), и лимфоцита, инфильтрирующего опухоль.

39. Способ получения сконструированной клетки по любому из пп. 35-38, включающий введение вектора по любому из пп. 27-34 в исходную клетку в условиях, подходящих для экспрессии молекулы нуклеиновой кислоты по п. 25 или 26.

40. Способ по п. 39, отличающийся тем, что исходная клетка представляет собой стволовую клетку или клетку, дифференцированную из стволовой клетки.

41. Способ по п. 38, отличающийся тем, что стволовая клетка представляет собой гемопоэтическую клетку-предшественник (например, предшественник Т-клетки, предшественник NK-клетки, предшественник макрофага), гемопоэтическую стволовую

клетку (HSC), CD34+ клетку, эмбриональную клеточную линию, мезенхимальную стволовую клетку или клетку iPSC.

42. Способ по п. 37, отличающийся тем, что клетка представляет собой иммунную клетку.

43. Способ по воплощению 40, отличающийся тем, что иммунная клетка представляет собой Т-клетку, клетку натурального киллера (NK), В-клетку, макрофаг, моноцит или дендритную клетку.

44. Способ по воплощению 41, отличающийся тем, что клетка представляет собой Т-клетку, выбранную из группы, состоящей из: CD4+ Т-клетки, CD8+ Т-клетки, цитотоксической Т-клетки, терминальной эффекторной Т-клетки, Т-клетки памяти, наивной Т-клетки, группы клеток, состоящей из регуляторной Т-клетки, Т-клетки натурального киллера, гамма-дельта Т-клетки, Т-клетки-киллера, индуцированной цитокинами (СИК), и лимфоцита, инфильтрирующего опухоль.

45. Популяция клеток, полученная *ex vivo* способом по любому из пп. 39-44.

46. Фармацевтическая композиция или набор, включающий:

(i) химерную белковую конструкцию по любому из пп. 1-24, или молекулу нуклеиновой кислоты по пп. 25 или 26, или вектор по любому из пп. 27-34, или сконструированную клетку по любому из пп. 35-38 или популяцию клеток по п. 45, и

(ii) фармацевтически приемлемую среду.

47. Способ деградации белка-мишени, включающий доставку вектора по любому из пп. 27-34 в клетку, экспрессирующую белок-мишень.

48. Способ по п. 47, отличающийся тем, что клетка выбрана из группы, состоящей из: опухолевой клетки, инфицированной вирусом клетки, нервной клетки, трансплантированной клетки или иммунной клетки.

49. Способ по п. 47 или 48, отличающийся тем, что доставка включает доставку с помощью вирусного вектора (например, онколитического вируса).

50. Способ по п. 49, отличающийся тем, что вектор экспрессирует в клетке химерную белковую конструкцию по любому из пп. 1-24.

51. Способ по п. 50, отличающийся тем, что химерная белковая конструкция способна одновременно связывать белок-мишень и белок механизма ERAD, тем самым разрушая белок-мишень.

52. Способ лечения состояния или заболевания у нуждающегося в этом субъекта, включающий:

введение субъекту терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции по п. 46.

53. Способ по п. 52, отличающийся тем, что заболевание включает различные солидные опухоли и гематологические опухоли, вирусные инфекционные заболевания, аутоиммунные заболевания, а также неврологические и дегенеративные заболевания (например, болезнь Альцгеймера), метаболические заболевания (например, диабет (например, диабет II типа) заболевания, связанные с липидным обменом (например, опухолевый липидный обмен, неалкогольная жировая дистрофия печени), атеросклероз (АС), опухолевый метаболизм глюкозы;

предпочтительно солидную опухоль выбирают из опухолей нервной системы, опухолей головы и шеи, опухолей грудной клетки, опухолей пищеварительной системы, опухолей мочеполовой системы, опухолей мягких тканей и кожи, опухолей костей и т.п.;

предпочтительно опухоли нервной системы включают диффузную глиому, диффузную астроцитому и анапластическую астроцитому, глиобластому, олигодендроглиому, олигоастроцитому, диффузные глиомы, другие астроцитомы, эпендимомы, нейрональные и смешанные нейронально-глиальные опухоли, медуллобластому, другие эмбриональные опухоли, шванномы, менингиомы, солитарные фиброзные опухоли и гемангиоперицитомы и т.п.;

предпочтительно опухоли головы и шеи включают злокачественные опухоли полости и пазух носа, рак носоглотки, рак полости рта, рак гортани, опухоли слюнных желез, внутричерепные опухоли, рак щитовидной железы, рак языка и т.п.;

предпочтительно, опухоли грудной клетки включают рак легкого, рак пищевода, рак кардии, рак молочной железы, опухоли средостения и т.п.;

предпочтительно опухоли пищеварительной системы включают рак желудка, колоректальный рак, рак сигмовидной, ободочной и прямой кишки, рак печени, рак поджелудочной железы и периампулярный рак, рак желчевыводящих путей, злокачественные опухоли тонкого кишечника и т.п.;

предпочтительно опухоли мочеполовой системы включают рак почки, рак предстательной железы, рак мочевого пузыря, рак яичек, рак полового члена, рак шейки матки, рак эндометрия, рак яичника и т.п.;

предпочтительно опухоли мягких тканей и кожи включают злокачественную фиброзную гистиоцитому, рабдомиосаркому, синовиальную саркому, злокачественную меланому кожи и т.п.;

предпочтительно опухоли костей включают остеосаркому, саркому Юинга и т.п.;

предпочтительно рак ободочной кишки представляет собой аденому ободочной кишки;

предпочтительно рак молочной железы представляет собой клетку трижды

негативного рака молочной железы;

предпочтительно рак печени представляет собой гепатоцеллюлярную карциному;

предпочтительно заболевание представляет собой гематологическую опухоль, выбранную из группы, состоящей из лейкоза, лимфомы (HL), множественной миеломы (MM), миелодиспластического синдрома (MDS) и т.п.;

предпочтительно лейкоз представляет собой острый В-клеточный лимфобластный лейкоз, острый Т-клеточный лимфобластный лейкоз, острый миелоидный лейкоз и т.п.;

предпочтительно вирусные инфекционные заболевания включают: респираторные вирусные заболевания, желудочно-кишечные вирусные заболевания, вирусные заболевания печени, вирусные заболевания кожи и слизистых оболочек, вирусные заболевания глаз, вирусные заболевания центральной нервной системы, лимфоцитарные вирусные заболевания, вирусные заболевания, передаваемые насекомыми, лентивирусные инфекционные заболевания, и т.п.;

предпочтительно респираторные вирусные заболевания включают инфекции риновируса, аденовируса, респираторно-синцитиального вируса, вируса парагриппа и коронавируса; гриппа; свинки и т.п.;

предпочтительно желудочно-кишечные вирусные заболевания включают полиомиелит; инфекцию, вызванную вирусом Куксаки; эховирусную инфекцию; и вирусный гастроэнтерит, включая ротавирусный гастроэнтерит, вирусный гастроэнтерит Норуолка, аденовирусный гастроэнтерит, астровирусный гастроэнтерит, коронавирусный гастроэнтерит и калицивирусный гастроэнтерит и т.п.;

предпочтительно вирусные заболевания печени включают вирусный гепатит А, вирусный гепатит В, вирусный гепатит С, вирусный гепатит D, вирусный гепатит Е, вирусный гепатит Эпштейна-Барр и цитомегаловирусный гепатит и т.п.;

предпочтительно вирусные заболевания кожи и слизистых оболочек включают корь, краснуху, острую сыпь у детей, ветряную оспу и опоясывающий лишай, оспу, вирусную инфекцию простого герпеса, бешенство и ящур и т.п.;

предпочтительно глазные вирусные заболевания включают эпидемический кератоконъюнктивит, фолликулярный конъюнктивит и герпетический кератоконъюнктивит и т.п.;

предпочтительно вирусные заболевания центральной нервной системы включают японский энцефалит, западный лошадиный энцефалит, восточный лошадиный энцефалит, энцефалит Сент-Луиса, венесуэльский лошадиный энцефалит, энцефалит долины Мюррея, калифорнийский энцефалит, лесной энцефалит и лимфоцитарный хориоменингит и т.п.;

предпочтительно лимфоцитарные вирусные заболевания включают инфекционный мононуклеоз, цитомегаловирусную инфекцию и синдром приобретенного иммунодефицита и т.п.;

предпочтительно вирусные заболевания, передаваемые насекомыми, включают: вирусные геморрагические лихорадки, в том числе эпидемическую геморрагическую лихорадку, желтую лихорадку, геморрагическую лихорадку Крым-Конго, лихорадку долины Рифт, аргентинскую геморрагическую лихорадку, боливийскую геморрагическую лихорадку, лихорадку Ласса, геморрагическую лихорадку Ому-Скраба, болезнь Марбурга, геморрагическую лихорадку Эбола и т.п.; лихорадку денге и геморрагическую лихорадку денге; лихорадку Западного Нила; колорадскую клещевую лихорадку; москитную лихорадку и т.п.;

предпочтительно лентивирусные инфекционные заболевания включают подострый склерозирующий панэнцефалит, болезнь Куру, прогрессирующую мультифокальную лейкоэнцефалопатию и подострую губчатую энцефалопатию (кортикостриарную дегенерацию спинного мозга) и т.п.;

предпочтительно аутоиммунные заболевания включают органоспецифические аутоиммунные заболевания и системные аутоиммунные заболевания;

предпочтительно органоспецифические аутоиммунные заболевания включают хронический лимфоцитарный тиреоидит, гипертиреоз, инсулинозависимый сахарный диабет, тяжёлую миастению, язвенный колит, пернициозную анемию с хроническим атрофическим гастритом, легочно-геморрагический нефритический синдром, вульгарную пузырчатку, пемфигоид, первичный билиарный цирроз печени, рассеянный склероз, острый идиопатический полиневрит и т.п.;

предпочтительно системные аутоиммунные заболевания включают системную красную волчанку, ревматоидный артрит, системный васкулит, склеродермию, пузырчатку, дерматомиозит, смешанное заболевание соединительной ткани, аутоиммунную гемолитическую анемию, аутоиммунные заболевания щитовидной железы, язвенный колит и т.п.;

предпочтительно неврологические заболевания включают заболевания нервной системы, заболевания периферических нервов, такие как невралгия тройничного нерва, паралич лицевого нерва, гемифациальный спазм, вестибулярный нейронит, языкоглоточная невралгия, заболевание мононерва, невралгия плечевого сплетения, множественная мононейропатия, множественная невропатия, острая воспалительная демиелинизирующая полинейропатия, хроническая воспалительная демиелинизирующая полинейропатия; заболевания спинного мозга, например, миелит, компрессионная

миелопатия, подострая комбинированная дегенерация спинного мозга, сирингомиелия, сосудистое заболевание спинного мозга, арахноидит спинного мозга и т.п.; цереброваскулярные заболевания, например, транзиторную ишемическую атаку, инфаркт головного мозга, кровоизлияние в мозг, субарахноидальное кровоизлияние, тромбоз внутричерепной венозной системы и т.п.; инфекционные заболевания центральной нервной системы, например, менингит, энцефалит и т.д., вызванные инфекциями вирусов, бактерий, грибов или паразитов и т.п., и лентивирусный энцефалит, вызванный лентивирусными инфекциями; демиелинизирующие заболевания центральной нервной системы, например, рассеянный склероз, оптикомиелит, острый рассеянный энцефаломиелит, лейкодистрофия и т.п.; двигательные расстройства, например, болезнь Паркинсона, хорею, гепатолентикулярную дегенерацию, дистонию, эссенциальный тремор, позднюю дискинезию и т.п.; эпилепсию; головные боли, такие как мигрень, головные боли напряжения, кластерные головные боли и т.п.;

дегенеративные заболевания нервной системы, например, болезнь двигательных нейронов, болезнь Альцгеймера, деменцию с тельцами Леви, лобно-височную деменцию, множественную системную атрофию и т.п.; наследственные заболевания нервной системы, такие как наследственная атаксия, наследственная спастическая параплегия, болезнь Шарко-Мари-Тута, нейрофиброматоз, туберозный склероз, церебральный гемангиоматоз и т.п.;

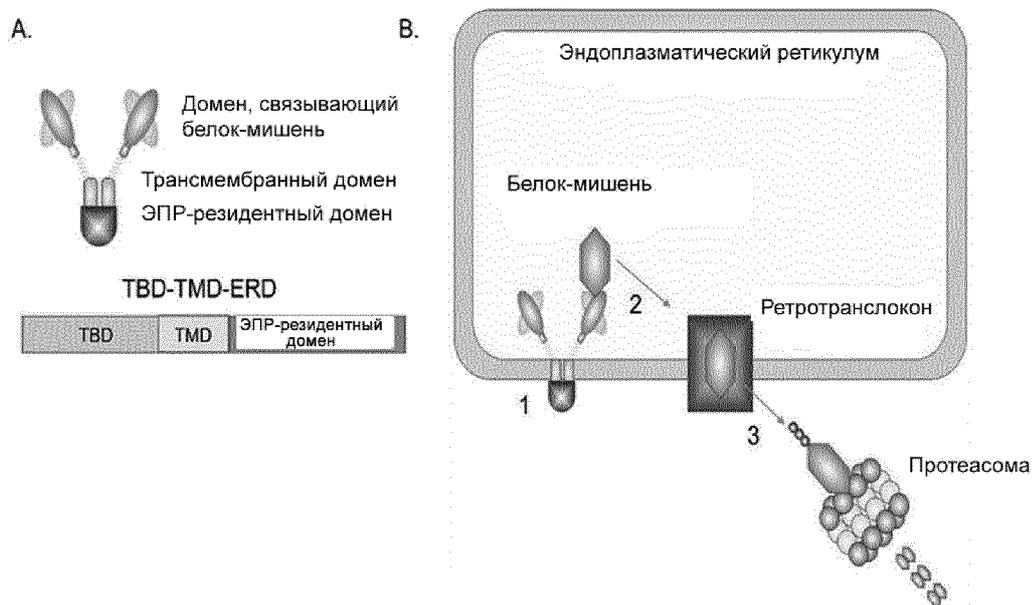
нарушения неврологического развития, например, врожденную гидроцефалию, церебральный паралич, базилярную депрессию, субтонзиллярное заболевание мозжечка и т.п.; заболевания нервно-мышечного соединения и мышц, например, тяжелую миастению, периодический паралич, полимиозит, прогрессирующую мышечную дистрофию, миотоническую миопатию (миотоническую дистрофию, врожденную миотонию), метаболическую миопатию (митохондриальную миопатию, миопатию накопления липидов, гликогеноз) и т.п.; заболевания вегетативной нервной системы, например, болезнь Рейно, эритромелалгию, гемифациальную атрофию, генерализованную вегетативную недостаточность, спонтанный гипергидроз, прогрессирующую липодистрофию и т.п.; опухоли нервной системы, например, глиому, лимфому, менингиому и т.п.;

паранеопластические синдромы нервной системы, например, паранеопластическую дегенерацию мозжечка, паранеопластический энцефаломиелит, подострую некротическую миелопатию, подострую болезнь двигательных нейронов, паранеопластическую болезнь сенсорных нейронов и т.п.

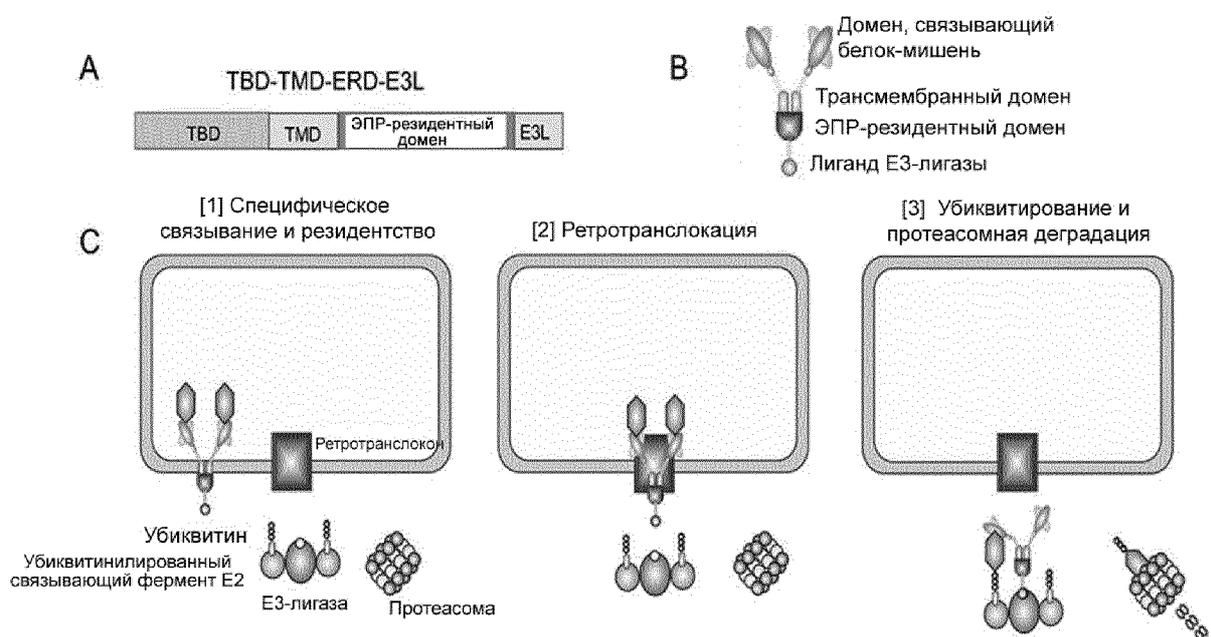
предпочтительно, метаболические заболевания включают диабет,

гиперлипидемию, подагру и т.п.

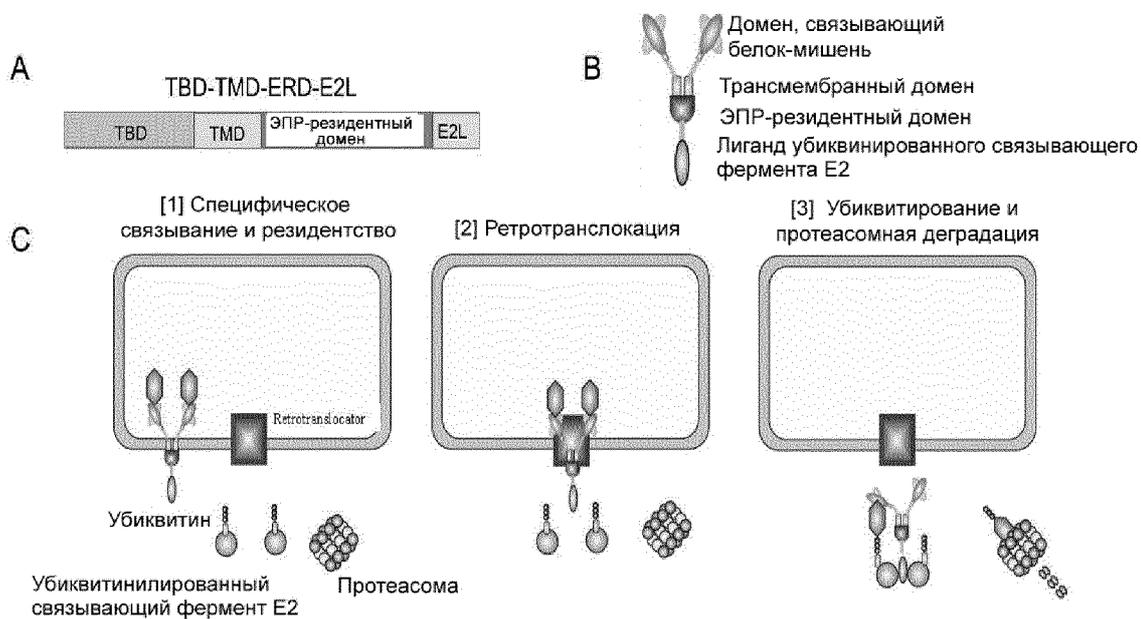
54. Способ стимуляции иммунного ответа у субъекта, причем указанный способ включает введение субъекту эффективного количества фармацевтической композиции по п. 46.



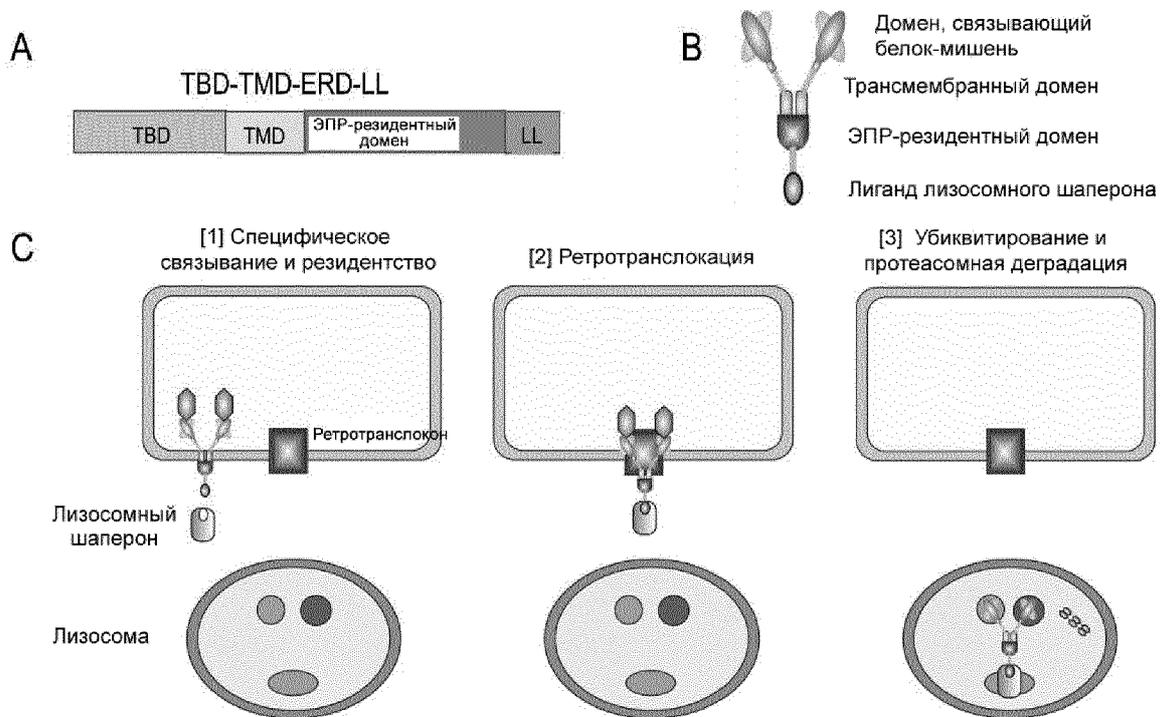
Фиг. 1



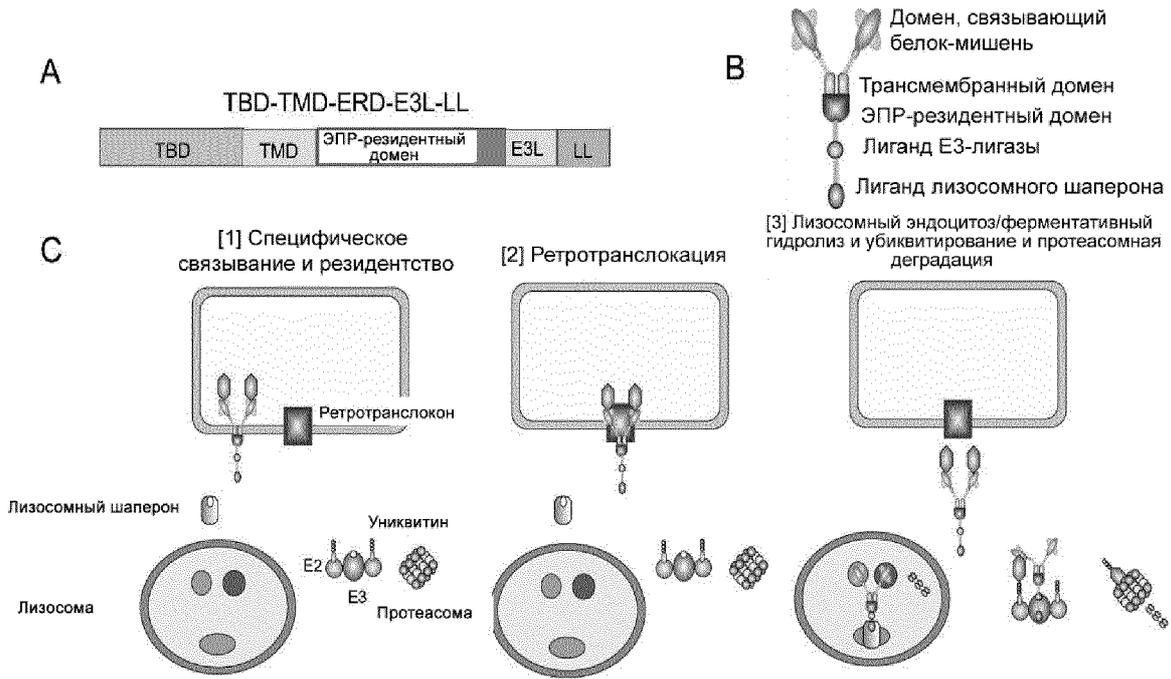
Фиг. 2



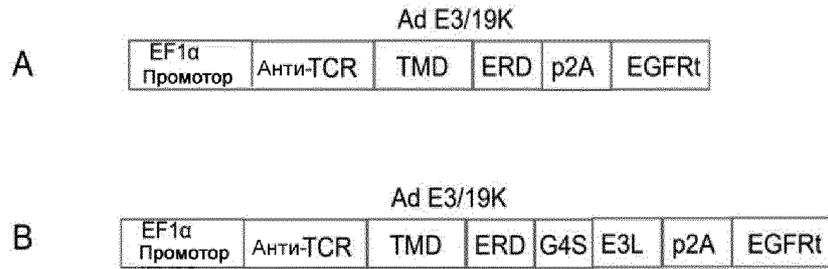
Фиг. 3



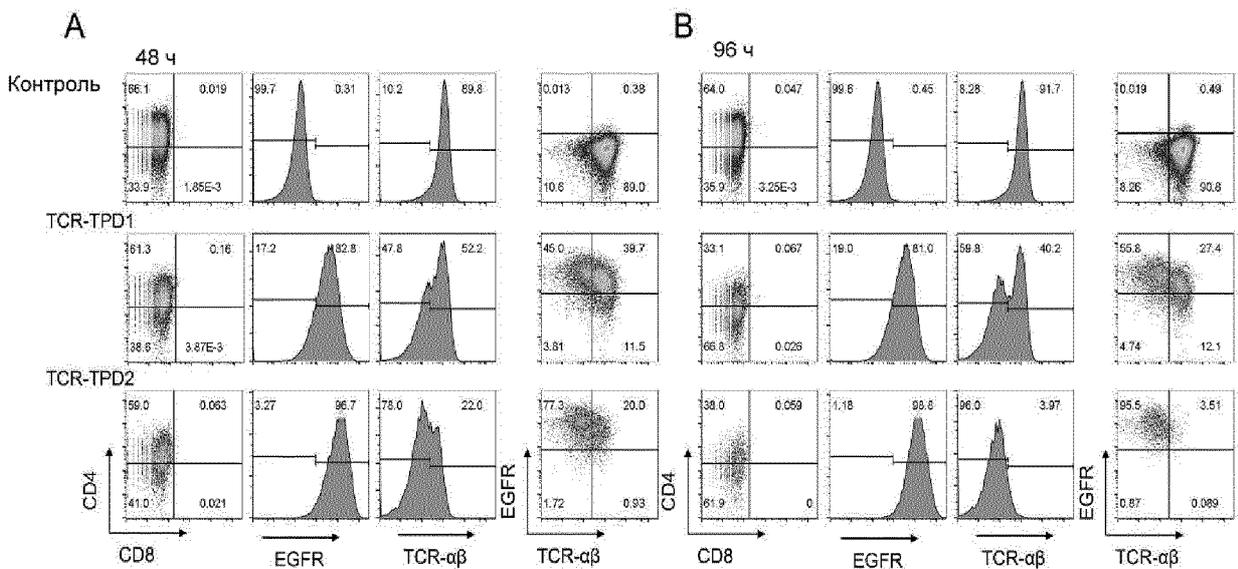
Фиг. 4



ФИГ. 5

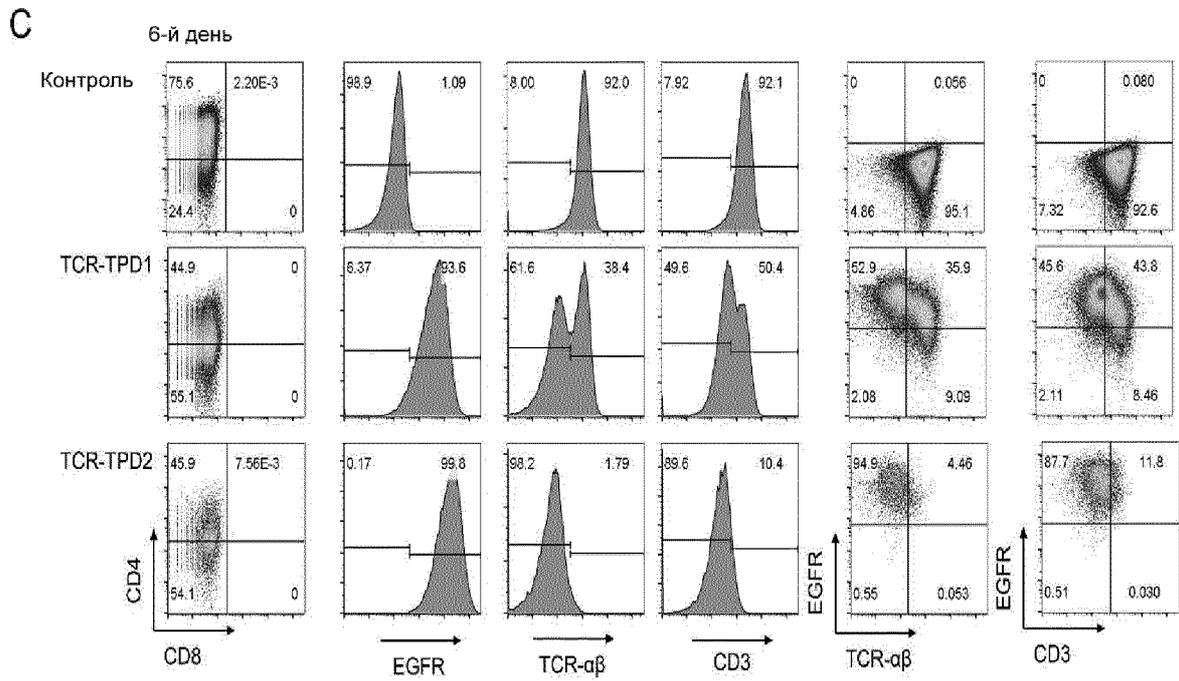


ФИГ. 6



ФИГ. 7А

ФИГ. 7В



Фиг. 7С

A CNK: DAP10-CD3 ζ -T2A-NKG2D

EF1 α Промотор	DAP10	CD3Z	T2A	NKG2D
--------------------------	-------	------	-----	-------

B HLA-TPD: E3/19K-E3L

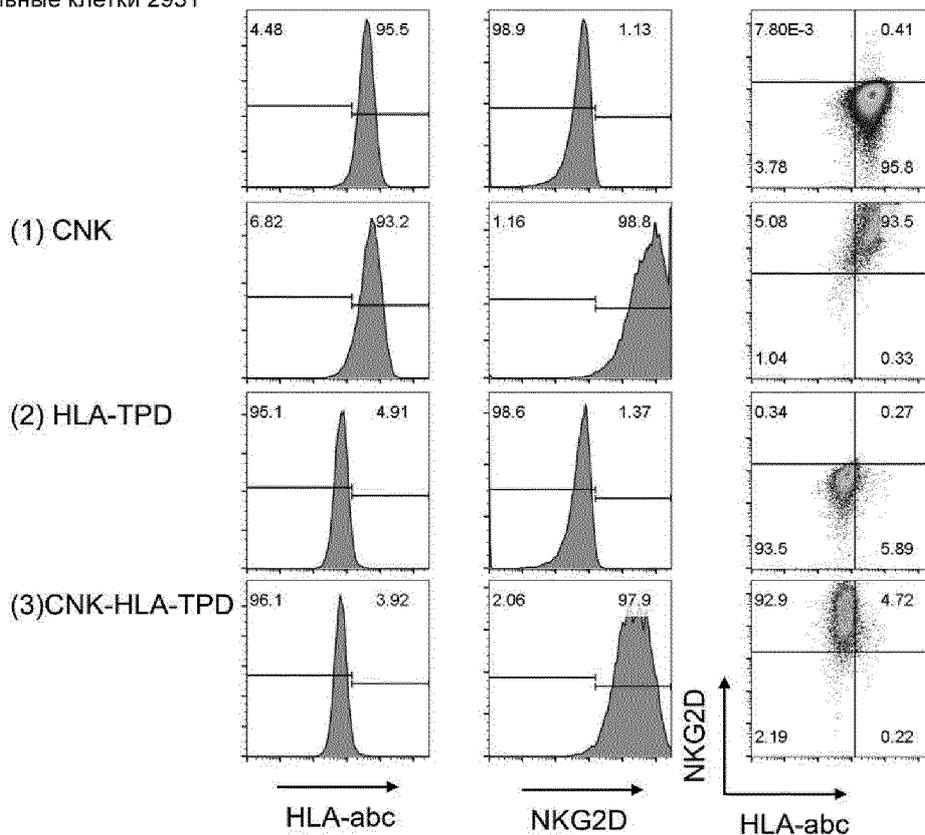
EF1 α Промотор	E3/19K	E3L
--------------------------	--------	-----

C CNK-HLA-TPD: DAP10-CD3 ζ -T2A-NKG2D-p2A-E3/19K-E3L

EF1 α Промотор	DAP10	CD3Z	T2A	NKG2D	p2A	E3/19K	E3L
--------------------------	-------	------	-----	-------	-----	--------	-----

Фиг. 8

Контрольные клетки 293T



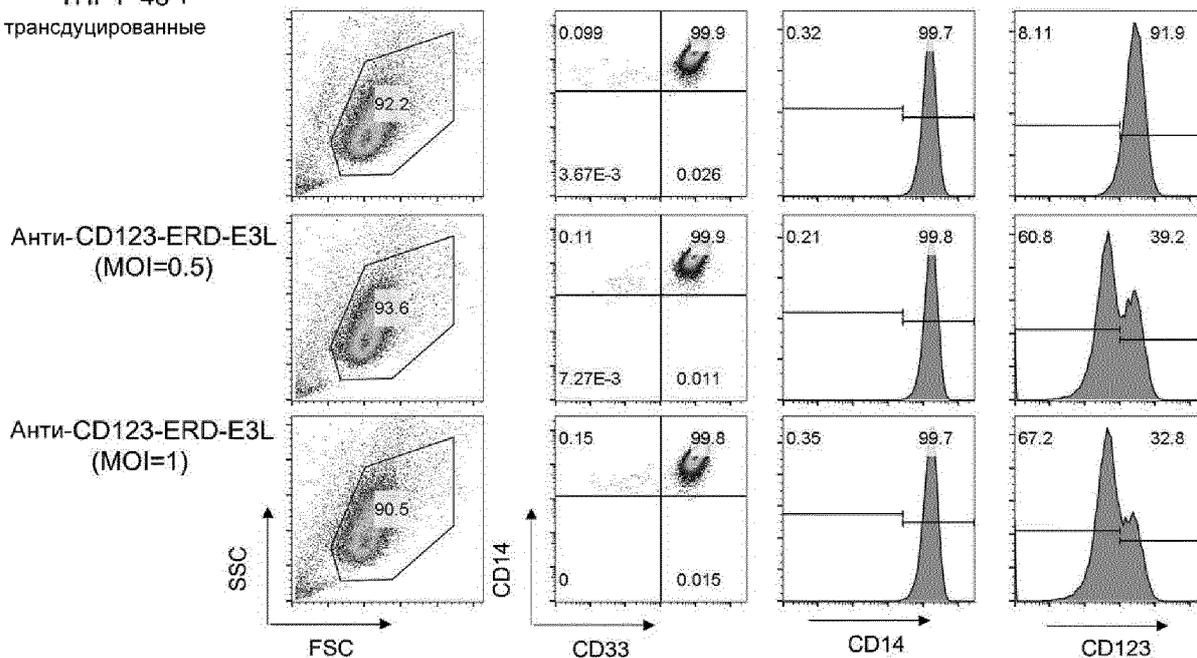
Фиг. 9

Анти-CD123 ERD-E3L

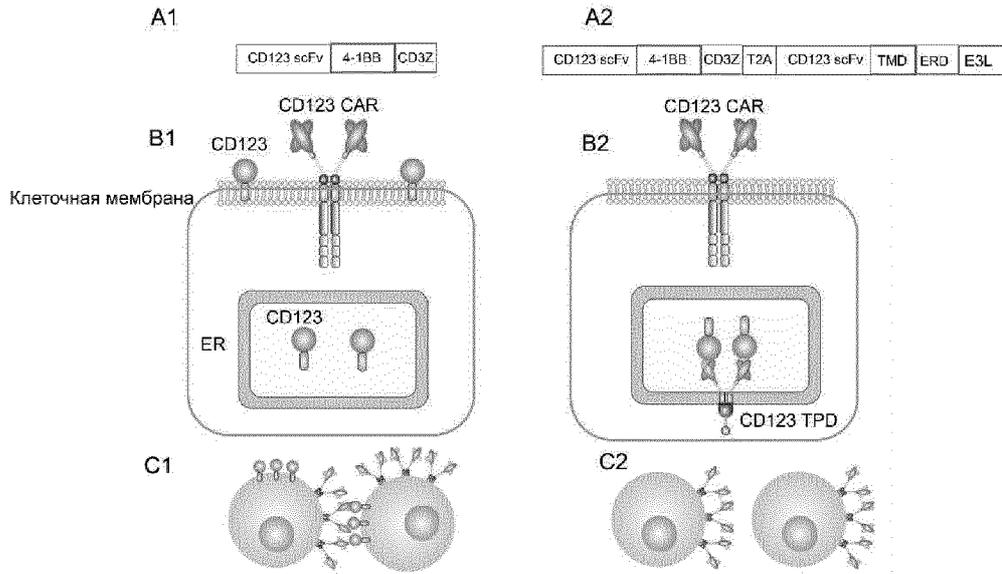


Фиг. 10

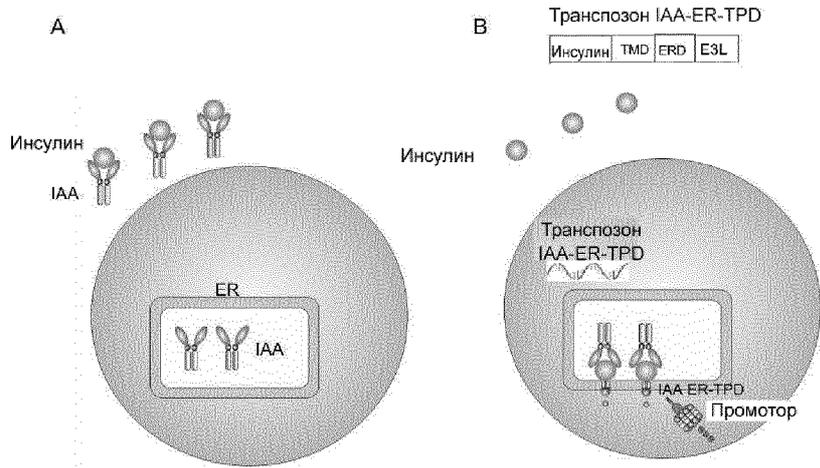
ТНР1 48ч
не трансдуцированные



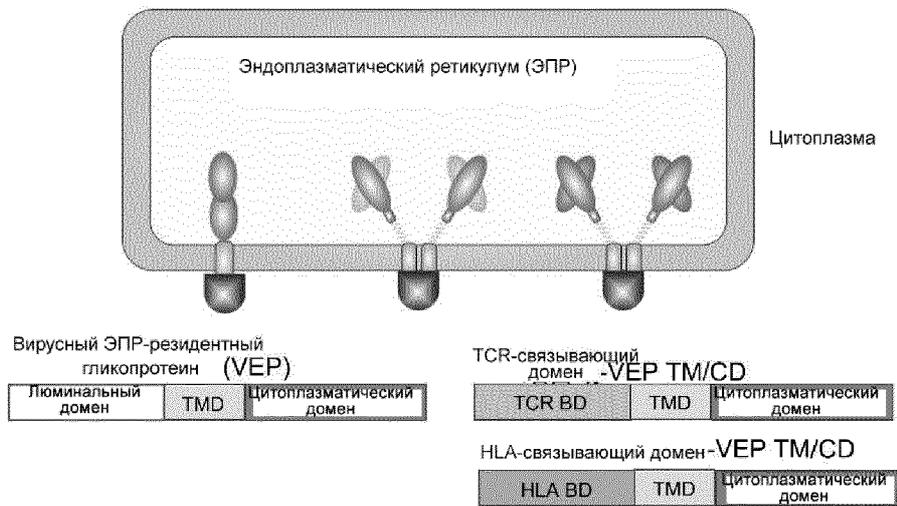
Фиг. 11



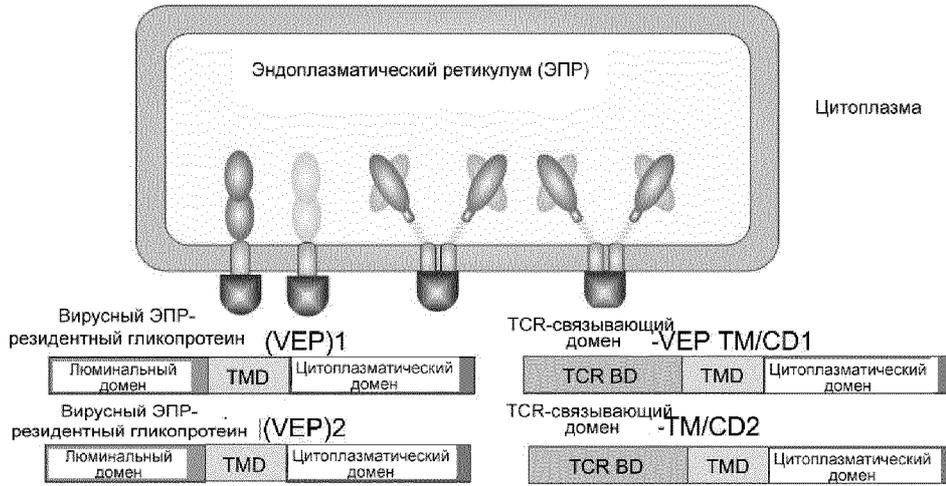
Фиг. 12



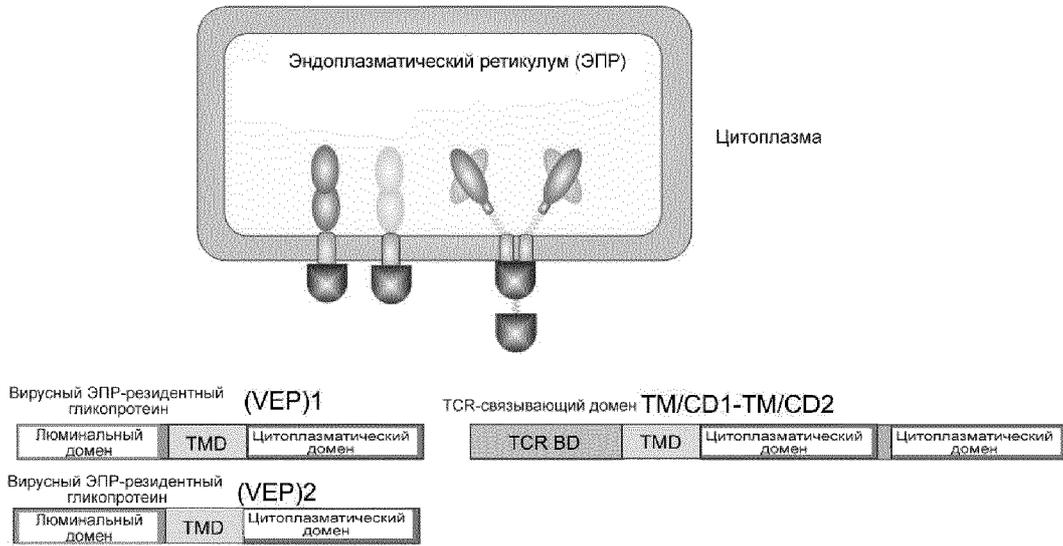
Фиг. 13



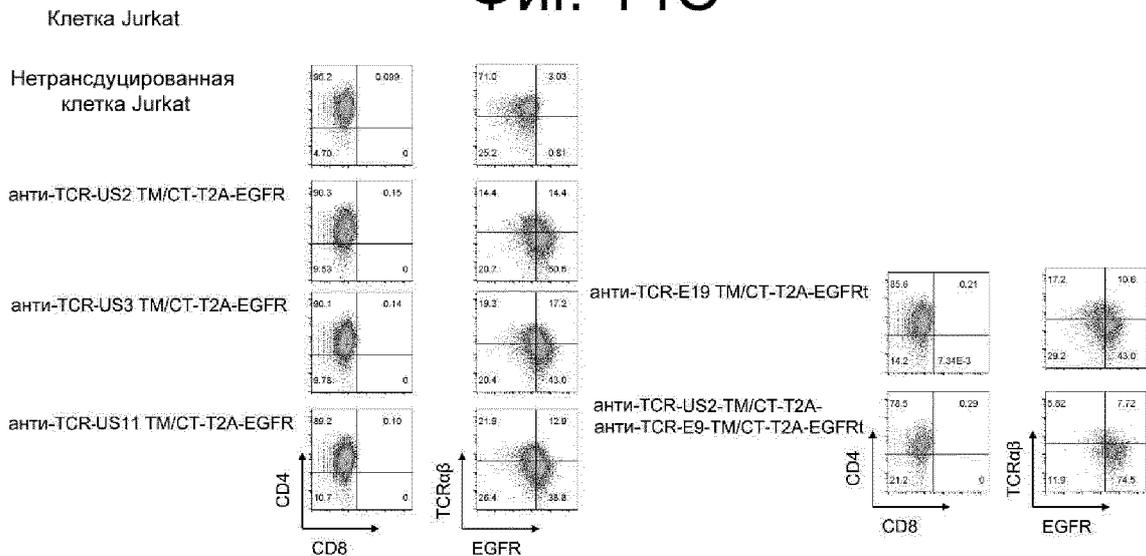
Фиг. 14А



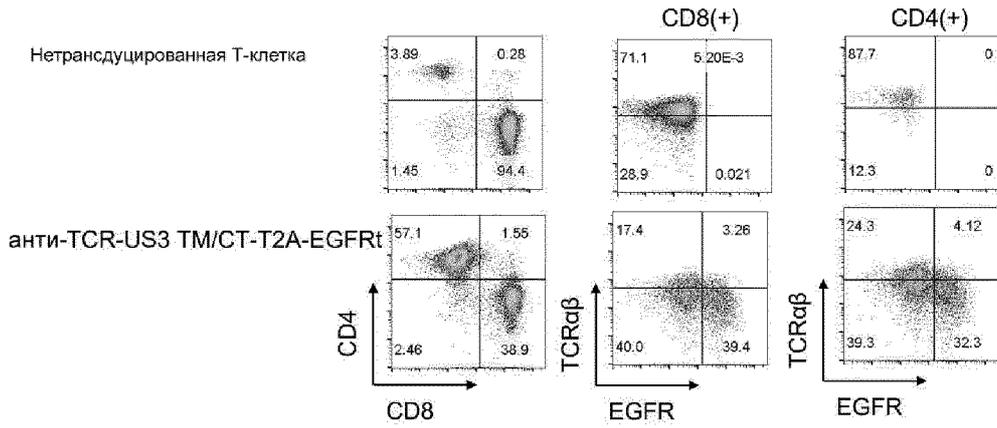
Фиг. 14В



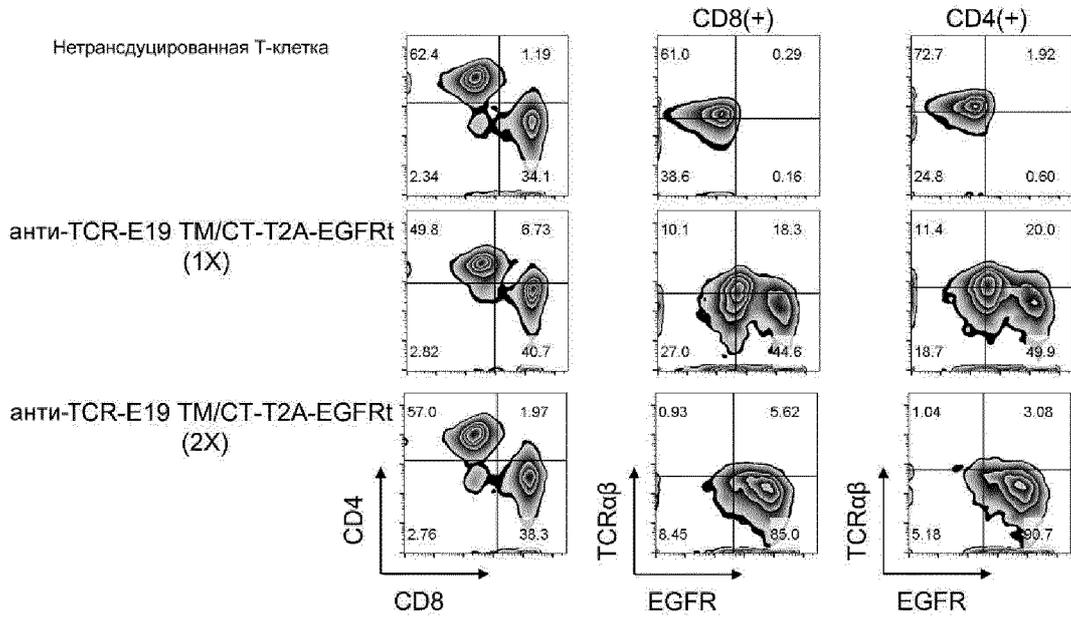
Фиг. 14С



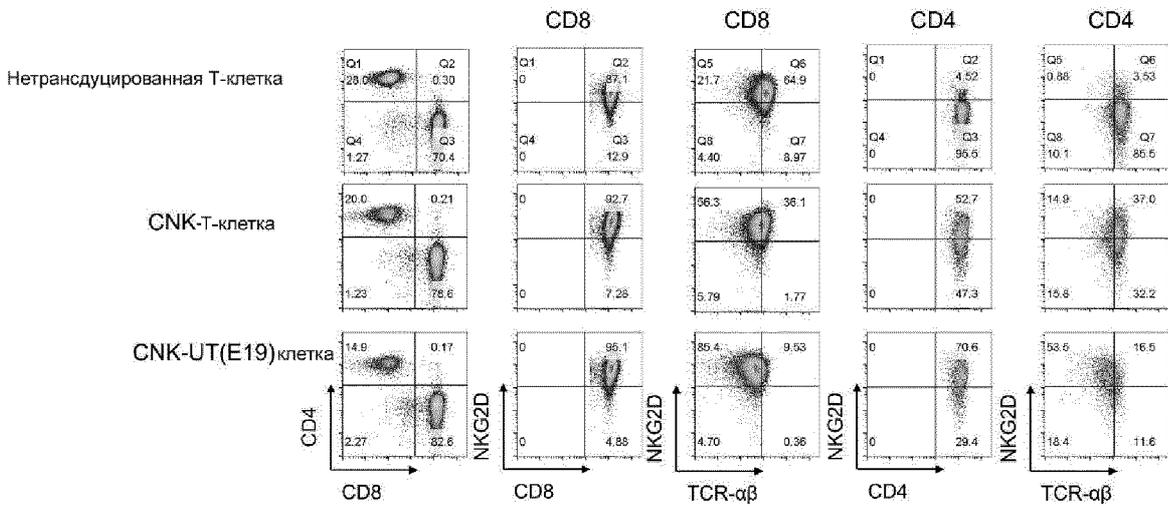
Фиг. 15



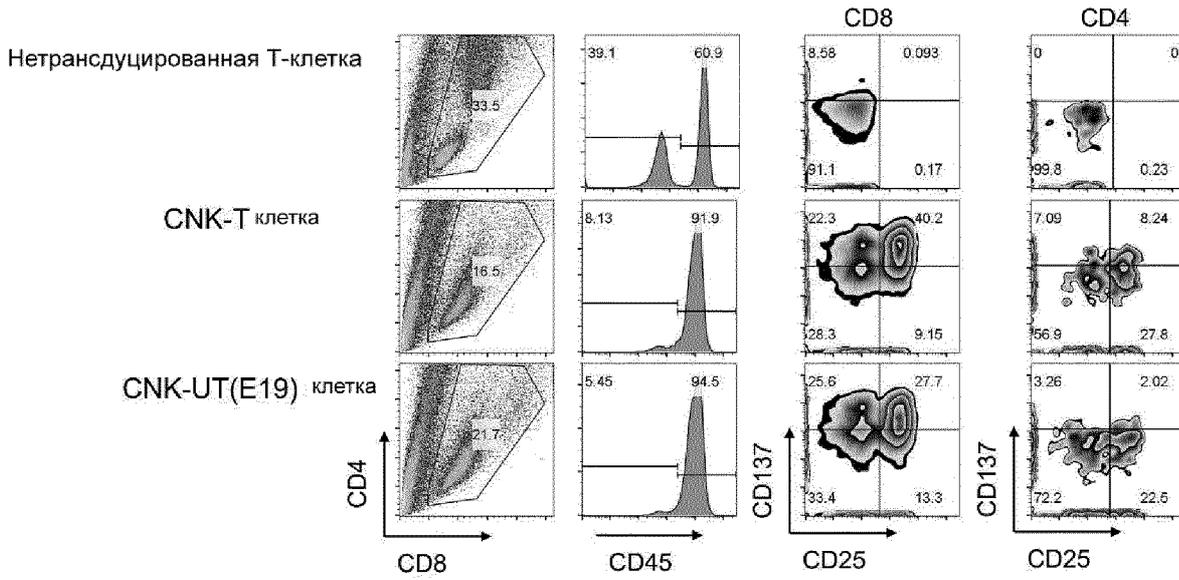
Фиг. 16А



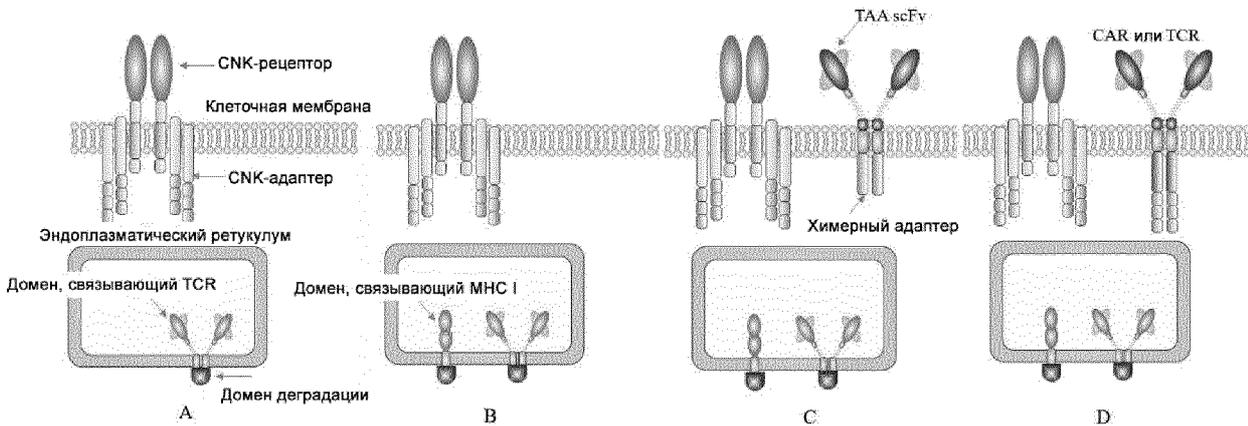
Фиг. 16В



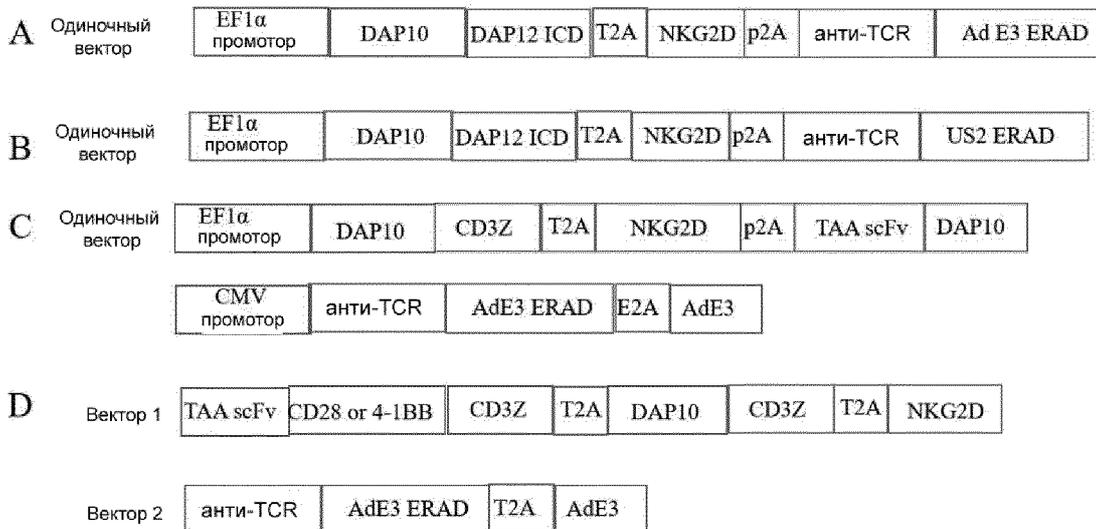
Фиг. 17



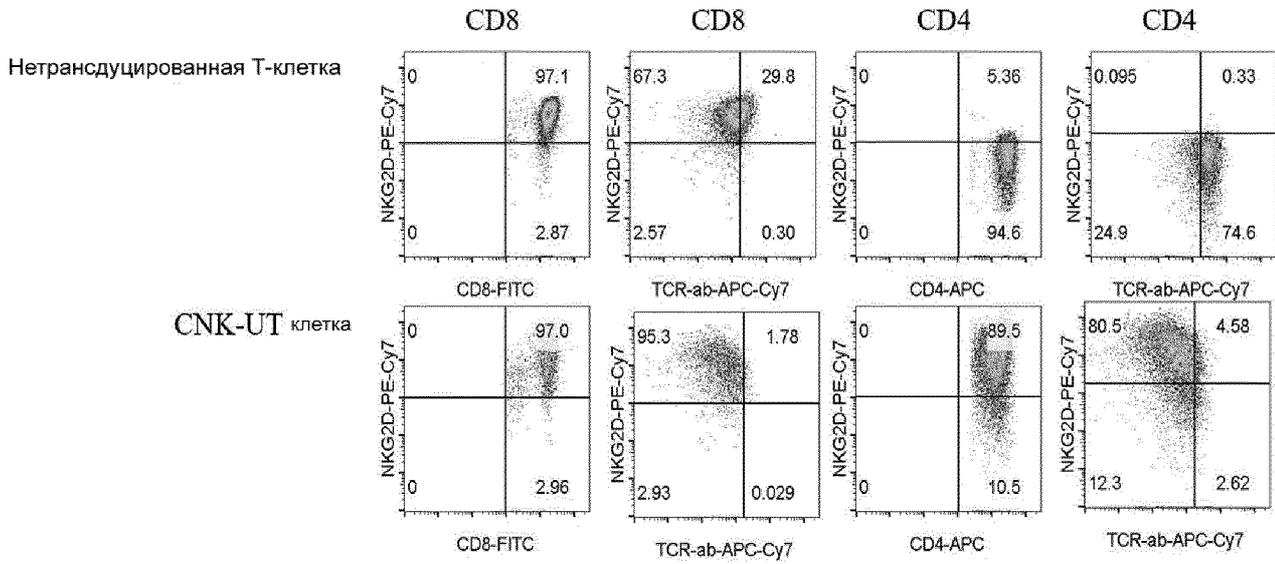
Фиг. 18



Фиг. 19



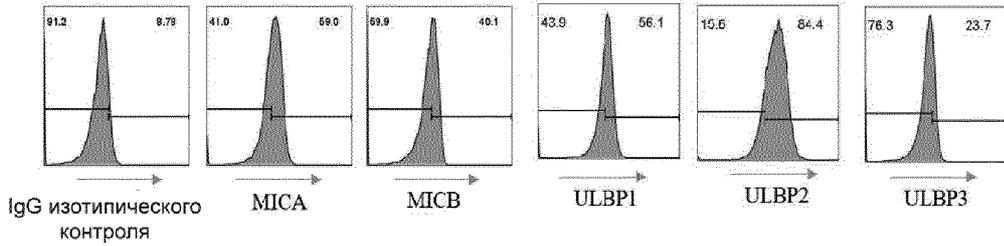
Фиг. 20



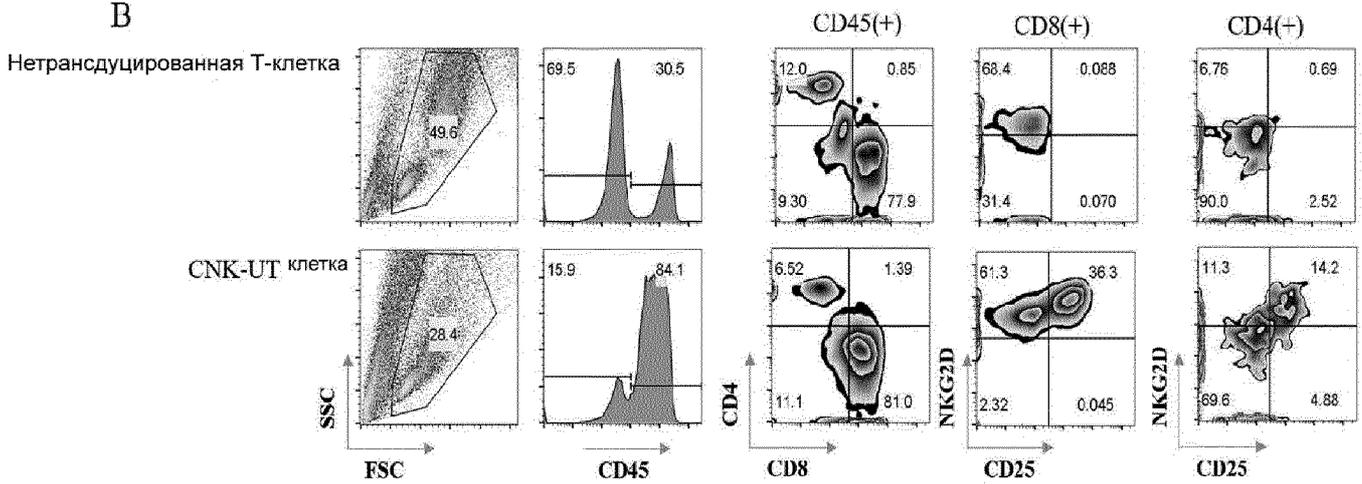
Фиг. 21

HT-29 (Клеточная линия аденомы ободочной кишки человека)

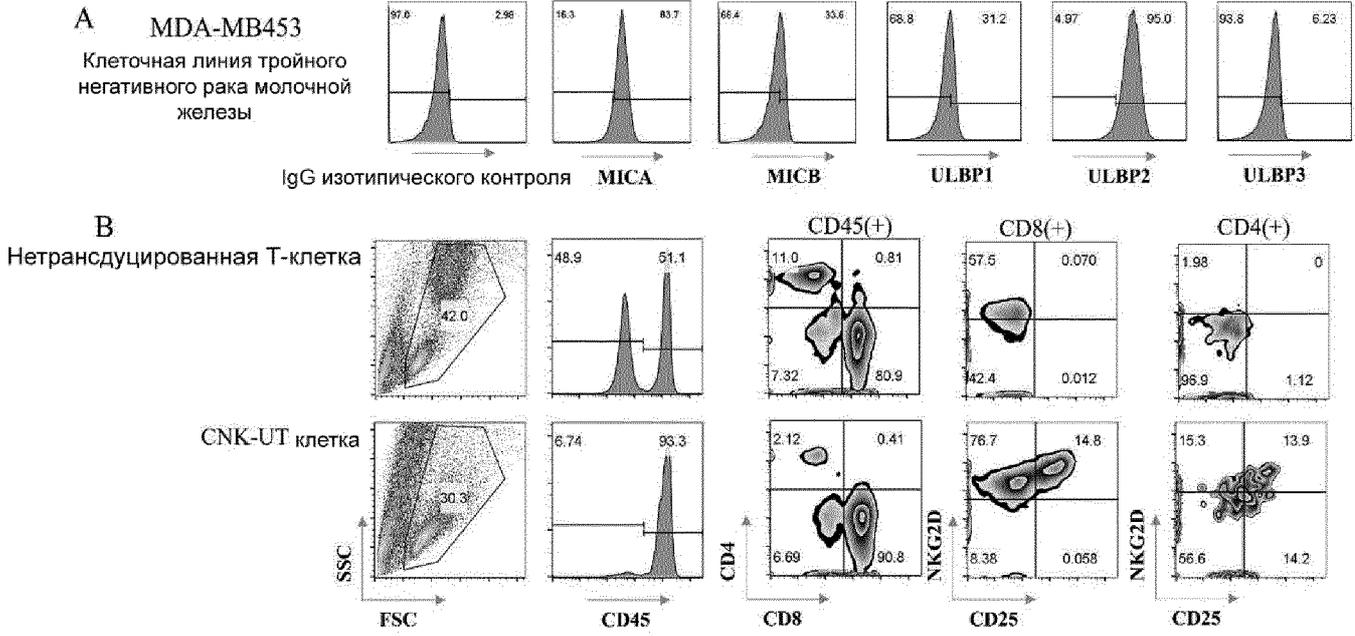
A



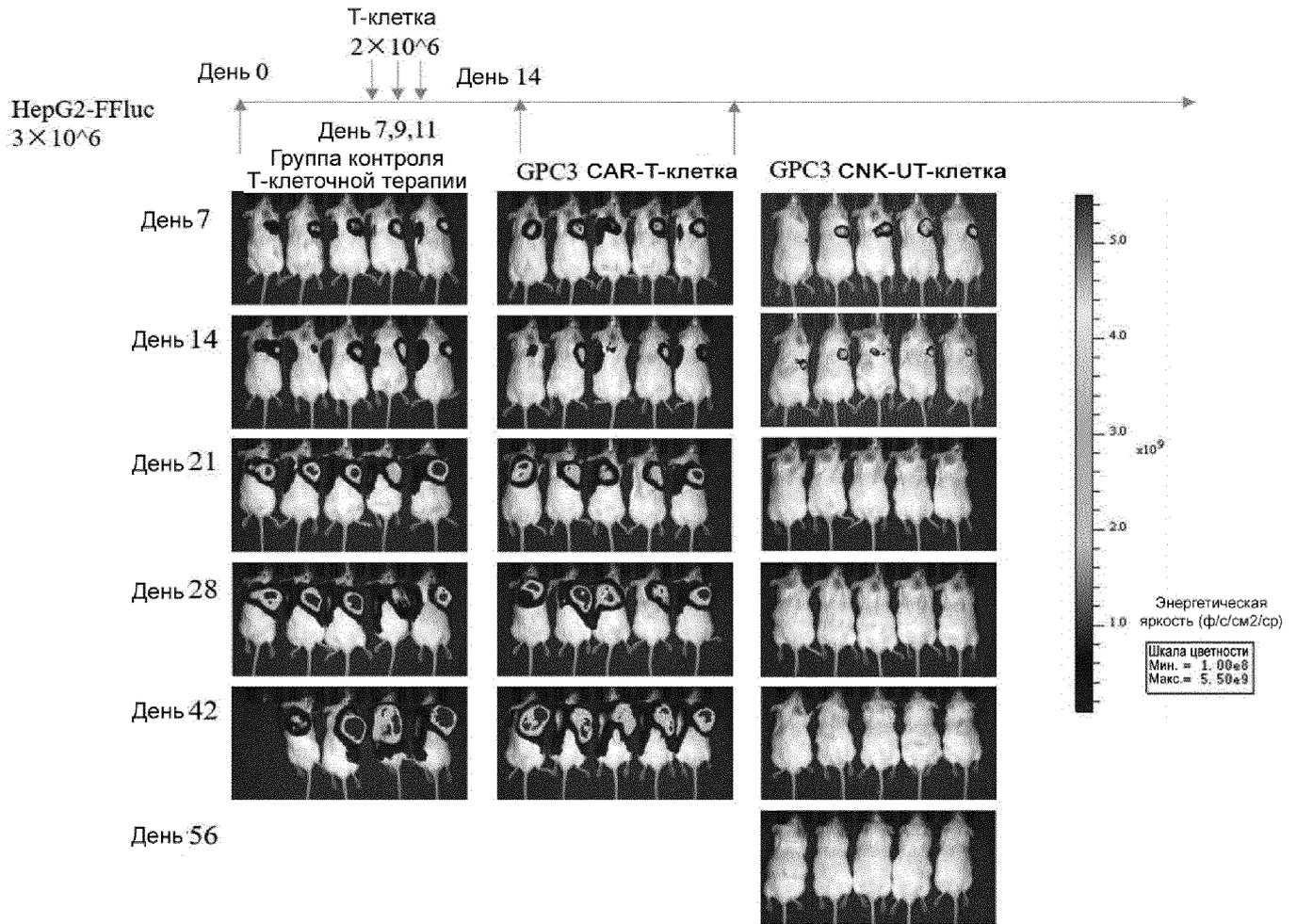
B



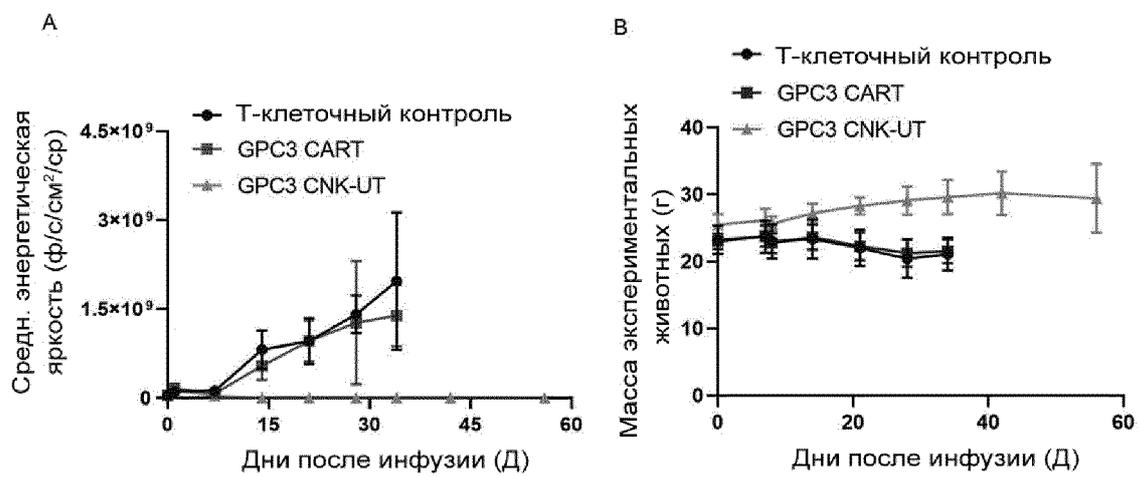
Фиг. 22



Фиг. 23



Фиг. 24



Фиг. 25