

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202393594 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.04.26

(22) Дата подачи заявки
2022.08.01

(51) Int. Cl. C07K 14/705 (2006.01)
C07K 14/715 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
C07K 16/08 (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01)
A61K 35/17 (2015.01)

(54) УНИВЕРСАЛЬНАЯ Т-КЛЕТКА И ЕЕ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) 202110877843.X

(32) 2021.07.30

(33) CN

(86) PCT/CN2022/109558

(87) WO 2023/006120 2023.02.02

(71) Заявитель:
СТ ФИ ТЕРАПЬЮТИКС КО., ЛТД
(CN)

(72) Изобретатель:
Лю Линфэн, Чжун Вэньтин (CN)

(74) Представитель:
Фелицына С.Б. (RU)

(57) Предлагаются универсальные Т-клетки (CNK-UT) и их применение. CNK-UT обладает способностью распознавать и уничтожать в широком спектре опухолевые клетки и клетки, инфицированные вирусом.

| | | | | | | | |
|---|--------------------|---------------------|----------|----------------|-----------|-----------|------------------------------|
| А | селективный вектор | промотор EF1 hTK | DAP10 | DAP12 ICD T2A | NGG2D p2A | anti-TCR | AIE E3 ERAD |
| В | селективный вектор | промотор EF1 hTK | DAP10 | DAP12 ICD T2A | NGG2D p2A | anti-TCR | US2 ERAD IRES ICP47 E2A US11 |
| С | вектор 1 | промотор EF1 hTK | DAP10 | DAP12 ICD | CD3Z T2A | NGG2D p2A | TAA scFv DAP10 |
| | вектор 2 | промотор CMV | anti-TCR | AIE E3 ERAD | T2A | ICP47 | |
| D | вектор 1 | промотор EF1 hTK | TAA scFv | CD28 или 4-1BB | CD3Z T2A | DAP10 | CD3Z T2A NGG2D |
| | вектор 2 | промотор CMV | anti-TCR | AIE E3 ERAD | T2A | ICP47 p2A | UL16 |

202393594

A1

A1

202393594

УНИВЕРСАЛЬНАЯ Т-КЛЕТКА И ЕЕ ПРИМЕНЕНИЕ

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее раскрытие относится к области клеточной терапии, более конкретно, к универсальной Т-клетке и ее применению, в частности к универсальной Т-клетке с химерным рецептором натурального киллера (CNK-UT) и ее применению.

Предшествующий уровень техники

В клеточной терапии иммунные клетки, модифицированные с помощью технологии генной инженерии для презентации опухолеассоциированных антигенов или экспрессии рецепторов, которые специфически распознают клетки заболевания, экспоненциально амплифицируются *in vitro*, а затем переливаются обратно пациентам, чтобы активировать иммунную систему *in vivo* для атаки опухолевых клеток или для непосредственного специфичного распознавания и уничтожения клеток заболевания. В 2012 году CAR-T-клетки, нацеленные на CD19, достигли первого в истории медицины целенаправленного устранения 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 клеточной терапии в прецизионной медицине. Ожидается, что эта технология найдет применение для лечения различных гематологических опухолей и солидных опухолей. Однако текущая клиническая эффективность обычной CAR-T при лечении солидных опухолей недостаточна, и причины заключаются в следующем: (1) функция уничтожения у CAR-T сильно зависит от распознавания опухолеассоциированного антигена (ОАА) структурой CAR, но из-за гетерогенности солидных опухолей имеются большие различия в экспрессии белков-мишеней на поверхности опухолевых клеток; в настоящее время одиночная целевая CAR-T не может полностью распознать и уничтожить все опухолевые клетки, что приводит к ускользанию от иммунной системы, рецидиву и метастазированию опухолей; (2) существует прямой иммуносупрессивный эффект солидных опухолей, экспрессирующих PD-L1, VISTA и т.п., непосредственно ингибирующих активацию Т-клеток; (3) в иммуносупрессивном микроокружении солидных опухолей имеется большое количество иммуносупрессивных клеток, например, TAM, Treg, MDSC, и при разработке обычной CAR-T трудно преодолеть ограничения иммуносупрессивных клеток внутри опухоли; (4) традиционная CAR-T представляет собой персонализированную клеточную терапию, то есть Т-клетки происходят из самого пациента, и если пациент получил большое количество лучевой терапии, химиотерапии и т.п., 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 у Т-клеток все еще очень слаба, поэтому трудно оказать терапевтическое воздействие.

Иммунная система очень пластична и обладает практически безграничной способностью обнаруживать вторгающиеся вирусы, бактерии, ксенологичные и больные клетки. Эта исключительная способность иммунного мониторинга достигается в первую очередь за счет гуморального иммунитета и клеточного иммунитета, который включает две важные молекулярные структуры: иммуноглобулины и Т-клеточные рецепторы (TCR). TCR, определяющая структура Т-клеток, представляет собой трансмембранный гетеродимер, состоящий из α - и β -цепей или δ - и γ -цепей, связанных дисульфидными связями. Внутри этих цепей комплементарно определяющие области (CDR) распознают антиген, с которым будет связываться TCR. В TCR субъединицы TCR α и TCR β (или TCR γ и TCR δ в $\gamma\delta$ Т-клетках) отвечают за распознавание главных комплексов гистосовместимости (МНС)/антигенных лигандов.

Область гена МНС человека включает аллели в сайтах HLA-A, В и С, кодирующие классические антигены (молекулы) класса I, например, антиген HLA-A, антиген В и антиген С, которые обозначаются 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 презентуют эти мутантные белки или гетерологичные белковые эпитопы, и иммунные клетки будут осуществлять иммунную атаку и убивать после распознавания, тем самым удаляя больные клетки, бактерии и вирусы.

Поскольку молекулы МНС являются ключевыми факторами для презентации вирусных антигенов и запуска атаки иммунной системы против вирусных патогенов, вирусы постепенно сформировали стратегию целенаправленного ингибирования молекул МНС, чтобы избежать иммунных надзора и клиренса для эволюции в течение миллионов лет. Типичным примером является цитомегаловирус человека (HCMV), который эволюционировал вместе со своим хозяином и научился ускользать от иммунного ответа с помощью множества геномных функциональных белков. Уникальная короткая (unique short, US) геномная область HCMV кодирует как минимум пять гликопротеинов (US2, US3, US6, US10, US11). Эти гликопротеины используют специальные механизмы для подавления молекул МНС класса I, тем самым предотвращая презентацию вирусного антигена цитотоксическим Т-лимфоцитам (CTL).

Гликопротеин US CMV может перехватить механизм деградации, связанной с эндоплазматическим ретикуломом (ER-associated degradation, ERAD), чтобы ингибировать презентацию вирусного антигена, опосредованную молекулой МНС, тем самым уклоняясь от системы иммунного надзора. Деградация, связанная с ЭР (ERAD), представляет собой систему утилизации белков. Белки, неправильно свернутые, неправильно собранные или метаболически регулируемые в эндоплазматическом ретикулуме, избирательно перемещаются из эндоплазматического ретикулума в цитозоль посредством специфического механизма проникновения через мембрану, а затем разрушаются цитоплазматической убиквитин-протеасомной системой (UPS).

Оба белка US2 и US11 HCMV представляют собой резидентные в ЭР интегральные мембранные гликопротеины типа I, которые совместно используют этот путь ERAD, чтобы способствовать деградации тяжелых цепей МНС 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 домены, выходящие в просвет, и рекрутируют белки клетки-хозяина, которые экстрагируют полипептиды из мембраны эндоплазматического ретикулума 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.

Выходящий в просвет домен US2 отвечает за связывание молекул МНС класса I и II, трансмембранный домен (ТМ) и цитоплазматический домен (СТ) взаимодействуют с клеточной композицией путей ERAD и способствуют транслокации и стимулированию ферментативного расщепления как белков класса I, так и класса II. Цитоплазматического хвоста US2 достаточно для взаимодействия с сигнальной пептидазой (SPP), а SPP является важным компонентом US2-зависимого дислокационного комплекса МНС I. Кроме того, US2 взаимодействует с резидентной в эндоплазматическом ретикулуме лигазой E3 RING-типа TRC8 через свой домен ТМ, что также способствует убиквитинированию и протеасомной деградации молекул МНС I и II, заякоренных в хвосте US2.

Напротив, для молекулярной деградации МНС-I, индуцированной US11, требуется Derlin1, а не SPP. Выходящий в просвет ЭР домен US11 взаимодействует с выходящим в просвет доменом тяжелой цепи МНС-I, тогда как домен ТМ US11 связывает Derlin-1. Следовательно, основная функция US11 может заключаться в доставке молекул МНС-I к

Derlin-1, а затем в индукции их транслокации в цитозоль для протеасомной деградации. Более того, US11 активирует развернутые белки. Через Derlin-1 US11 связывается с TMEH129 в качестве лигазы ERAD RING E3 и привлекает Ube2J2 для убиквитинирования МНС-I перед деградацией, индуцированной US11.

Вместо того, чтобы способствовать деградации белков МНС, гликопротеин US3 физически связывается с гетеродимерами МНС класса I, которые нагружены пептидами, так, что комплекс класса I остается в ЭР и ингибирует связывание инвариантных цепей с DR- $\alpha\beta$ -димерами класса II в ЭР, 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 выходящего в просвет домена US3 достаточно для того, чтобы US3 сохранялся в ЭР сам по себе, тогда как как выходящий в просвет, так и трансмембранный домены необходимы для удержания молекул МНС класса I в ЭР.

Помимо молекул МНС I, гликопротеины US2 и US3 ингибируют презентацию антигена класса II, разрушая или устраняя функцию белков класса II. US2 связывается с DR класса II и приводит к быстрой и эффективной протеасомной деградации только α -цепи II-подобных DR $\alpha\beta$ -комплексов. US2 также приводит к деградации α -цепи DM, которая представляет собой комплекс МНС II, необходимый для загрузки антигенных пептидов в комплексы DR класса II. Связывание US3 HCMV с гетеродимерами DR $\alpha\beta$ класса II ингибирует связывание инвариантных цепей (Ii), что приводит к внутриклеточной неправильной локализации и снижает пептидную нагрузку комплексов DR.

US10 HCMV кодирует гликопротеин эндоплазматического ретикулула, который также взаимодействует с молекулами, презентуемыми антигенами МНС класса I. US10 связывает свободные тяжелые цепи класса I и задерживает их транспорт из ЭР. Однако US10 не влияет на US2 или US11.

Продукт гена аденовируса E3max 19K (E19) также может удерживать молекулы класса I в секреторном пути и мешать презентации антигена. E19 также является гликопротеином, резидентным в эндоплазматическом ретикулуле, который может устранять транспорт на клеточной поверхности главного комплекса гистосовместимости класса I (МНС-I) и МНС-I-родственных цепей A и B (MICA/B). E3/19K включает три функциональных модуля: выходящий в просвет домен для взаимодействия с молекулами МНС-I и MICA/B, трансмембранный домен и дилизиновый мотив в цитоплазматическом

хвосте, который помогает возвращаться из аппарата Гольджи в ЭР. Исследования показали, что трансмембранный домен (TMD) и сигнал возврата в ЭР необходимы для обеспечения эффективной локализации в ЭР, ингибирования транспорта молекул МНС-I и МНС-A/B, а также протеасомной деградации.

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 ЭР и вызывает конформационные изменения, которые предотвращают связывание АТФ. Остатки 89–108 в домене US6, выходящем в просвет ЭР, способствуют связыванию US6 с TAP и одновременно необходимы и достаточны для этого ингибирования. Ингибирование активности TAP влияет не только на экспрессию классических аллелей МНС 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 сборки молекул 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 он 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.

α/β Т-лимфоциты распознают лиганды пептид-МНС посредством мультимерного белкового ансамбля, называемого комплексом CD3 и α/β Т-клеточного антигенного рецептора (TCR). Структура состоит из варибельного димера α/β TCR, который связывается с антигенами, и трех инвариантных димеров (CD3 γ ϵ , $\delta\epsilon$ и $\zeta\zeta$), включенных в TCR. Транспортировка CD3 на поверхность, стабилизация и передача сигнала. Рецепторы α/β Т-клеток (α/β TCR) экспрессируются на большинстве (примерно 95%) Т-клеток и играют ключевую роль в активации Т-клеток путем распознавания антигенов, заякоренных в

главном комплексе гистосовместимости (МНС). Таким образом, TCR-опосредованная активация Т-клеток является ключевой стадией патогенеза реакции трансплантат против хозяина (РТПХ) во время аллогенной трансплантации гемопоэтических клеток (алло-ТГК) и терапии аллогенными CAR-T-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 формирующихся донор-специфичных HLA-антител (dnDSA), которые играют важные роли как в остром, так и в хроническом отторжении трансплантированных Т-клеток. Следовательно, для создания универсальных Т-клеток для безопасной аллогенной инфузии и терапевтических целей целесообразно эффективно блокировать реакцию «трансплантат против хозяина» (РТПХ) путем генетического разрушения TCR. Кроме того, необходимо супрессировать экспрессию HLA на аллогенной Т-клетке, чтобы уменьшить отторжение иммунной системой реципиента аллогенных Т-клеточных TCR $\alpha\beta$ и/или HLA класса I аллогенных Т-клеток.

Следовательно, необходимо разработать новые способы клеточной терапии, чтобы преодолеть различия в опухолевых мишенях, иммуносупрессивной среде опухоли, источниках клеток для персонализированной терапии, преодолеть неспособность стандартизировать и масштабировать производство, а также преодолеть низкую эффективность уничтожения существующей клеточной терапии.

Сущность изобретения

Целью настоящего раскрытия является преодоление проблем, с которыми сталкивается существующая клеточная терапия опухолей, таких как разнообразие опухолевых мишеней, иммуносупрессивная среда опухоли, источник клеток для персонализированной терапии, невозможность стандартизации и крупномасштабного производства, низкая эффективность уничтожения и т.п. Одной из целей настоящего раскрытия является создание модуля универсальной Т (UT), который может использовать механизм ERAD для блокирования молекул TCR и МНС в ЭР, предотвращать его транспорт и способствовать его транслокации в цитоплазму к убиквитину и деградации через протеасому. Эта конструкция может быть нацелена на любой белок, включая

эндогенные или экзогенные белки, для эффективного ингибирования экспрессии и быстрой деградации в терапевтических целях.

Концепция модуля UT основана на открытии того, что вирусные гликопротеины, резидентные в ЭР, могут использовать регуляторные механизмы ERAD, чтобы ингибировать/блокировать сборку молекул МНС, транспортировать или способствовать их убиквитинированию и протеасомной деградации, тем самым ингибируя МНС-опосредованную презентацию вирусного антигена, чтобы избежать иммунного надзора. Эффективное подавление TCR будет значительно ингибировать TCR-опосредованную иммунную атаку и снижать РТПХ при аллогенной трансфузии Т-клеток. Включение естественного вирусного гликопротеина, резидентного в эндоплазматическом ретикулуме, может дополнительно ингибировать молекулы МНС, тем самым предотвращая презентацию пептида CD8⁺ Т-клеткам реципиента и ингибируя иммунное распознавание аллогенными Т-клетками. Таким образом, модуль UT может улучшить совместимость и долгосрочную персистенцию аллогенных Т-клеток после инфузии. Для целей клеточной терапии обычные Т-клетки с дефектной поверхностной экспрессией молекул $\alpha\beta$ TCR и МНС могут быть дополнительно генетически модифицированы для терапевтических целей.

Другая цель настоящего раскрытия заключается в обеспечении способа, в котором и-за введения НК-элементов, особенно оптимизированных рекомбинантных НК-элементов, Т-клетки становятся столь же эффективными, что и НК-клетки, при идентификации всех инфицированных вирусом клеток и опухолевых клеток, а также в котором из-за оптимизации элемента трансдукции CNK-Т клетки могут эффективно активироваться и убивать опухолевые клетки. Поскольку мишени НК, включая белки семейства, такие как MICA, MICB, ULBP1–6, могут широко экспрессироваться в различных опухолевых клетках и охватывать разные стадии прогрессирования опухоли, технология CNK может эффективно решить проблему нецелевого эффекта одиночной CAR-Т и исключить вероятность ускользания опухоли от иммунитета. Кроме того, химерный адаптер, введенный в конструкцию с помощью CNK, 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 клетки CNK-Т 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.

Настоящее раскрытие изменяет конструкцию вирусных элементов для направленного воздействия на молекулы TCR с целью достижения удержания и направленной деградации молекулы TCR в эндоплазматическом ретикулуме. Кроме того, в настоящем раскрытии также реализуется ингибирование экспрессии или направленной деградации молекул МНСI путем введения специфических вирусных элементов для трансформации универсальных Т-клеток.

В этом раскрытии подтверждено, что CNK-UT обладает возможностями идентификации и уничтожения опухолей широкого спектра. В этом раскрытии дополнительно разработаны комбинированные продукты CAR/CNK-UT для специфического направленного воздействия, демонстрирующие, 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, Т-клетки получают из здоровых доноров, чтобы реализовать стандартизацию и крупномасштабное производство продуктов CNK-UT, которые можно получить заранее, и обеспечить функцию Т-клеток по уничтожению и активации опухолевых клеток.

Краткое описание чертежей

На Фиг. 1 показаны четыре структуры многофункционального комплекса CNK-UT, при этом на Фиг. 1А показан базовый многофункциональный комплекс CNK-UT, на Фиг. 1В показан многофункциональный комплекс CNK-UT, дополнительно содержащий молекулярный домен связывающего белка, нацеленного на МНС I, на Фиг. 1С показан многофункциональный комплекс CNK-UT, дополнительно содержащий молекулярный домен связывающего белка, нацеленного на МНС I, и химерный адаптер, на Фиг. 1D показан многофункциональный комплекс CNK-UT, дополнительно содержащий молекулярный домен связывающего белка, нацеленного на МНС I, и рецептор, такой как CAR, TCR и т.п., которые нацелены на опухолевую клетку и уничтожают опухолевую клетку.

На Фиг. 2 показаны структуры четырех элементов CNK-UT, экспрессирующих многофункциональные комплексы CNK-UT. Как показано на Фиг. 2А, одиночный лентивирусный экспрессирующий вектор с промотором EF1 α способствует экспрессии одной комбинации элементов CNK-UT: DAP10-DAP12 ICD-T2A-NKG2D-p2A-анти-TCR-

AdE3 ERAD; как показано на Фиг. 2В, одиночный лентивирусный экспрессирующий вектор с промотором EF1 α способствует экспрессии одной комбинации элементов CNK-UT: DAP10-DAP12 ICD-T2A-NKG2D-p2A-анти-TCR-US2 ERAD; как показано на Фиг. 2С, один лентивирусный экспрессирующий вектор, использующий промоторы EF1 α и CMV, соответственно, регулирует мультигенную экспрессию DAP10-CD3 ζ -T2A-NKG2D-p2A-ant-TAA scFv-DAP10 и анти-TCR-AdE3 ERAD-E2A-AdE3, тем самым достигая экспрессии множества функциональных элементов CNK-UT с помощью одного вектора; как показано на Фиг. 2D, два разных лентивирусных экспрессирующих 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, путем совместной трансфекции Т-клеток можно достичь экспрессии множества функциональных элементов CNK-UT в одной Т-клетке.

На Фиг. 3 показаны результаты обнаружения проточной цитометрией базового фенотипа CNK-UT-клеток (DAP10-CD3 ζ -T2A-NKG2D-p2A-анти-TCR scFv-AdE3).

На Фиг. 4 показаны результаты распознавания и специфического уничтожения CNK-UT-клетками линии клеток аденомы ободочной кишки человека HT29, при этом на Фиг. 4А показана экспрессия различных белков-мишеней НК в клеточной линии аденомы ободочной кишки человека HT29, а на Фиг. 4В показано эффективное уничтожение HT29 и способность активации CNK-UT-клеток.

На Фиг. 5 показано распознавание и специфическое уничтожение клеток MDA-MB453 CNK-UT-клетками, при этом на Фиг. 5А показана экспрессия различных белков-мишеней для НК в клеточной линии трижды негативного рака молочной железы MDA-MB453, а на Фиг. 5В показано эффективное уничтожение клеток ТНР1 MDA-MB453 CNK-UT-клетками и их способность к активации.

На Фиг. 6 показано, что CNK-UT-клетки распознают и специфически уничтожают ТНР1, причем на Фиг. 6А показана экспрессия различных НК-мишеней в клетках острого миелолейкоза ТНР1; на Фиг. 6В показано эффективное уничтожение ТНР1 и способность CNK-UT-клеток к активации.

На Фиг. 7 показано, что CNK-UT-клетки могут модернизировать традиционные методы CAR-T для достижения улучшения способности к направленному уничтожению и активации. На Фиг. 7А показана экспрессия GPC3, PD-L1 и различных НК-мишеней на клетках гепатоцеллюлярной карциномы (ГЦК) HepG2. На Фиг. 7В показано, что CAR/CNK-UT-клетки демонстрируют более эффективное уничтожение клеток HepG2 и способность к активации, чем обычные CAR-T-клетки.

На Фиг. 8 показано, что CNK-UT-клетки могут модернизировать традиционные методы CAR-T для достижения направленного уничтожения опухолевых клеток с высокой

экспрессией PD-L1 и достижения способности к активации. На Фиг. 8А показана экспрессия GPC3, PD-L1 и различных NK-мишеней на клетках гепатоцеллюлярной карциномы (ГЦК) PLC. На Фиг. 8В показано более эффективное уничтожение клеток PLC CAR/CNK-UT-клетками и способность CAR/CNK-UT-клеток к активации, по сравнению с обычными CAR-T-клетками.

На Фиг. 9 показано, что GPC3 CAR/CNK-UT-клетки обладают более высокой способностью к устранению опухоли у мышей, чем GPC3 CAR-T-клетки.

На Фиг. 10 показано, что GPC3 CAR/CNK-UT-клетки обладают более высокой способностью к устранению опухоли у мышей, чем GPC3 CAR-T-клетки.

На Фиг. 11 показано, что GPC3 CAR/CNK-UT могут специфически распознавать и уничтожать клетку трижды негативного рака молочной железы MDA-MB453.

На Фиг. 12 показано, что GPC3 CAR/CNK-UT могут специфически распознавать и уничтожать клеточную линию острого миелолейкоза THP1.

На Фиг. 13 показано распознавание, специфическое уничтожение CNK-UT-клетками клеток почечно-клеточной карциномы 786-О и способность CNK-UT-клеток к активации.

На Фиг. 14 показано распознавание, специфическое уничтожение CNK-UT-клетками клеток почечно-клеточной карциномы ACHN и способность CNK-UT-клеток к активации.

На Фиг. 15 показано распознавание, специфическое уничтожение CNK-UT-клетками клеток легочной эпителиальной аденомы A549 и способность CNK-UT-клеток к активации.

На Фиг. 16 показано распознавание, специфическое уничтожение CNK-UT-клетками клеточной линии ОМЛ UL60 и способность CNK-UT-клеток к активации.

На Фиг. 17 показано распознавание, специфическое уничтожение CNK-UT-клетками клеточной линии ОМЛ U937 (приобретено у U937, артикул CL-0239) и способность CNK-UT-клеток к активации.

На Фиг. 18 показано распознавание, специфическое уничтожение CNK-UT-клетками клеточной линии ОМЛ U937 и способность CNK-UT-клеток к активации.

На Фиг. 19 показано распознавание, специфическое уничтожение CNK-UT-клетками клеточной линии рака поджелудочной железы PANC-1 (приобретенной у Pnoxil, артикул CL-0184) и способность CNK-UT-клеток к активации.

Подробное описание

В настоящем раскрытии, если не указано иное, научные и технические термины, используемые в этом раскрытии, имеют значение, обычно понятное специалистам в

данной области техники. Кроме того, термины, относящиеся к химии белков и нуклеиновых кислот, молекулярной биологии, культивированию клеток и тканей, микробиологии, иммунологии, и лабораторным процедурам, используемые в этом раскрытии, являются широко используемыми терминами и рутинными стадиями в соответствующих областях. Кроме того, чтобы лучше понять изобретение, ниже приведены определения и объяснения связанных терминов.

Термин «химерный рецептор натурального киллера» относится к композиции, содержащей химерный модуль рецептора активации НК и химерный модуль 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 рецептора активации НК, конструкции модуля передачи сигнала CNK и конструкции модуля UT.

Термин «CAR/CNK-UT» (универсальная Т-клетка с химерным антигенным рецептором и химерным рецептором натурального киллера (CNK-UT)), которая относится к Т-клетке, экспрессирующей структуру CAR, нацеленную на специфический опухолевый антиген, конструкцию модуля рецептора активации НК, конструкцию модуля передачи сигнала CNK и конструкцию модуля UT.

В настоящей заявке 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.

Используемый в данной заявке термин «антитело», используемый в данном раскрытии, относится к молекулам иммуноглобулина, которые специфически связываются с антигенами. Антитела могут представлять собой интактные иммуноглобулины, полученные из природных или рекомбинантных источников, и могут быть частью иммунного ответа интактных иммуноглобулинов. Антитела обычно представляют собой тетрамеры молекул иммуноглобулинов. Антитела по настоящему раскрытию могут существовать в различных формах, включая, например, поликлональные антитела, моноклональные антитела, Fv, Fab и F(ab), а также scFv и гуманизированные антитела.

В настоящей заявке термин «костимулирующий лиганд» включает молекулу на антигенпрезентирующей клетке (например, АПК, дендритной клетке, В-клетке и других иммунных клетках), которая специфически связывает когнатную костимулирующую молекулу на Т-клетке, тем самым обеспечивая сигнал, который, в дополнение к первичному сигналу, обеспечиваемому, например, связыванием комплекса TCR/CD3 с молекулой МНС, загруженной пептидом, опосредует Т-клеточный ответ, включая, без

ограничения указанным, пролиферацию, активацию, дифференцировку и т.п. 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 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. Костимулирующая молекула включает, без ограничения указанным, молекулу МНС класса I, BTLA, рецептор Toll-лиганда. Костимулирующая молекула также включает неприродный(ые) сконструированный(ые) белок(ки).

Термин «костимулирующий сигнал», используемый в данной заявке, 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» относится к первичному ответу, индуцированному связыванием стимулирующей молекулы (например, комплекса TCR/CD3) с его когнатным лигандом, тем самым опосредуя событие передачи сигнала, такое как, без ограничения указанным, передачу сигнала через комплекс TCR/CD3. Стимуляция может опосредовать измененную экспрессию определенных молекул, например, подавление TGF- β и/или реорганизацию структур цитоскелета и т.п.

В настоящей заявке термин «стимулирующая молекула» относится к молекуле на Т-клетке, которая специфически связывается с когнатным стимулирующим лигандом, присутствующим на антигенпрезентирующей клетке.

Термин «стимулирующий лиганд», используемый в настоящей заявке, относится к лиганду, который, будучи присутствующим на антигенпрезентирующей клетке (например, АПК, дендритной клетке, В-клетке и т.п.), может специфически связываться с когнатным партнером по связыванию (называемым 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 охватывают молекулу МНС класса I, нагруженную пептидом, анти-CD3-антитело, суперагонистическое анти-CD28-антитело и суперагонистическое анти-CD2-антитело.

Термин «носитель» представляет собой композицию материала, которая содержит выделенную нуклеиновую кислоту и может использоваться для доставки выделенной нуклеиновой кислоты внутрь клетки. В данной области известны многочисленные векторы, включая, без ограничения указанным, линейные полинуклеотиды, полинуклеотиды, связанные с ионными или амфотерными соединениями, плазмиды и вирусы. Следовательно, термин «вектор» включает автономную репликацию плазмид или вирусов. Этот термин также следует интерпретировать как включающий не-плазмиды и невирусные соединения, которые облегчают перенос нуклеиновых кислот в клетки, такие как соединения полилизина, липосомы и т.п. Примеры вирусных векторов включают, без ограничения указанным, лентивирусы, аденовирусные векторы, аденоассоциированные вирусные векторы, ретровирусные векторы и т.п. Примеры невирусных векторов включают, без ограничения указанным, векторные системы CRISPR, транспозонные системы «Sleeping Beauty» и т.п. «Активация» при использовании в настоящей заявке, относится к состоянию Т-клетки, которая была достаточно стимулирована для индукции детектируемой клеточной пролиферации. Активация также может быть связана с индуцированной продукцией цитокинов и детектируемыми эффекторными функциями. Термин «активированные Т-клетки» относится, в частности, к Т-клеткам, которые совершают клеточное деление.

В одном аспекте в настоящем раскрытии предлагается многофункциональный комплекс, включающий следующие модули:

(1) модуль рецептора, активирующего НК, содержащий по меньшей мере рецептор активации НК-клеток или его функциональный вариант, причем рецептор активации НК-клеток содержит: (а) внеклеточный домен (ED) рецептора активации НК-клеток или его функциональный вариант, (b) трансмембранный домен (TMD) рецептора активации НК-клеток или его функциональный вариант, и (с) внутриклеточный домен (ICD) рецептора активации НК-клеток или его функциональный вариант; и необязательно между внеклеточным доменом рецептора активации НК-клеток или его функциональным вариантом, трансмембранным доменом рецептора активации НК-клеток или его функциональным вариантом и/или внутриклеточным доменом рецептора активации НК-клеток или его функциональным вариантом включен шарнир или линкер;

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

(3) модуль UT, содержащий по меньшей мере (i) молекулу рекомбинантного белка для направленной деградации TCR, MHC и/или мишеней NK-клетки, или ее функциональный вариант, причем молекула рекомбинантного белка для направленной деградации TCR, MHC и/или мишени NK-клетки, включает: (a) молекулярный домен связывающего белка, нацеленного на TCR, MHC и/или мишени NK-клетки, или его функциональный вариант, (b) трансмембранный домен вирусного гликопротеина, резидентного в эндоплазматическом ретикулуме (ЭР), или его функциональный вариант и (c) цитоплазматический домен вирусного гликопротеина, резидентного в эндоплазматическом ретикулуме (ЭР), 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 образуют домен деградации ERAD; необязательно, молекулярный домен связывающего белка, нацеленного на TCR, или его функциональный вариант, трансмембранный домен вирусного гликопротеина, резидентного в эндоплазматическом ретикулуме, или его функциональный вариант и/или цитоплазматический домен вирусного гликопротеина, резидентного в эндоплазматическом ретикулуме, или его функциональный вариант содержат шарнир или линкер.

Необязательно, шарниры или линкеры включены между модулем рецептора, активирующего NK, модулем передачи сигнала CNK и/или модулем UT.

В некоторых воплощениях рецептор активации NK-клеток в модуле рецептора, активирующего NK, выбран из группы, состоящей из NKG2D, NKG2C, NKG2E, NKG2F, NKG2H, CD94, KIR2DL4, KIR2DS1, KIR2DS2, KIR2DS4, KIR3DS1, натуральных цитотоксических рецепторов, TRAIL, DNAM-1, CD16a, 2B4, NTB-A, CRACC и NKp80; предпочтительно натуральные цитотоксические рецепторы выбирают из группы,

состоящей из NKp46, NKp44 и NKp30.

В некоторых предпочтительных воплощениях рецептор активации NK-клеток представляет собой рецептор активации NK-клеток из 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 активации NK-клеток представляет собой рекомбинантный рецептор активации NK-клеток, содержащий различные исходные домены рецептора активации NK-клеток.

В некоторых предпочтительных воплощениях рецептор активации NK-клеток представляет собой рецептор активации NK-клеток человека; и предпочтительно, рецептор активации NK-клеток представляет собой рекомбинантный рецептор активации NK-клеток, содержащий различные домены рецептора активации NK-клеток человека.

В некоторых предпочтительных воплощениях рецептор активации NK-клеток представляет собой рецептор активации NK-клеток мыши; и предпочтительно, рецептор активации NK-клеток представляет собой рекомбинантный рецептор активации NK-клеток, содержащий различные домены рецептора активации NK-клеток мыши.

В некоторых предпочтительных воплощениях рецептор активации NK-клеток представляет собой рекомбинантный рецептор активации NK-клеток, содержащий домен рецептора активации NK-клеток человека и домен рецептора активации NK-клеток мыши.

В некоторых предпочтительных воплощениях внеклеточный домен рецептора активации NK-клеток представляет собой внеклеточный домен рецептора активации NK-клеток человека или мыши.

В некоторых предпочтительных воплощениях внеклеточный домен рецептора активации NK-клеток представляет собой внеклеточный домен рецептора активации NK-клеток человека или мыши.

В некоторых предпочтительных воплощениях внеклеточный домен рецептора активации NK-клеток представляет собой внеклеточный домен рецептора активации NK-клеток человека или мыши.

В некоторых предпочтительных воплощениях функциональный вариант рецептора активации NK-клеток выбран из группы, состоящей из мутанта рецептора активации NK-клеток, гибрида белка дикого типа или гибрида белка дикого типа и мутантного белка.

В некоторых предпочтительных воплощениях внеклеточный домен NKG2D мыши включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 1, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%,

98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность внеклеточного домена NKG2D мыши показана как SEQ ID NO: 1.

В некоторых предпочтительных воплощениях полноразмерная последовательность NKG2D человека включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 2, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность полноразмерной последовательности NKG2D человека показана как SEQ ID NO: 2.

В некоторых предпочтительных воплощениях внеклеточный домен NKG2D мыши включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 3, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность внеклеточного домена NKG2D мыши показана как SEQ ID NO: 3.

В некоторых предпочтительных воплощениях полноразмерная последовательность NKG2D мыши включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 4, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность полноразмерной последовательности NKG2D мыши показана как SEQ ID NO: 4.

В некоторых предпочтительных воплощениях полноразмерная последовательность рекомбинантного NKG2D человека и мыши включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 5, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность полноразмерной последовательности рекомбинантного NKG2D человека и мыши показана как SEQ ID NO: 5.

идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность полноразмерной последовательности CRACC человека показана как SEQ ID NO: 23.

В некоторых предпочтительных воплощениях полноразмерная последовательность NKp80 человека включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 24, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность полноразмерной последовательности NKp80 человека показана как SEQ ID NO: 24.

В некоторых воплощениях сигнальный адаптер NK-клетки в модуле передачи сигнала CNK представляет собой DAP10 или DAP12.

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

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

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

В некоторых предпочтительных воплощениях сигнальный адаптер NK-клетки представляет собой мышинный сигнальный адаптер NK-клетки; предпочтительно сигнальный адаптер NK-клетки представляет собой рекомбинантный сигнальный адаптер NK-клетки, содержащий различные домены мышинового сигнального адаптера NK-клетки.

В некоторых предпочтительных воплощениях сигнальный адаптер NK-клетки представляет собой рекомбинантный сигнальный адаптер NK-клетки, содержащий домены сигнального адаптера NK-клетки человека и мыши.

В некоторых предпочтительных воплощениях внеклеточный домен сигнального адаптера NK-клетки представляет собой внеклеточный домен сигнального адаптера NK-клетки человека или мыши.

В некоторых предпочтительных воплощениях трансмембранный домен сигнального адаптера NK-клетки представляет собой трансмембранный домен сигнального адаптера NK-клетки человека или мыши.

В некоторых предпочтительных воплощениях внутриклеточный домен сигнального адаптера NK-клетки представляет собой внутриклеточный домен сигнального адаптера NK-клетки человека или мыши.

В некоторых предпочтительных воплощениях функциональный вариант сигнального адаптера клетки CNK выбран из мутанта DAP10 или DAP12, или гибридного белка DAP10 и DAP12, или DAP10 дикого типа или гибридного белка DAP12 с мутантным типом DAP10 или DAP12.

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

В некоторых предпочтительных воплощениях шарнир или линкер включен между сигнальным адаптером NK-клетки или его функциональным вариантом, доменом передачи сигнала активации иммунного рецептора (ITAM) и/или костимулирующим доменом передачи сигнала Т-клеток; предпочтительно сигнальный адаптер NK-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 внутриклеточного домена передачи 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 сигнала NK-клетки или его функциональным вариантом; и предпочтительно иммунный рецептор представляет собой CD3 ζ .

В некоторых предпочтительных воплощениях костимулирующий домен передачи сигнала Т-клеток получен из внутриклеточного домена передачи сигнала костимулирующей молекулы; предпочтительно костимулирующие молекулы выбраны из группы, состоящей из молекул MHC 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, 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 (Tactile), 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, TCR α , TCR β , TRIM, ZAP70 и PTCH2.

В некоторых предпочтительных воплощениях полноразмерная последовательность DAP10 человека включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 25, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность полноразмерной последовательности DAP10 человека показана как SEQ ID NO: 25.

В некоторых предпочтительных воплощениях полноразмерная последовательность DAP10 человека включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 26, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность полноразмерной последовательности DAP10 человека показана как SEQ ID NO: 26.

В некоторых предпочтительных воплощениях внеклеточный домен DAP10 мыши включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 27, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность внеклеточного домена DAP10 мыши показана как SEQ ID NO: 27.

В некоторых предпочтительных воплощениях полноразмерная последовательность DAP12 человека включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 28, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность полноразмерной последовательности DAP12 человека показана как SEQ ID NO: 28.

В некоторых предпочтительных воплощениях трансмембранный домен DAP12 человека включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 29, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность трансмембранного домена DAP12 человека показана как SEQ ID NO: 29.

В некоторых предпочтительных воплощениях гибридный белок трансмембранных доменов DAP10 человека и DAP12 человека включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 30, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, и более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность трансмембранных доменов DAP10 человека и DAP12 человека показана как SEQ ID NO: 30.

В некоторых предпочтительных воплощениях последовательность гибридного белка DAP10-DAP12 человека включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 31, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность гибридного белка DAP10-DAP12 человека показана как SEQ ID NO: 31.

В некоторых предпочтительных воплощениях последовательность внутриклеточного домена передачи сигнала CD3-дзета человека включает

аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 32, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность внутриклеточного домена передачи сигнала CD3-дзета человека показана как SEQ ID NO: 32.

В некоторых предпочтительных воплощениях последовательность DAP10-CD3-дзета человека включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 33, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность последовательности DAP10-CD3-дзета показана как SEQ ID NO: 33.

В некоторых предпочтительных воплощениях последовательность DAP12-CD3-дзета человека включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 34, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность последовательности DAP12-CD3-дзета человека показана как SEQ ID NO: 34.

В некоторых предпочтительных воплощениях последовательность DAP10-DAP12-CD3-дзета человека включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 35, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90 %, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность последовательности DAP10-DAP12-CD3-дзета показана как SEQ ID NO: 35.

В некоторых предпочтительных воплощениях последовательность внутриклеточного домена передачи сигнала из 41BB человека включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 36, предпочтительно аминокислотную

последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность внутриклеточного домена передачи сигнала из 41BB человека показана как SEQ ID NO: 36.

В некоторых предпочтительных воплощениях последовательность DAP10-41BB человека включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 37, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность полноразмерной последовательности DAP10-41BB человека показана как SEQ ID NO: 37.

В некоторых предпочтительных воплощениях последовательность DAP10-41BB-CD3-дзета человека включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 38, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90 %, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность DAP10-41BB-CD3-дзета показана как SEQ ID NO: 38.

В некоторых предпочтительных воплощениях последовательность внутриклеточного домена передачи сигнала CD28 человека включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 39, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность внутриклеточного домена передачи сигнала CD28 человека показана как SEQ ID NO: 39.

В некоторых предпочтительных воплощениях последовательность DAP10-CD28 человека включает аминокислотную последовательность, имеющую 80% или более идентичности с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 40, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом

аминокислотная последовательность последовательности DAP10-CD28 показана как SEQ ID NO: 40.

В некоторых предпочтительных воплощениях последовательность DAP10-CD28-CD3-дзета человека включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 41, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90 %, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность последовательности DAP10-CD28-CD3-дзета показана как SEQ ID NO: 41.

В некоторых предпочтительных воплощениях последовательность DAP12-41BB человека включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 42, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность последовательности DAP12-41BB человека показана как SEQ ID NO: 42.

В некоторых предпочтительных воплощениях последовательность DAP12-41BB-CD3-дзета человека включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 43, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90 %, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность последовательности DAP12-41BB-CD3-дзета показана как SEQ ID NO: 43.

В некоторых предпочтительных воплощениях последовательность DAP12-CD28 человека включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 44, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность последовательности DAP12-CD28 показана как SEQ ID NO: 44.

В некоторых предпочтительных воплощениях последовательность DAP12-CD28-

CD3-дзета человека включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 45, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90 %, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность последовательности DAP12-CD28-CD3-дзета показана как SEQ ID NO: 45.

В молекуле рекомбинантного белка для направленной деградации TCR, содержащейся в модуле UT, молекулярный домен связывающего белка, нацеленного 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 группы, состоящей 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 фрагмент антитела выбран из группы, состоящей из Fd, Fv, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv(scFv), одноцепочечного антитела (scFv) или нанотела (нанотела), диатела, тритела и квадратела; предпочтительно антитело к TCR представляет собой одноцепочечное антитело к TCR; предпочтительно, аминокислотная последовательность одноцепочечного антитела к TCR включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 116, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85% или 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более, более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность полноразмерной последовательности одноцепочечного антитела-TCR показана как SEQ ID NO: 116.

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

В некоторых предпочтительных воплощениях полноразмерная последовательность гликопротеина US2 HCMV включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 46, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность полноразмерной

последовательности гликопротеина US2 HCMV показана как SEQ ID NO: 46.

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

В некоторых предпочтительных воплощениях домен деградации ERAD гликопротеина US2 HCMV включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 48, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность домена деградации ERAD гликопротеина US2 HCMV показана как SEQ ID NO: 48.

В некоторых предпочтительных воплощениях полноразмерная последовательность гликопротеина US3 HCMV включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 49, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность полноразмерной последовательности гликопротеина US3 HCMV показана как SEQ ID NO: 49.

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

В некоторых предпочтительных воплощениях домен деградации ERAD гликопротеина US3 HCMV включает аминокислотную последовательность, имеющую

идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 51, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность домена деградации ERAD гликопротеина US3 HCMV показана как SEQ ID NO: 51.

В некоторых предпочтительных воплощениях полноразмерная последовательность гликопротеина US11 HCMV включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 52, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность полноразмерной последовательности гликопротеина US11 HCMV показана как SEQ ID NO: 52.

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

В некоторых предпочтительных воплощениях домен деградации ERAD гликопротеина US11 HCMV включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 54, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность домена деградации ERAD гликопротеина US11 HCMV показана как SEQ ID NO: 54.

В некоторых предпочтительных воплощениях полноразмерная последовательность гликопротеина US10 HCMV включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 55, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более

предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность полноразмерной последовательности гликопротеина US10 HCMV показана как SEQ ID NO: 55.

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

В некоторых предпочтительных воплощениях домен деградации ERAD гликопротеина US10 HCMV включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 57, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность домена деградации ERAD гликопротеина US10 HCMV показана как SEQ ID NO: 57.

В некоторых предпочтительных воплощениях полноразмерная последовательность E3-19K аденовируса включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 58, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность полноразмерной последовательности E3-19K аденовируса показана как SEQ ID NO: 58.

В некоторых предпочтительных воплощениях MHC-связывающий домен E3-19K аденовируса включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 59, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность MHC-связывающего домена E3-19K аденовируса показана как SEQ ID NO: 59.

В некоторых предпочтительных воплощениях домен деградации ERAD E3-19K аденовируса включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 60, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность домена деградации ERAD E3-19K аденовируса показана как SEQ ID NO: 60.

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

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

В некоторых предпочтительных воплощениях домен деградации ERAD из HHV-7US21 включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 63, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность домена деградации ERAD из HHV-7US21 показана как SEQ ID NO: 63.

В некоторых воплощениях модуль UT дополнительно содержит (ii) молекулярный домен связывающего белка, нацеленного на МНС I и/или МНС II или его функциональный вариант.

В некоторых предпочтительных воплощениях молекулярный домен связывающего белка, нацеленного на МНС I и/или МНС II или его функциональный вариант, представляет собой молекулярный домен связывающего белка или его функциональный вариант, нацеленный на HLA.

В некоторых предпочтительных воплощениях молекулярный домен связывающего белка, нацеленного на МНС I и/или МНС II или его функциональный вариант, дополнительно происходит из вирусного белка, резидентного в эндоплазматическом ретикулуме, который ингибирует экспрессию молекулы МНС или способствует ее деградации; предпочтительно вирусный гликопротеин эндоплазматического ретикулума выбран из группы, состоящей из US6 HCMV, ICP47 HSV, CPXV012, E6/E7 HPV, BNFL2a EBV или UL49.5 BHV; предпочтительно, молекулярный домен связывающего белка, нацеленного на МНС I и/или МНС II, или его функциональный вариант, содержит TAP-связывающий домен.

В некоторых предпочтительных воплощениях полноразмерная последовательность US6 HCMV включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 64, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность полноразмерной последовательности US6 HCMV показана как SEQ ID NO: 64.

В некоторых предпочтительных воплощениях TAP-связывающий домен HHV-7US6 включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 65, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность TAP-связывающего домена HHV-7US6 показана как SEQ ID NO: 65.

В некоторых предпочтительных воплощениях полноразмерная последовательность ICP47 HSV включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 66, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность полноразмерной последовательности ICP47 HSV

показана как SEQ ID NO: 66.

В некоторых предпочтительных воплощениях TAP-связывающий домен ICP47 HSV включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 67, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90 %, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность TAP-связывающего домена ICP47 HSV показана как SEQ ID NO: 67.

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

В некоторых предпочтительных воплощениях TAP-связывающий домен CPXV012 включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 69, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность TAP-связывающего домена CPXV012 показана как SEQ ID NO: 69.

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

В некоторых предпочтительных воплощениях TAP-связывающий домен BNFL2a EBV включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 71,

предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность TAP-связывающего домена BNFL2a EBV показана как SEQ ID NO: 71.

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

В некоторых предпочтительных воплощениях TAP-связывающий домен UL49.5 BHV включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 73, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность TAP-связывающего домена UL49.5 BHV показана как SEQ ID NO: 73.

В некоторых предпочтительных воплощениях белок-связывающий молекулярный домен, нацеленный на МНС I и/или МНС II, или его функциональный вариант, получен из вирусных гликопротеинов, которые приводят к деградации молекул МНС и/или МНС II; предпочтительно вирусные гликопротеины выбраны из гликопротеинов US2, US3, US11 или US10 из HCMV, E3-19K аденовируса или US21 HHV-7.

В некоторых предпочтительных воплощениях полноразмерная последовательность US2 включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 74, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность полноразмерной последовательности US2 показана как SEQ ID NO: 74.

В некоторых предпочтительных воплощениях HLA-связывающий домен US2

включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 75, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность HLA-связывающего домена US2 показана как SEQ ID NO: 75.

В некоторых предпочтительных воплощениях домен деградации ERAD US2 включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 76, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность домена деградации ERAD US2 показана как SEQ ID NO: 76.

В некоторых предпочтительных воплощениях полноразмерная последовательность US3 включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 77, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность полноразмерной последовательности US3 показана как SEQ ID NO: 77.

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

В некоторых предпочтительных воплощениях домен деградации ERAD US3 включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 79, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность домена деградации ERAD US3 показана как SEQ ID NO: 79.

В некоторых предпочтительных воплощениях полноразмерная последовательность US11 включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 80, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность полноразмерной последовательности US11 показана как SEQ ID NO:80.

В некоторых предпочтительных воплощениях HLA-связывающий домен US11 включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 81, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность HLA-связывающего домена US11 показана как SEQ ID NO: 81.

В некоторых предпочтительных воплощениях домен деградации ERAD US11 включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 82, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность домена деградации ERAD US11 показана как SEQ ID NO: 82.

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

В некоторых предпочтительных воплощениях полноразмерная последовательность UL16 HCMV включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 83, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность полноразмерной последовательности UL16 HCMV

показана как SEQ ID NO: 83.

В некоторых предпочтительных воплощениях домен связывания белка-мишени NK UL16 HCMV включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 84, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность домена связывания белка-мишени NK UL16 HCMV показана как SEQ ID NO: 84.

В некоторых предпочтительных воплощениях домен деградации ERAD из UL16 HCMV включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 85, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность домена деградации ERAD из UL16 HCMV показана как SEQ ID NO: 85.

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

В некоторых предпочтительных воплощениях домен связывания белка-мишени NK из UL141 HCMV включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 87, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность домена связывания белка-мишени NK из UL141 HCMV показана как SEQ ID NO: 87.

В некоторых предпочтительных воплощениях домен деградации ERAD из UL141 HCMV включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или

более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 88, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность домена деградации ERAD из UL141 HCMV показана как SEQ ID NO: 88.

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

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

В некоторых предпочтительных воплощениях домен для локализации в Гольджи из UL142 HCMV включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 91, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность домена для локализации в Гольджи из UL142 HCMV показана как SEQ ID NO: 91.

В некоторых предпочтительных воплощениях молекулярный домен связывающего белка, нацеленного на MHC I и/или MHC II или его функциональные варианты, дополнительно включает вирусный белок, который транспортирует молекулы MHC 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 р12 HTLV-1 включает аминокислотную последовательность, имеющую 80% или более идентичности с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 97, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность р12 HTLV-1 показана как SEQ ID NO: 97.

В некоторых предпочтительных воплощениях молекулярный домен связывающего белка, нацеленного на МНС I и/или МНС II или его функциональный вариант, 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 оспы коров.

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

В некоторых предпочтительных воплощениях МНС-связывающий домен белка CPXV203 вируса оспы коров включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 99, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность МНС-связывающего домена белка CPXV203 вируса оспы коров показана как SEQ ID NO: 99.

В некоторых предпочтительных воплощениях домен, связывающий рецептор KDEL, белка CPXV203 вируса оспы коров включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 100, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%

или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность домена, связывающего рецептор KDEL, белка CPXV203 вируса оспы коров показана как SEQ ID NO: 100.

В некоторых предпочтительных воплощениях полноразмерная последовательность белка CPXV203 вируса оспы коров включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 101, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность полноразмерной последовательности белка CPXV203 вируса оспы коров показана как SEQ ID NO: 101.

В некоторых предпочтительных воплощениях МНС-связывающий домен белка CPXV203 вируса оспы коров включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 102, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность МНС-связывающего домена белка CPXV203 вируса оспы коров показана как SEQ ID NO: 102.

В некоторых предпочтительных воплощениях домен, связывающий рецептор KDEL, белка CPXV203 вируса оспы коров включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 103, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность домена, связывающего рецептор KDEL, белка CPXV203 вируса оспы коров показана как SEQ ID NO: 103.

В некоторых воплощениях многофункциональный комплекс дополнительно содержит (4) модуль химерного адаптера и/или рецепторный модуль с направленной активностью уничтожения в отношении опухолевых клеток;

(4) Модуль химерного адаптера содержит: (i) внеклеточный домен распознавания, нацеленный на опухоль, (ii) трансмембранный домен и (iii) внутриклеточный домен передачи сигнала. Необязательно, шарниры или линкеры включаются между

внеклеточным доменом распознавания, нацеленным на опухоль, трансмембранным доменом и/или доменом внутриклеточной передачи сигнала.

Предпочтительно, внеклеточный домен распознавания, нацеленный на опухоль, из модуля химерного адаптера, выбран из группы, состоящей из антиген-специфического связывающего домена опухолевого антигена, антигенсвязывающего домена-мишени для опухолевого микроокружения и/или хемокинового рецептора, нацеленного на микроокружение опухоли.

В некоторых предпочтительных воплощениях внеклеточный домен распознавания, нацеленный на опухоль, выбран из группы, состоящей из антитела, способного нацеливаться на опухолеассоциированный антиген или его функциональный фрагмент, TCR или их комбинацию. Функциональный фрагмент антитела выбран из группы, состоящей из Fd, Fv, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv (scFv), одноцепочечного антитела (scFv) или нанотела, двухцепочечного антитела, трехцепочечного антитела и четырехцепочечного антитела.

В некоторых предпочтительных воплощениях трансмембранный домен модуля химерного адаптера выбран из группы, состоящей из трансмембранного домена рецептора активации NK-клеток, 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; предпочтительно рецептор активации NK-клеток 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; предпочтительно натуральный цитотоксический рецептор выбирают из группы, состоящей из Nkp46, Nkp44 и Nkp30.

В некоторых предпочтительных воплощениях внутриклеточный сигнальный домен модуля химерного адаптера включает внутриклеточный домен передачи сигнала рецептора активации NK-клеток и/или костимулирующий домен передачи сигнала.

В некоторых предпочтительных воплощениях рецептор активации NK-клеток 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.

В некоторых предпочтительных воплощениях внутриклеточный сигнальный домен

дополнительно содержит костимулирующий домен передачи сигнала; предпочтительно костимулирующий домен передачи сигнала выбран из группы, состоящей из костимулирующего домена передачи сигнала Т-клеток, включающего, без ограничения указанным, внутриклеточный сигнальный домен, полученный из молекул МНСI, белков рецептора TNF, иммуноглобулиноподобных белков, рецепторы цитокинов, белков интегринов, сигнальных молекул активации лимфоцитов (белков SLAM), активированных рецепторов NK-клеток, BTLA, рецепторов Toll- лигандов, 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, TPAHC/ RANKL, DNAM1(CD226), SLAMF4(CD244, 2B4), CD84, CD96(Tactile), 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, костимулирующий домен передачи сигнала выбран из группы, состоящей из внутриклеточного домена передачи сигнала NKG2D, внутриклеточного домена передачи сигнала DAP10, внутриклеточного домена передачи сигнала DAP12, внутриклеточного домена передачи сигнала NCR, внутриклеточного домена передачи сигнала CD28, внутриклеточного домена передачи сигнала 4-1BB, внутриклеточного домена передачи сигнала OX40 и внутриклеточного домена передачи сигнала ICOS;

рецепторный модуль с направленной активностью уничтожения в отношении опухолевых клеток включает: (i) внеклеточный домен распознавания, нацеленный на опухолевый антиген; (ii) трансмембранный домен; и (iii) внутриклеточный костимулирующий домен передачи сигнала; (iv) домен передачи сигнала активации Т-клеток (ITAM); необязательно, шарнир или линкер включен между внеклеточным доменом распознавания, 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 активностью

уничтожения 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 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 других внутриклеточных доменов передачи сигнала.

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 линкер представляет собой шарнир; предпочтительно шарнир представляет собой шарнир IgG1 или шарнир IgG4.

В некоторых предпочтительных воплощениях шарнир IgG1 включает аминокислотную последовательность, имеющую 80% или более идентичности с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 106, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность шарнира IgG1 показана как SEQ ID NO: 106.

В некоторых предпочтительных воплощениях шарнир IgG4 включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 107, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность,

имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность шарнира IgG4 показана как SEQ ID NO: 107.

В некоторых предпочтительных воплощениях расщепляемый пептид входит в состав модуля рецептора активации NK, модуля передачи сигнала CNK и/или модуля 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, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 108, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, и более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность T2A показана как SEQ ID NO: 108.

В некоторых предпочтительных воплощениях аминокислотная последовательность пептида GSG-T2A показана в SEQ ID NO109.

В некоторых предпочтительных воплощениях P2A включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 110, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, и более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность P2A 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, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 112, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, и более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом 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, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной

последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 114, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, и более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность F2A показана как SEQ ID NO: 114.

В некоторых предпочтительных воплощениях аминокислотная последовательность пептида GSG-P2A показана в SEQ ID NO: 115.

В некоторых предпочтительных воплощениях многофункциональный комплекс включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 116, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность многофункционального комплекса включает одноцепочечное антитело к TCR, как показано в SEQ ID NO: 116.

В некоторых предпочтительных воплощениях многофункциональный комплекс включает аминокислотную последовательность, имеющую 80% или более идентичности с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 117, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность многофункционального комплекса показана как SEQ ID NO: 117.

В некоторых предпочтительных воплощениях многофункциональный комплекс включает аминокислотную последовательность, имеющую 80% или более идентичности с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 121, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность многофункционального комплекса показана как SEQ ID NO: 121.

В некоторых предпочтительных воплощениях многофункциональный комплекс включает аминокислотную последовательность, имеющую 80% или более идентичности с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 123, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%,

ID NO: 128.

В некоторых предпочтительных воплощениях многофункциональный комплекс включает аминокислотную последовательность, имеющую 80% или более идентичности с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 129, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность многофункционального комплекса показана как SEQ ID NO: 129.

В некоторых предпочтительных воплощениях многофункциональный комплекс включает аминокислотную последовательность, имеющую 80% или более идентичности с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 130, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность многофункционального комплекса показана как SEQ ID NO: 130.

В некоторых предпочтительных воплощениях многофункциональный комплекс включает аминокислотную последовательность, имеющую 80% или более идентичности с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 131, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность многофункционального комплекса показана как SEQ ID NO: 131.

В одном отношении в настоящем раскрытии предлагается молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую любой из упомянутых выше многофункциональных комплексов.

В некоторых предпочтительных воплощениях молекула нуклеиновой кислоты представляет собой ДНК или РНК.

В некоторых предпочтительных воплощениях РНК представляет собой мРНК.

В некоторых предпочтительных воплощениях молекула нуклеиновой кислоты включает нуклеотидную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с нуклеотидной последовательностью, представленной 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; при этом нуклеотидная последовательность молекулы нуклеиновой кислоты показана как SEQ ID NO: 118.

В некоторых предпочтительных воплощениях молекула нуклеиновой кислоты включает нуклеотидную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 122, 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; при этом нуклеотидная последовательность молекулы нуклеиновой кислоты показана как SEQ ID NO: 122.

В некоторых предпочтительных воплощениях молекула нуклеиновой кислоты включает нуклеотидную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 124, 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; при этом нуклеотидная последовательность молекулы нуклеиновой кислоты показана как SEQ ID NO: 124.

В одном отношении в настоящем раскрытии предлагается экспрессирующий вектор, содержащий упомянутую выше молекулу нуклеиновой кислоты.

В некоторых предпочтительных воплощениях вектор выбирают из группы, состоящей из: плазмиды, космиды, вирусного вектора, РНК-вектора или линейных или кольцевых молекул ДНК или РНК;

В некоторых предпочтительных воплощениях вирусный вектор выбран из группы, состоящей из: ретровируса, аденовируса, парвовируса (например, аденоассоциированного вируса), 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 малые РНК-вирусы, альфавируса и вируса с двухцепочечной ДНК, где вирус с двухцепочечной ДНК включает аденовирус, герпесвируса (например, вирус простого герпеса типов 1 и 2, вирус Эпштейна-Барр, цитомегаловирус) и вируса оспы (например, вируса осповакцины, вируса оспы домашней птицы и вируса оспы канареек), вируса Норуолка, тогавируса, флавивируса, реовируса, паповавируса, гепаднавируса, бакуловируса и вируса гепатита.

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

В некоторых предпочтительных воплощениях модуль рецептора, активирующего НК, модуль передачи сигнала CNK и/или модуль UT могут регулировать экспрессию под одним и тем же промотором одного и того же вектора, или под разными промоторами, или во множестве векторов.

В некоторых предпочтительных воплощениях вектор представляет собой лентивирусный вектор, ген, кодирующий расщепляемый пептид, включен между геном, кодирующим модуль рецептора, активирующего НК, модуль передачи сигнала CNK и/или модуль UT; предпочтительно расщепляемый пептид представляет собой линкер 2A; линкер 2A выбран из T2A, P2A, E2A и F2A.

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

В одном отношении в настоящем раскрытии предлагается иммунная клетка, содержащая упомянутую выше нуклеиновую кислоту или экспрессирующий вектор.

В некоторых предпочтительных воплощениях иммунная клетка выбрана из группы, состоящей из Т-клетки, НКТ-клетки, НК-клетки, В-клетки, моноцита, макрофага и т.п.

В одном отношении в настоящем раскрытии предлагается способ получения иммунных клеток, включающий введение нуклеиновой кислоты или экспрессирующего вектора, описанного в настоящей заявке, в клетки способами, выбранными из следующих: электропорация, акустическая перфорация, генная пушка (например, генная пушка с частицами золота), липидная трансфекция, полимерная трансфекция, наночастицы или полимерные комплексы.

В одном аспекте в настоящем раскрытии предлагается фармацевтическая композиция, содержащая многофункциональный комплекс, нуклеиновую кислоту, экспрессирующий вектор, иммунную клетку и/или иммунную клетку, полученную способом, описанным в настоящей заявке, и фармацевтически приемлемые носители.

В одном аспекте в настоящем раскрытии предлагается применение многофункционального комплекса, нуклеиновой кислоты, экспрессирующего вектора, иммунной клетки, иммунной клетки, полученной способом, и/или фармацевтически приемлемых носителей, описанных в настоящей заявке, при производстве лекарственного средства для лечения заболеваний.

В одном аспекте в настоящем раскрытии предлагается способ лечения заболеваний,

включающий введение субъекту многофункционального комплекса, нуклеиновой кислоты, экспрессирующего вектора, иммунной клетки и/или фармацевтической композиции.

В некоторых предпочтительных воплощениях заболевания включают различные солидные опухоли и гематологические опухоли, вирусные инфекционные заболевания, аутоиммунные заболевания.

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 яичка, 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.п.

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

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 (НЛ), множественной миеломы (ММ), 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 некоторых предпочтительных 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 предпочтительных воплощениях респираторные вирусные заболевания включают инфекции риновируса, аденовируса, респираторно-синцитиального вируса, вируса парагриппа и коронавируса; грипп; свинку и т.п.

В некоторых предпочтительных 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 предпочтительных воплощениях 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.

В некоторых предпочтительных воплощениях 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.

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

В некоторых предпочтительных 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 предпочтительных воплощениях лимфоцитарные вирусные заболевания включают инфекционный мононуклеоз, цитомегаловирусную инфекцию и синдром приобретенного иммунодефицита и т.п.

В некоторых предпочтительных 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 предпочтительных 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 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 предпочтительных 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 одном аспекте в настоящем раскрытии предлагается способ стимулирования

иммунного ответа у субъектов, включающий введение субъекту эффективного количества многофункционального комплекса, нуклеиновой кислоты, экспрессирующего вектора, иммунной клетки, иммунной клетки, продуцируемой данным способом, и/или фармацевтическую композицию, описанную в данной заявке.

Настоящее раскрытие также относится к клеткам, популяциям клеток и композициям (включая фармацевтические и терапевтические композиции), содержащим клетки и популяции, например, клетки и популяции клеток, полученные предлагаемыми способами, и к способам, например, терапевтическим способам введения клеток и композиции субъекту, такому как пациент.

Также предлагаются композиции, включающие клетки для введения, включая фармацевтические композиции и составы, такие как композиции единичных лекарственных форм, включающие ряд клеток для введения в заданной дозе или их фракции. Фармацевтические композиции и составы обычно включают один или более необязательных фармацевтически приемлемых носителей или вспомогательных веществ. В некоторых воплощениях композиция включает, по меньшей мере, один дополнительный терапевтический агент.

Термин «фармацевтические составы» относится к препарату в форме, которая позволяет биологической активности содержащегося в нем активного ингредиента быть эффективной и не содержит дополнительных компонентов, которые имели бы неприемлемую токсичность для субъекта, которому должен вводиться состав.

«Фармацевтически приемлемые носители» относятся к ингредиенту в фармацевтической композиции, отличному от активного ингредиента, который нетоксичен для субъекта. Фармацевтически приемлемые носители включают, без ограничения указанным, буферы, эксципиенты, стабилизаторы или консерванты.

В некоторых аспектах выбор носителей частично определяется конкретными клетками и/или способом введения. Поэтому существует множество подходящих составов. Например, фармацевтические композиции могут содержать консерванты. Подходящие консерванты могут включать, например, метилпарабен, пропилпарабен, бензоат натрия и хлорид бензалкония. В некоторых аспектах используется смесь двух или более консервантов. Консервант или его смеси обычно присутствуют в количестве от около 0,0001% до около 2% от массы всей композиции. Фармацевтически приемлемые носители, как правило являются нетоксичными для реципиента в используемых дозах и концентрациях и включают, без ограничения указанным: буферы, такие как фосфаты, цитраты и другие органические кислоты; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (такие как хлорид октадецилдиметилбензиламмония; хлорид

гексаметония; хлорид бензалкония; хлорид бензетония; фенол, бутанол или бензиловый спирт; алкил-п-гидроксibenзоатные эфиры, такие как метил- или пропилпарабен; катехол; резорцин; циклогексанол; 3-пентанол и м-крезол; низкомолекулярные (менее чем около 10 остатков) полипептиды; белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрин; хелатирующие агенты, такие как EDTA; сахара, такие как сахароза, маннит, трегалоза или сорбит; соли, образующие противоионы, например натрий; комплексы металлов (например, белково-цинковые комплексы); и/или неионные поверхностно-активные вещества, такие как полиэтиленгликоль (ПЭГ).

В некоторых аспектах в композицию включен буфер. Подходящие буферные агенты включают, например, лимонную кислоту, цитрат натрия, фосфорную кислоту, фосфат калия и различные другие кислоты и соли. В некоторых аспектах используется смесь двух или более буферов. Консервант или его смеси обычно присутствуют в количестве от около 0,0001% до около 2% от массы всей композиции. Известны способы приготовления фармацевтических композиций для введения.

Составы могут включать водные растворы. Состав или композиция могут также содержать более чем один активный ингредиент, полезный для конкретного показания, заболевания или состояния, которое лечат клеткой, предпочтительно те, активность которых дополняет клетку, где соответствующие активности не оказывают неблагоприятного влияния друг на друга. Такие активные ингредиенты присутствуют в комбинации в количествах, эффективных для намеченной цели. Таким образом, в некоторых воплощениях фармацевтические композиции дополнительно содержат другие фармацевтически активные агенты или лекарственные средства, такие как химиотерапевтические агенты (например, аспарагиназа, бусульфан, карбоплатин, цисплатин, даунорубицин, доксорубицин, фторурацил, гемцитабин, гидроксимочевина, метотрексат, паклитаксел, ритуксимаб, винбластин и/или винкристин).

В некоторых воплощениях фармацевтическая композиция содержит количество клеток, эффективное для лечения или предотвращения заболевания или состояния, например терапевтически эффективное количество или профилактически эффективное количество. В некоторых воплощениях терапевтическую или профилактическую эффективность контролируют путем периодической оценки субъектов, получающих лечение. Искомая доза может быть доставлена путем введения клеток в виде однократного болюса, многократного болюса или непрерывной инфузии.

Клетки и композицию(ии) можно вводить с использованием стандартных методов, составов и/или устройств для введения. Введение клеток может быть аутологичным или гетерологичным. Например, клетки иммунного ответа или клетки-предшественники могут быть получены от одного пациента и введены тому же пациенту или другому совместимому пациенту. Клетки иммунного ответа, полученные из периферической крови, или их потомство (например, полученные *in vivo*, *ex vivo* или *in vitro*) можно вводить путем местной инъекции, включая катетерное введение, системную инъекцию, местную инъекцию, внутривенную инъекцию или парентеральное введение. При введении терапевтических композиций (например, фармацевтических композиций, содержащих генетически модифицированные клетки иммунного ответа) их обычно готовят в инъекционных формах с единичной дозой (растворы, суспензии, эмульсии).

Составы включают формы для перорального, внутривенного, внутрибрюшинного, подкожного, легочного, трансдермального, внутримышечного, интраназального, буккального, сублингвального или суппозиторного введения. В некоторых воплощениях популяция клеток подвергается парентеральному введению. Термин «парентеральный», используемый в данной заявке, включает внутривенное, внутримышечное, подкожное, ректальное, вагинальное и внутрибрюшинное введение. В некоторых воплощениях клетки вводят пациенту с использованием периферической системной доставки путем внутривенной, внутрибрюшинной или подкожной инъекции.

В некоторых воплощениях композиции представлены в виде стерильных жидких препаратов, таких как изотонические водные растворы, суспензии, эмульсии, дисперсии или вязкие композиции, рН в которых в некоторых аспектах может быть доведено до выбранного. Жидкие препараты обычно легче приготовить, чем гели, другие вязкие композиции и твердые композиции. Кроме того, жидкие композиции несколько удобнее вводить, особенно инъекцией. Вязкие композиции, с другой стороны, могут быть приготовлены в пределах соответствующего диапазона вязкости, чтобы обеспечить более длительные периоды контакта с конкретными тканями. Жидкие или вязкие композиции могут содержать носитель, который может быть растворителем или диспергирующей средой, включая, например, воду, физиологический раствор, фосфатно-солевой буферный раствор, полиолы (например, глицерин, пропиленгликоль, жидкий полиэтиленгликоль) и их подходящие смеси.

Стерильные растворы для инъекций можно приготовить путем введения клеток в растворитель, например, смешанный с подходящим носителем, разбавителем или наполнителем, таким как стерильная вода, физиологический раствор, глюкоза, декстроза и т.п. Композиции могут содержать вспомогательные вещества, такие как смачивающие,

диспергирующие или эмульгирующие агенты (например, метилцеллюлоза), рН-буферы, гелеобразующие или загущающие добавки, консерванты, ароматизаторы и/или красители, в зависимости от пути введения и искомым препаратов. В некоторых отношениях можно сослаться на стандартные тексты по приготовлению подходящих препаратов.

Могут быть добавлены различные добавки, повышающие стабильность и стерильность композиции, включая противомикробные консерванты, антиоксиданты, хелаторы и буферы. Предотвращение действия микроорганизмов может быть гарантировано различными антибактериальными и фунгицидными агентами, например, парабенном, хлорбутанолом, фенолом и сорбиновой кислотой. Пролонгированная абсорбция инъекционной фармацевтической формы может быть достигнута путем включения агентов, которые замедляют абсорбцию, таких как моностеарат алюминия и желатин.

Составы, используемые для введения *in vivo*, обычно являются стерильными. Стерильности можно легко достичь, например, путем фильтрации через стерильную мембрану.

Также предлагаются способы введения клеток, популяций и композиций для лечения или профилактики заболеваний, состояний и расстройств (включая онкологические заболевания), а также применение таких клеток, популяций и композиций для лечения или профилактики заболеваний, состояний и нарушений (включая онкологические заболевания). В некоторых воплощениях клетки, популяции и композиции вводят субъекту или пациенту, страдающему от конкретного заболевания или состояния, подлежащего лечению, например, с помощью адоптивной клеточной терапии (например, адоптивной Т-клеточной терапии). В некоторых воплощениях клетки и композиции (например, сконструированные композиции и конечные продукты, полученные после инкубации и/или других стадий обработки), изготовленные предложенными способами, вводят субъекту, например, страдающему заболеваниями или состояниями, или субъектам, подверженным риску заболеваний или состояния. В некоторых аспектах способы таким образом лечат, например, один или несколько симптомов заболеваний или состояний, например, путем снижения опухолевой нагрузки при злокачественной опухоли, которая экспрессирует антиген, распознаваемый сконструированными Т-клетками.

Способ введения клеток для адоптивной клеточной терапии известен и может комбинироваться с предложенными способами и композициями. Например, способы адоптивной Т-клеточной терапии описаны, например, в пат. заявке США № 2003/0170238; пат. 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.

Используемый в настоящей заявке термин «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 мужчина или женщина и может быть любого подходящего возраста, включая младенцев, юношей, подростков, взрослых и пожилых людей. 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.

В настоящей заявке «Задержка развития заболевания» относится к задержке, препятствованию, замедлению, стабилизации, ингибированию и/или задержке развития заболевания (например, онкологического заболевания). Данная задержка может иметь вариации по продолжительности времени в зависимости от истории развития заболевания и/или от индивидуума, который подвергается лечению. Специалистам в данной области техники будет очевидно, что достаточная или значительная задержка может фактически включать профилактику, поскольку у индивидуума не развивается заболевание. Например, может быть отложено развитие поздней стадии онкологического заболевания, такой как метастазы.

«Предотвращение» при использовании в данной заявке, включает обеспечение профилактики в отношении возникновения или рецидива заболевания у пациента, который может быть предрасположен к заболеванию, но у которого еще не было диагностировано данное заболевание. В некоторых воплощениях предложенные клетки и

композиции используются для задержки развития заболевания или замедления прогрессирования заболевания.

В настоящей заявке «ингибирование» функции или активности означает снижение функции или активности по сравнению с тем же состоянием (кроме представляющего интерес состояния или параметра) или по сравнению с другим состоянием. Например, клетки, ингибирующие рост опухоли, снижают скорость роста опухоли по сравнению со скоростью роста опухоли в отсутствие клеток.

В контексте введения «эффективное количество» агента, например, фармацевтического состава, клеток или композиции, относится к количеству, эффективному в дозировках/количествах и в течение периодов времени, необходимых для достижения искомого результата, например в виде терапевтического или профилактического результата.

«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. Как правило, но не обязательно, поскольку профилактическая доза используется у пациентов до или на более ранней стадии заболевания, профилактически эффективное количество будет меньше терапевтически эффективного количества. В контексте более низкой опухолевой нагрузки профилактически эффективное количество в некоторых аспектах будет выше, чем терапевтически эффективное количество.

В некоторых воплощениях клетки или отдельные популяции или подтипы 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 ячеек, около 500 миллионов ячеек, около 1 миллиарда ячеек, около 5 миллиардов ячеек, около 20 миллиардов ячеек, около 30 миллиардов ячеек, около

40 миллиардов ячеек 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 ячеек, около 50 миллиардов ячеек, около 75 миллиардов ячеек, около 90 миллиардов ячеек или диапазон, определяемый любым из двух вышеуказанных значений), а в некоторых случаях от около 100 миллионов ячеек до около 50 миллиардов ячеек (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, составляет по меньшей мере или по меньшей мере около или около 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 вводят клетки в диапазоне от или около 10^4 и до или около 10^9 Т-клеток/килограмм (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, трансseptальная 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, внутрилегочно 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 клетки 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 числа клеток, представленных в нескольких индивидуальных композициях, или инфузий в виде дробных доз в течение определенного периода времени (не более 3 дней). Таким образом, в некоторых случаях первая или последующая доза представляет собой однократное или последовательное введение определенного количества клеток, введенное или инициированное в один момент времени. Однако в некоторых случаях первую или последующую дозы вводят в виде многократных инъекций или инфузий в течение периода не более трех дней, например, три или два дня, один раз в день или многократных инфузий в течение одного дня.

В следующем подробном описании воплощений настоящего раскрытия даны ссылки на прилагаемые чертежи. На чертежах одинаковые номера ссылок обозначают аналогичные элементы, и в качестве иллюстрации показаны конкретные воплощения, в которых данное раскрытие может быть реализовано на практике. Эти воплощения описаны достаточно подробно, чтобы дать возможность специалистам в данной области техники реализовать данное раскрытие на практике. В других случаях хорошо известные процессы, структуры и технологии не показаны подробно, чтобы не затруднить понимание данного описания. Следовательно, следующее подробное описание не следует рассматривать как ограничивающее, а техническое решение настоящего раскрытия ограничивается только прилагаемой формулой изобретения.

Примеры

Пример 1: проектирование многофункционального комплекса CNK-UT.

В данном примере спроектированы четыре многофункциональных комплекса CNK-UT. Первая структура представляет собой базовый многофункциональный комплекс CNK-UT, а остальные три структуры представляют собой многофункциональные комплексы CNK-UT с дополнительными функциями, образованными путем добавления дополнительных модулей к первой структуре.

1.1 базовый многофункциональный комплекс CNK-UT

В некоторых воплощениях используется базовый многофункциональный комплекс CNK-UT, как схематически показано на Фиг. 1А, включающий 3 модуля: (1) модуль рецептора, активирующего НК, (2) модуль передачи сигнала CNK и (3) модуль UT. Необязательно, шарнир или линкер включены между модулем рецептора, активирующего НК, модулем передачи сигнала CNK и/или модулем UT.

Где,

(1) модуль рецептора, активирующего НК, содержащий по меньшей мере рецептор активации НК-клеток, или его функциональный вариант, причем рецептор активации НК-клеток, содержит: (а) внеклеточный домен (ED) рецептора активации НК-клеток или его функциональный вариант, (b) трансмембранный домен (TMD) рецептора активации НК-клеток, или его функциональный вариант, и (с) внутриклеточный домен (ICD) рецептора активации НК-клеток, или его функциональный вариант; и необязательно шарнир или линкер включен между внеклеточным доменом рецептора активации НК-клеток, или его функциональным вариантом, трансмембранным доменом рецептора активации НК-клеток, или его функциональным вариантом, и/или внутриклеточным доменом рецептора активации НК-клеток, или его функциональным вариантом;

рецептор активации НК-клеток, 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 NCR3 или CD337).

В некоторых предпочтительных воплощениях многофункциональный комплекс CNK включает аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1~24.

(2) модуль передачи сигнала CNK, содержащий по меньшей мере (i) сигнальный адаптер НК-клетки или его функциональный вариант, причем сигнальный адаптер НК-

клетки содержит: (а) внеклеточный домен (ED) сигнального адаптера НК-клетки или его функциональный вариант, (b) трансмембранный домен (TMD) сигнального адаптера НК-клетки или его функциональный вариант и (с) внутриклеточный домен (ICD) сигнального адаптера НК-клетки или его функциональный вариант; и где, 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.

Сигнальным адаптером НК-клетки в компоненте передачи сигнала CNK является DAP10 или DAP12.

В некоторых предпочтительных воплощениях функциональный вариант сигнального адаптера клетки CNK выбран из мутанта DAP10 или мутанта DAP12, или гибридного белка DAP10 и DAP12, или гибридного белка DAP10 дикого типа или DAP12 с мутантным типом DAP10 или DAP12.

Функциональный вариант сигнального адаптера клетки CNK выбран из мутанта DAP10 или мутанта DAP12, или гибридного белка DAP10 и DAP12, или гибридного белка DAP10 или DAP12 дикого типа с мутантным типом DAP10 или DAP12.

В некоторых предпочтительных воплощениях модуль передачи сигнала CNK дополнительно включает (ii) домен передачи сигнала активации иммунного рецептора (ITAM) и/или (iii) костимулирующий домен передачи сигнала 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 костимулирующим доменом передачи сигнала 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 иммунорецептора (ITAM) происходит из внутриклеточного домена передачи сигнала активации иммунорецептора; предпочтительно иммунорецептор выбран из TCR ζ , CD2, CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ , CD3 ζ , CD5, CD22, Fc 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 иммунорецептора (ITAM) объединен с адаптером сигнала НК-клетки или его функциональным вариантом; и предпочтительно иммунорецептор представляет собой CD3 ζ .

В некоторых предпочтительных воплощениях костимулирующий домен передачи

сигнала Т-клеток получен из внутриклеточного домена передачи сигнала котсимулирующей молекулы.

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

(3) модуль UT, содержащий по меньшей мере (i) молекулу рекомбинантного белка для направленной деградации TCR, МНС и/или мишени NK-клетки, или ее функциональный вариант, причем молекула рекомбинантного белка для направленной деградации TCR, МНС и/или мишени NK-клетки содержит: (a) молекулярный домен связывающего белка, нацеленного на TCR, МНС и/или мишень NK-клетки, или его функциональный вариант, (b) трансмембранный домен вирусного гликопротеина, резидентного в эндоплазматическом ретикулуме (ЭР) или его функциональный вариант и (c) цитоплазматический домен вирусного гликопротеина, резидентного в эндоплазматическом ретикулуме, 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, образуют домен деградации ERAD; необязательно, молекулярный домен связывающего белка, нацеленного на TCR, или его функциональный вариант, трансмембранный домен вирусного гликопротеина, резидентного в эндоплазматическом ретикулуме, или его функциональный вариант, и/или цитоплазматический домен вирусного гликопротеина, резидентного в эндоплазматическом ретикулуме, или его функциональный вариант, содержат шарнир или линкер.

В молекуле рекомбинантного белка для направленной деградации TCR, из модуля UT, молекулярный домен связывающего белка, нацеленного 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 фрагмент антитела выбран из Fd, Fv, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv(scFv), одноцепочечного антитела (scFv) или нанотела, двухцепочечного антитела, трехцепочечного антитела и тетра-цепочечного антитела; предпочтительно антитело к TCR представляет собой одноцепочечное антитело к TCR. В некоторых предпочтительных воплощениях молекула связывающего белка, нацеленного на TCR, представляет собой антитело к TCR $\alpha\beta$. В некоторых предпочтительных воплощениях аминокислотная последовательность одноцепочечного

антитела к TCR включает аминокислотную последовательность, имеющую 80% или более идентичности, предпочтительно 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности, а более предпочтительно 98%, 99% или более идентичности с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 116; при этом аминокислотная последовательность полноразмерной последовательности одноцепочечного антитела к TCR показана как SEQ ID NO:116.

В некоторых предпочтительных воплощениях домен деградации ERAD 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 в модуле UT, содержит аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 46~63.

Фрагменты генных элементов, экспрессирующие различные модули базового многофункционального комплекса CNK-UT, могут быть синтезированы методами генного синтеза. При полицистронной схеме экспрессии саморасщепляющийся пептид 2A (2A: T2A, p2A, E2A, F2A) и другие элементы используются для связывания фрагментов генных элементов разных модулей, для получения фрагмента гена базового многофункционального комплекса CNK-UT; синтезированный фрагмент гена базового многофункционального комплекса CNK-UT клонируется в лентивирусный вектор с помощью технологии молекулярного клонирования и трансфицируется в Т-клетки для достижения одновременной экспрессии множества различных элементов, тем самым не только позволяя Т-клеткам специфически распознавать и убивать мишени НК-клетки, а также эффективно ингибировать и разрушать TCR через элементы UT. Альтернативно, одновременная экспрессия множества элементов CNK-UT может быть достигнута путем размещения различных функциональных элементов под разными промоторами в одном и том же лентивирусном векторе и трансфекции Т-клеток этим вектором; или одновременная экспрессия множества элементов CNK-UT также может быть достигнута помещением различных функциональных элементов в два лентивируса и одновременной трансфекцией Т-клеток обоими векторами.

1.2. Многофункциональный комплекс CNK-UT, дополнительно содержащий молекулярный домен связывающего белка, нацеленного на МНС.

В некоторых воплощениях используется многофункциональный комплекс CNK-UT, который одновременно разрушает или ингибирует TCR и МНС I и/или МНС II, его схематическая диаграмма показана на Фиг. 1В, 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, нацеленной на МНС I и/или МНС II, или его функциональный вариант. По сравнению с базовым многофункциональным комплексом CNK-UT этот комплекс отличается тем, что (3) модуль UT дополнительно содержит молекулярный домен связывающего белка для нацеливания на МНС I или его функциональный вариант. Необязательно, модуль рецептора, активирующего NK, модуль передачи сигнала CNK, модуль UT и/или модуль химерного адаптера связаны шарниром или линкером.

В некоторых воплощениях молекулярный домен связывающего белка, нацеленного на МНС I и/или МНС II, или его функциональный вариант представляет собой молекулярный домен связывающего белка, нацеленного на HLA, или его функциональный вариант.

В некоторых воплощениях молекулярный домен связывающего белка, нацеленного на МНС I, может быть получен из вирусного белка, резидентного в эндоплазматическом ретикулуме, который ингибирует молекулы МНС I. В некоторых воплощениях вирусный гликопротеин, резидентный в эндоплазматическом ретикулуме, который ингибирует молекулы МНС I, выбран из US6 цитомегаловируса человека (HCMV), ICP47 вируса простого герпеса (HSV), CPXV12 вируса оспы коров (CPXV), UL49.5 бычьего герпесвируса (BHV), BNFL2a вируса Эпштейна-Барр (EBV) и т.п. Вышеупомянутый вирусный белок, резидентный в эндоплазматическом ретикулуме, 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 молекулярный домен связывающего белка, нацеленного 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 молекулярный домен связывающего белка, нацеленного на МНС I, также может быть получен 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 молекулярный домен связывающего белка, нацеленного на МНС I и/или МНС II, или его функциональный вариант включает домен, связывающий МНС. В некоторых предпочтительных воплощениях домен, связывающий МНС, содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 74~82.

В некоторых воплощениях молекулярный домен связывающего белка, нацеленного на МНС I, также может быть получен из вирусных белков, которые направленно ингибируют или разрушают белки-мишени 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 показана в SEQ ID NO: 83~91.

В некоторых воплощениях молекулярный домен связывающего белка, нацеленного на МНС I, также может быть получен из вирусного белка, который транспортирует молекулы МНС I из аппарата Гольджи в лизосомы для деградации. В некоторых воплощениях вирусный белок выбран из Nef HIV, Vpu HIV, U21 HHV-7, KK3 HHV-8, KK5 HHV-8, MK3 MHV-68, p12 HTLV-1 и т.п. В некоторых предпочтительных воплощениях аминокислотная последовательность вирусного белка содержит аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 92-97.

В некоторых воплощениях молекулярный домен связывающего белка, нацеленного на МНС I и/или МНС II, или его функциональный вариант дополнительно включает вирусный белок, который опосредует возврат молекул полипептида МНС из аппарата Гольджи в эндоплазматический ретикулум и способствует деградации молекул полипептида МНС; предпочтительно вирусный белок содержит структуру связывания МНС и домен, связывающий рецептор KDEL. В некоторых воплощениях вирусный белок представляет собой белок CPXV203 вируса оспы коров. В некоторых предпочтительных воплощениях вирусный белок содержит аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 98~103.

Фрагмент гена многофункционального комплекса CNK-UT, дополнительно включающий молекулярный домен связывающего белка, нацеленного на МНС I, получали таким же образом, как и фрагмент гена базового многофункционального комплекса CNK-UT. Синтезированный фрагмент гена многофункционального комплекса CNK-UT клонировали в лентивирусный вектор молекулярным клонированием и использовали 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 ингибировать и разрушать TCR и МНС I с помощью элементов UT.

1.3. Многофункциональный комплекс CNK-UT, дополнительно содержащий молекулярный домен связывающего белка, нацеленного на МНС I, и химерный адаптер.

В некоторых воплощениях используется многофункциональный комплекс, который одновременно разрушает TCR и МНС I и обеспечивает распознавание и активацию CNK-

Т-клеток против специфичности опухолевого антигена, схематическая диаграмма которого показана на Фиг. 1С, включает четыре модуля (1) модуль рецептора, активирующего НК; (2) модуль передачи сигнала CNK; (3) модуль UT; и (4) модуль химерного адаптера. По сравнению с многофункциональным комплексом CNK-UT, имеющим дополнительный домен молекулы связывающего белка, нацеленного на МНС I, этот комплекс отличается добавлением (4) модуля химерного адаптера. Необязательно, модуль рецептора, активирующего НК, модуль передачи сигнала CNK, модуль UT и/или модуль химерного адаптера связаны шарниром или линкером.

(4) Модуль химерного адаптера содержит: (i) внеклеточный домен распознавания, нацеленный на опухоль, (ii) трансмембранный домен и (iii) внутриклеточный домен передачи сигнала. Необязательно, шарнир или линкер включен между внеклеточным доменом распознавания, нацеленным на опухоль, трансмембранным доменом и/или внутриклеточным доменом передачи сигнала;

В некоторых воплощениях внеклеточный домен 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 воплощениях внеклеточный домен распознавания, нацеленный на опухоль, выбран из антитела, способного нацеливаться на опухолеассоциированный антиген или его функциональный фрагмент, TCR или их комбинацию. Функциональный фрагмент антитела выбран из Fd, Fv, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv (scFv), одноцепочечного антитела (scFv) или нанотела, двухцепочечного антитела, трехцепочечного антитела и четырехцепочечного антитела.

В некоторых воплощениях трансмембранного домена химерного адаптера выбран из трансмембранного домена рецептора активации НК-клеток, 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; предпочтительно рецептор активации НК-клеток, выбран из KG2D, NKG2C, NKG2E, NKG2F, NKG2H, CD94, KIR2DL4, KIR2DS1, KIR2DS2, KIR2DS4, KIR3DS1, натурального цитотоксического рецептора, TRAIL, DNAM-1, CD16a, 2B4, NTB-A, CRACC и NKp80; предпочтительно натуральный цитотоксический рецептор выбран из Nkp46, Nkp44 и Nkp30.

В некоторых воплощениях внутриклеточный сигнальный домен химерного адаптера включает внутриклеточный домен передачи сигнала рецептора активации NK-клеток, и/или костимулирующий домен передачи сигнала.

В некоторых воплощениях рецептор активации NK-клеток, 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.

В некоторых воплощениях внутриклеточный сигнальный домен дополнительно содержит костимулирующий домен передачи сигнала; предпочтительно, костимулирующий домен передачи сигнала выбран из костимулирующих доменов передачи сигнала T-клеток, включая, без ограничения указанным, внутриклеточный сигнальный домен, полученный из молекул MHC класса I, белков рецептора TNF, иммуноглобулиноподобных белков, цитокиновых рецепторов, белков интегринов, сигнальных молекул активации лимфоцитов (белки SLAM), активированные рецепторы NK-клеток, BTLA, рецепторов 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(Tactile), 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, TCR α , TCR β , TRIM, ZAP70, PTCH2 и т.п.; более предпочтительно, костимулирующий домен передачи сигнала выбран из внутриклеточного сигнального домена NKG2D, внутриклеточного сигнального домена DAP10, внутриклеточного сигнального домена DAP12, внутриклеточного сигнального домена NCR, внутриклеточного сигнального домена CD28, внутриклеточного сигнального домена 4-1BB, внутриклеточного сигнального домена OX40 и внутриклеточного сигнального домена ICOS.

Фрагмент гена многофункционального комплекса CNK-UT, включающий дополнительный молекулярный домен связывающего белка, нацеленного на MHC I, и

химерный адаптер, получали аналогично получению фрагмента гена базового многофункционального комплекса CNK-UT. Синтезированный фрагмент гена многофункционального комплекса CNK-UT клонировали в лентивирусный вектор путем молекулярного клонирования, трансфецировали Т-клетки, 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 MHC I с помощью элементов UT, а также специфически распознавать опухолевые антигены и активировать их посредством химерного адаптера.

1.4 многофункциональный комплекс CNK-UT, дополнительно включающий как молекулярный домен связывающего белка, нацеленного на MHC I, так и рецептор с направленной активностью уничтожения против опухолевых клеток (например, CAR или TCR).

В некоторых воплощениях используется многофункциональный комплекс, способный обеспечить одновременную деградацию TCR и MHC I, а также антиген-специфическое распознавание и цитолитический эффект, его схематическая диаграмма показана на Фиг. 1D, которая содержит четыре модуля: (1). Модуль рецептора, активирующего NK, (2) модуль передачи сигнала CNK, (3) модуль UT и (4) модуль рецептора с направленной активностью уничтожения в отношении опухолевых клеток. Этот комплекс отличается от многофункционального комплекса CNK-UT, содержащего молекулярный домен связывающего белка, нацеленного на MHC I, тем, что дополнительно содержит (4) рецепторный модуль с направленной активностью уничтожения 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 активностью уничтожения в отношении опухолевых клеток включает: (i) внеклеточный домен распознавания, нацеленный на опухолевый антиген; (ii) трансмембранный домен; (iii) внутриклеточный костимулирующий домен передачи сигнала; и (iv) домен передачи сигнала активации Т-клеток (ITAM); необязательно, шарнир или линкер содержится между внеклеточным доменом распознавания, нацеленным на опухолевый антиген, трансмембранным доменом, внутриклеточным костимулирующим доменом передачи сигнала и доменом передачи сигнала активации Т-клеток (ITAM);

рецепторный модуль с направленной активностью уничтожения 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 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 других внутриклеточных доменов передачи сигналов.

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

Фрагмент гена многофункционального комплекса CNK-UT, дополнительно включающий как молекулярный домен связывающего белка, нацеленного на MHC I, так и рецептор с направленной активностью уничтожения против опухолевых клеток (например, рецептор CAR или TCR), получали таким же образом, как и базовый многофункциональный комплекс CNK-UT. Синтезированный фрагмент гена многофункционального комплекса CNK-UT клонировали в лентивирусный вектор молекулярным клонированием и трансфицировали в Т-клетки, 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 2: 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.

2.1 1-й проект структуры элемента CNK-UT

В некоторых воплощениях, как показано на Фиг. 2А, экспрессия множества

функциональных элементов с помощью одного вектора достигается за счет применения одного лентивирусного экспрессирующего вектора с промотором EF1 α и путем связывания следующей комбинации элементов CNK-UT через такие элементы, как саморасщепляющийся пептид 2A: DAP10-DAP12 ICD-T2A-NKG2D-p2A-анти-TCR-AdE3 ERAD.

2.2 2-й проект структуры элемента CNK-UT

В некоторых воплощениях, как показано на Фиг. 2B, экспрессия множества функциональных элементов с помощью одного вектора достигается за счет использования одного лентивирусного экспрессирующего вектора с промотором EF1 α и путем связывания следующей комбинации элементов CNK-UT через такие элементы, как саморасщепляющийся пептид 2A: DAP10-DAP12 ICD-T2A-NKG2D-p2A-анти-TCR-US2 ERAD.

2.3 3-й проект структуры элемента CNK-UT

В некоторых воплощениях, как показано на Фиг. 2C, экспрессия множества функциональных элементов с помощью одного вектора достигается следующим образом: с использованием одного единственного лентивирусного вектора, имеющего полицистронную систему экспрессии с двойными промоторами, соответственно регулирующими экспрессию нескольких генов DAP10-CD3 ζ -T2A-NKG2D-p2A-анти-TAA scFv-DAP10 и анти-TCR-AdE3 ERAD-E2A-AdE3 посредством промотора EF1 α и промотора CMV.

2.4 4-й проект структуры элемента CNK-UT

В некоторых воплощениях, как показано на Фиг. 2D, экспрессия множества функциональных элементов в одной и той же Т-клетке достигается следующим образом: с использованием двух разных лентивирусных векторов экспрессии, которые соответственно регулируют экспрессию мультигенов анти-TAA scFv-CD28/4-1BB-CD3 ζ -T2A-DAP10-CD3 ζ -T2A-NKG2D и анти-TCR-AdE3 ERAD-T2A-AdE3, получение различных лентивирусов и совместная трансфекция Т-клеток.

Пример 3: Получение экспрессирующей плазмиды специфического химерного антигенного рецептора, нацеленного на NKG2DL

Нуклеотидную последовательность CNK-UT (нуклеотидная последовательность показана в SEQ ID NO:118; кодируемый ею белок показан в SEQ ID NO:117, где функциональный фрагмент химерного антигенного антитела связан в порядке DAP10-CD3 ζ -T2A-NKG2D-p2A-анти-TCR scFv-AdE3) получали путем синтеза всего гена и встраивали в лентивирусный вектор pCDH-CMV-MCS-EF1 α -Puro (приобретенный у Youbao Biotech) или pLVX-EF1 α -AcGFP1- C1Vector (Takara) путем молекулярного

клонирования с целью создания искомого лентивирусного вектора CNK-UT. 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 CNK-UT.

Пример 4: Получение вируса CNK-UT

Клетки 293T (предоставленные ATCC, Кат. № CRL3216™) котрансфицировали лентивирусной плазмидой CNK-UT, полученной в Примере 3, 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 собирали и хранили при -80°C.

Пример 5: Получение CNK-UT-клеток

Собрали свежую периферическую кровь от здоровых доноров, добавили PBS+EDTA 1:1 и отделили свежие мононуклеарные клетки периферической крови центрифугированием в градиенте плотности фикола. 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 гранул, конъюгированных с анти-CD3/анти-CD28-антителами (Т-активатор CD3/CD28 человека, Invitrogen, Кат. № 11161D), в соответствии со следующими стадиями: разбавить мононуклеарные клетки периферической крови до концентрации 1 x 10⁶ отдельных клеток/мл, распределить их в 24-луночной планшете, добавить к клеткам магнитные гранулы 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 несет 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 6: Детекция фенотипа CNK-UT-клеток

На Фиг. 3 показаны результаты детекции базового фенотипа CNK-UT-клеток (DAP10-CD3 ζ -T2A-NKG2D-p2A-анти-TCR scFv-AdE3) проточной цитометрией. Клетки культивировали согласно Примеру 2 в течение 10 дней и собирали 5×10^5 нетрансфицированных Т-клеток и клеток, трансфицированных вирусным вектором CNK-UT, соответственно. Клетки обрабатывали антителами CD8-Pacific Blue, CD4-APC, NKG2D-PE-Cy7, TCR- $\alpha\beta$ -APC-Cy7 (все антитела были приобретены у Biolegend) для окрашивания. Затем окрашенные клетки подвергали фенотипированию с помощью проточного цитометра (BD FACSCanto II). Результаты показали, что нетрансфицированные Т-клетки CD8 Т-клетки экспрессируют NKG2D и TCR- $\alpha\beta$, CD4 Т-клетки не экспрессируют NKG2D, но в высокой степени экспрессируют TCR- $\alpha\beta$; 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- $\alpha\beta$.

Пример 7: Детекция функции уничтожения широкого спектра опухолей CNK-UT-клетками

В этом примере изучали функцию уничтожения широкого спектра опухолей CNK-UT-клетками, полученными в примере 5. Линию клеток аденомы ободочной кишки человека HT29 приобрели у Procell (CL-0118), клетки трижды негативного рака молочной железы MDA-MB453 приобрели у Procell (CL-0152), клеточную линию острого миелолейкоза THP1 приобрели у Procell (CL-0233), гепатоцеллюлярную карциному (ГЦК) HepG2 приобрели у Procell (CL-0103), гепатоцеллюлярную карциному (ГЦК) PLC приобрели у Procell (CL-0415).

7.1 CNK-UT-клетки распознают и специфически убивают линию клеток аденомы ободочной кишки человека HT29.

CNK-UT-клетки, используемые в этом примере, представляют собой клетки, полученные в Примере 5.

На Фиг. 4 показано, что CNK-UT-клетки распознают и специфически уничтожают линию клеток аденомы ободочной кишки человека HT29. Где:

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: Эффективное уничтожение HT29 и активационная способность CNK-UT-клеток.

В эксперименте по совместному культивированию Т-клеток и опухолевых клеток клеточную линию HT29 аденомы ободочной кишки человека подсчитывали и распределяли в количестве $0,5 \times 10^6$ клеток/лунку в 24-луночном планшете. Клетки культивировали до 80% конфлюэнтности. Затем добавляли нетрансфицированные Т-клетки или CNK-UT-клетки (DAP10-CD3 ζ -T2A-NKG2D-p2A-ant-TCR scFv-AdE3), соответственно, при соотношении эффектор-мишень 1:5. Через 24 часа все клетки отделяли, собирали и обрабатывали антителами CD45-PerCP-Cy5.5, CD8-Pacific Blue, CD4-APC, NKG2D-PE-Cy7, CD25-APC-Cy7 (приобретенными у Biolegend) для окрашивания. Окрашенные клетки детектировали проточной цитометрией. Для анализа результатов CD45(-) опухолевые клетки и CD45(+) Т-клетки различали на основе CD45, затем Т-клетки CD8 и CD4 анализировали по поверхностной экспрессии NKG2D и маркеру активации CD25. Экспериментальные данные показали, что 59,0% клеток HT29 имеют положительную регуляцию экспрессии MICA, 40,1% имеют положительную регуляцию экспрессии MICB, 56,1% имеют положительную регуляцию экспрессии ULBP1, 84,4% имеют положительную регуляцию экспрессии ULBP2, 23,7% имеют положительную регуляцию экспрессии ULBP3 (Фиг. 4А), CNK-UT-клетки демонстрировали эффективную активность уничтожения на клетки HT29. В системе совместного культивирования контрольной группы 69,5% клеток являются опухолевыми клетками, Т-клетки не экспрессируют CD25. Однако в системе совместного культивирования CNK-UT-клеток по результатам FSC/SSC большинство опухолевых клеток было элиминировано, 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. 4В).

7,2 CNK-UT-клетки распознают и специфически уничтожают MDA-MB453.

CNK-UT-клетки, используемые в этом примере, представляют собой клетки, полученные в Примере 5.

На Фиг. 5 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: Эффективный цитолиз MDA-MB453 и способность активации CNK-UT-клеток.

В эксперименте по совместному культивированию Т-клеток и опухолевых клеток клеточную линию рака молочной железы MDA-MB453 подсчитывали и распределяли в количестве $0,5 \times 10^6$ клеток/лунку в 24-луночной планшете. Клетки культивировали до 80% конфлюэнтности. Затем добавляли нетрансфицированные Т-клетки или CNK-UT-клетки (DAP10-CD3 ζ -T2A-NKG2D-p2A-ant-TCR scFv-AdE3), соответственно, при соотношении эффектор-мишень 1:5. Через 24 часа все клетки отделяли, собирали и обрабатывали антителами CD45-PerCP-Cy5.5, CD8-Pacific Blue, CD4-APC, NKG2D-PE-Cy7, CD25-APC-Cy7 (приобретенными у Biolegend) для окрашивания. Окрашенные клетки детектировали проточной цитометрией. 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. 5А), CNK-UT-клетки демонстрировали эффективную активность уничтожения на клетки MDA-MB453. В системе совместного культивирования контрольной группы 48,9% клеток являются опухолевыми клетками, Т-клетки не экспрессируют CD25. Однако в системе совместного культивирования с CNK-UT-клетками 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. 5В). Экспериментальные

данные показали, что CNK-UT-клетки демонстрировали эффективную активность уничтожения на клетки MDA-MB453 и могут привести к специфической активации.

7.3 CNK-UT-клетки распознают и специфически убивают ТНР1

CNK-UT-клетки, используемые в этом примере, представляют собой клетки, полученные в Примере 5.

На Фиг. 6 показано, что CNK-UT-клетки распознают и специфически убивают ТНР1.

А: Экспрессия различных NK-мишеней в клетках острого миелолейкоза ТНР1.

$0,5 \times 10^6$ клеток ТНР1 из центрифуги соответственно обрабатывали антителами МІСА-АРС, МІСВ-АРС, ULBP1-АРС, ULBP2-АРС, ULBP3-АРС для окрашивания, при этом изотип IgG (приобретенный у R&D Systems) использовали в качестве контроля. Результаты показали, что клетки ТНР1 высоко экспрессируют ULBP1, ULBP2 и ULBP3, но слабо экспрессируют МІСА и МІСВ.

В: Эффективное уничтожение ТНР1 и активационная способность CNK-UT-клеток.

В эксперименте по совместному культивированию Т-клеток и опухолевых клеток клеточную линию ОМЛ ТНР1 подсчитывали и распределяли в количестве $0,5 \times 10^6$ клеток/лунку в 24-луночном планшете. Нетрансфицированные Т-клетки или CNK-UT-клетки (DAP10-CD3 ζ -T2A-NKG2D-p2A-ant-TCR scFv-AdE3) добавляли соответственно в соотношении эффектор-мишень 1:5 к опухолевым клеткам. Через 24 часа все клетки расщепляли, собирали и обрабатывали антителами CD45-PerCP-Cy5.5, CD8-Pacific Blue, CD4-АРС, CD137-PE-Cy7, CD25-АРС-Cy7 (приобретенными у Biolegend) для окрашивания. Окрашенные клетки детектировали проточной цитометрией. Экспериментальные данные показали, что 27,9% клеток ТНР1 имеют положительную регуляцию экспрессии МІСВ, 99,0% имеют положительную регуляцию экспрессии ULBP1, 95,8% имеют положительную регуляцию экспрессии ULBP2, 99,1% имеют положительную регуляцию экспрессии ULBP3 (Фиг. 6А), CNK-UT-клетки демонстрировали эффективную активность уничтожения на клетки ТНР1. В системе совместного культивирования контрольной группы 92,6% клеток представляют собой опухолевые клетки, Т-клетки не имеют повышенной регуляции экспрессии CD25. Однако в системе совместного культивирования CNK-UT-клеток опухолевые клетки составляют только 12,3%, 49,1% CD8+Т-клеток имеют положительную регуляцию экспрессии CD25, 33,59% CD8+Т-клеток имеют положительную регуляцию экспрессии CD137, 33,9% CD4+Т-клеток имеют положительную регуляцию экспрессии CD25, а 11,28% CD4+ Т-клеток имеют положительную регуляцию экспрессии CD137. Экспериментальные результаты подтвердили, что CNK-UT-клетки могут эффективно убивать клетки ТНР1, элиминировать

ТНР1 из системы совместного культивирования, достигать специфической активации и положительно регулировать экспрессию маркеров, активирующих Т-клетки, таких как CD25 и CD137.

7.4 CNK-UT могут кооперироваться с традиционной технологией CAR-T для улучшения распознавания и специфического уничтожения опухолевых клеток.

CNK-UT-клетки, используемые в этом примере, представляют собой клетки, полученные в Примере 5.

На Фиг. 7 показано, что CNK-UT-клетки могут модернизировать традиционную технологию CAR-T для достижения более мощных возможностей направленного цитолиза и активации.

А: Экспрессия GPC3, PD-L1 и различных НК-мишеней при гепатоцеллюлярной карциноме (ГЦК) HepG2.

$0,5 \times 10^6$ клеток HepG2 обрабатывали трипсином и затем, соответственно, обрабатывали антителами GPC3-APC, PD-L1-APC, MICA-APC, MICB-APC, ULBP1-APC, ULBP2-APC, ULBP3-APC для окрашивания, при этом изотип IgG (приобретенный у R&D Systems) использовали для контроля. Затем фенотипы клеток определяли с помощью проточного цитометра (BD FACSCanto II). Результаты показали, что клетки HepG2 высоко экспрессируют ULBP2, но слабо экспрессируют MICA, MICB, ULBP1 и ULBP3.

В: CAR/CNK-UT-клетки демонстрируют более эффективный цитолиз клеток HepG2 и способность к активации, чем обычные CAR-T-клетки.

Получение клеток GPC3 CAR-T: согласно Примерам 3-5 нуклеотидную последовательность анти-GPC3 41BB-CD3 ζ (SEQ ID NO: 120, кодируемая ею аминокислотная последовательность показана в SEQ ID NO: 119) получали синтезом всего гена и связывали с лентивирусным вектором pCDH-CMV-MCS-EF1 α -Puго молекулярным клонированием. Затем плазмиду и лентивирус выделяли и использовали для трансфекции Т-клеток. Получали обычные GPC3 CAR-T-клетки.

Получение GPC3 CAR/CNK-UT-клеток: согласно Примерам 3-5, нуклеотидную последовательность анти-GPC3 41BB-CD3 ζ -T2A-DAP10-CD3 ζ -T2A-NKG2D-p2A-анти-TCR scFv-AdE3 (SEQ ID NO :122, кодируемая им аминокислотная последовательность, показанная в SEQ ID NO: 121), получали синтезом всего гена и связывали с лентивирусным вектором pCDH-CMV-MCS-EF1 α -Puго молекулярным клонированием. Затем плазмиду и лентивирус выделяли и использовали для трансфекции Т-клеток. После размножения были получены GPC3 CAR/CNK-UT-клетки.

В эксперименте по совместному культивированию Т-клеток и опухолевых клеток клетки подсчитывали и распределяли из расчета $0,5 \times 10^6$ клеток/лунку в 24-луночном

планшете. Клетки культивировали до 80% конfluence. Затем обычные GPC3 CAR-T-клетки (анти-GPC3-41BB-CD3 ζ), CNK-UT-клетки (DAP10-CD3 ζ -T2A-NKG2D-p2A-анти-TCR scFv-AdE3) и GPC3 CAR/CNK-UT-клетки (анти-GPC3 41BB-CD3 ζ -T2A-DAP10-CD3 ζ -T2A-NKG2D-p2A-анти-TCR scFv-AdE3), соответственно, добавляли к опухолевым клеткам при соотношении эффектор-мишень 1:5. Через 24 часа все клетки отделяли от поверхности, собирали и обрабатывали антителами CD45-PerCP-Cy5.5, CD8-Pacific Blue, CD4-APC, NKG2D-PE и CD137-PE-Cy7 (приобретенными у Biolegend) для окрашивания. Окрашенные клетки детектировали проточной цитометрией. Все клетки отделяли и детектировали с помощью технологии проточной цитометрии. Опухолевые клетки и Т-клетки различали по CD45, а затем также анализировали экспрессию маркеров активации CD137 на поверхности клеток CD8 и CD4. Экспериментальные данные показали, что 95,0% клеток HepG2 высоко экспрессируют GPC3, 69,1% клеток имеют положительную регуляцию экспрессии PD-L1, 18,2% клеток экспрессируют MICA, 25,6% клеток имеют положительную регуляцию экспрессии MICB, 16,0% клеток имеют положительную регуляцию экспрессии ULBP1 и 5,23% клеток имеют положительную регуляцию экспрессии ULBP2. После 24 часов совместного культивирования с E:T=1:5 в системе совместного культивирования с контрольными Т-клетками 39,1% клеток представляли собой опухолевые клетки, ни CD4+, ни CD8+ Т-клетки не регулировали положительно экспрессию CD25; в системе совместного культивирования с GPC3 CAR-T опухолевые клетки составляли только 11,1%, 20,1% CD8+ Т-клеток имели положительную регуляцию экспрессии CD137; 10,3% CD4+ Т-клеток имели положительную регуляцию экспрессии CD137; в системе совместного культивирования с CNK-UT опухолевые клетки составляли только 8,01%, а 57,9% CD8+ Т-клеток имели положительную регуляцию экспрессии CD137; 33,1% CD4+Т-клеток имели положительную регуляцию экспрессии CD137; в системе совместного культивирования с GPC3 CAR/CNK-UT опухолевые клетки составляли только 4,86%, а 50,3% CD8+Т-клеток имели положительную регуляцию экспрессии CD137; 35,42% CD4+Т-клеток имели положительную регуляцию экспрессии CD137. Таким образом, CNK-UT-клетки превосходят обычные CAR-T-клетки в цитолизе клеток HepG2, а также в специфической активации и положительной регуляции CD137. Клетки GPC3 CAR/CNK-UT, которые объединяют модули GPC3 41BB-Z CAR и CNK-UT, обладают еще более высокой способностью эффективного цитолиза опухолей и активации.

7.5 Направленный цитолиз опухолевых клеток с высокой экспрессией PD-L1 и способность активации CNK-UT-клеток

CNK-UT-клетки, используемые в этом примере, представляют собой клетки,

полученные в Примере 5.

на Фиг. 8 показано, что CNK-UT-клетки могут модернизировать традиционную технологию CAR-T для достижения способности направленного цитолиза и активации в случае опухолевых клеток с высокой экспрессией PD-L1.

А: Экспрессия GPC3, PD-L1 и различных NK-мишеней гепатоцеллюлярной карциномы (ГЦК) PLC.

$0,5 \times 10^6$ клеток PLC обрабатывали трипсином и затем обрабатывали антителами GPC3-APC, PD-L1-APC, MICA-APC, MICB-APC, ULBP1-APC, ULBP2-APC, ULBP3-APC, соответственно, 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 PLC высоко экспрессируют ULBP2, но слабо экспрессируют GPC3, MICA, MICB и ULBP2.

В: CNK-UT-клетки демонстрируют более эффективный цитолиз клеток HepG2 и способность к активации, чем обычные CAR-T-клетки.

В эксперименте по совместному культивированию Т-клеток и опухолевых клеток нетрансфицированные Т-клетки, обычные GPC3 CAR-T-клетки, CNK-UT-клетки и GPC3 CAR/CNK-UT-клетки добавляли, соответственно, в соотношении эффект-мишень 1:5 к клеткам PLC и совместно культивировали в течение 24 часов. Затем все клетки отделяли и детектировали с помощью проточной цитометрии. Опухолевые клетки и Т-клетки различали по CD45, а затем также анализировали экспрессию маркеров активации CD25 и CD137 на поверхности CD8/CD4 клеток. Экспериментальные данные показали, что 35,9% клеток PLC высоко экспрессируют GPC3, 97,8% клеток имеют положительную регуляцию экспрессии PD-L1, 56,9% клеток экспрессируют MICA, 40,9% клеток имеют положительную регуляцию экспрессии MICB, 68,7% клеток имеют положительную регуляцию экспрессии ULBP1 и 25,7% клеток клетки имеют положительную регуляцию экспрессии ULBP2. После совместного культивирования при E:T=1:5 в течение 24 часов 30,3% клеток в контрольной системе совместного культивирования Т-клеток представляли собой опухолевые клетки, причем ни нетрансфицированные CD4+, ни CD8+ Т-клетки не имели положительной регуляции CD137; в системе совместного культивирования GPC3 CAR-T до 47,0% клеток были опухолевыми клетками, только 6,89% CD8+ Т-клеток повышали экспрессию CD137; CD4+ Т-клетки практически не имели положительной регуляции экспрессии CD137; в системе совместного культивирования CNK-UT опухолевые клетки составляли только 12,2%, а 72,0% CD8+ Т-клеток имели положительную регуляцию экспрессии CD137; 42,2% CD4+Т-клеток имели положительную регуляцию экспрессии CD137; в системе совместного культивирования

GPC3 CAR/CNK-UT опухолевые клетки составляли только 8,94%, а 73,9% CD8+T-клеток имели положительную регуляцию экспрессии CD137; 36,2% CD4+T-клеток имели положительную регуляцию экспрессии CD137. Экспериментальные результаты показывают, что, поскольку PLC сильно экспрессирует PD-L1 и слабо экспрессирует GPC3, обычный GPC3 CAR-T показал очень низкую эффективность в уничтожении PLC, но CNK-UT-клетки могут эффективно убивать клетки PLC, достигая специфической активации и иметь положительную регуляцию CD137; Клетки GPC3 CAR/CNK-UT, которые объединяют модули GPC3 CAR и CNK-UT, еще более эффективны в уничтожении и активации опухолей.

Пример 8: Функциональное детектирование CNK-UT-клеток в опухолевых моделях

В этом примере мышей с иммунодефицитом (мыши NSG, приобретенные 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 CNK-UT-клеток 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;

Изотипическая контрольная группа: вводили обычные GPC3 CAR-T-клетки. GPC3 CAR-T-клетки получали в соответствии с Примерами 3-5, нуклеотидную последовательность анти-GPC3 41BB-CD3 ζ синтезировали путем полного синтеза гена и встраивали в лентивирусный вектор CDH-CMV-MCS-EF1 α -Puго способом молекулярного клонирования. Плазмиду и лентивирус готовили и использовали для трансфекции Т-клеток с получением обычных GPC3 CAR-T-клеток.

Группа CNK-UT: Введение клеток GPC3 CAR/CNK-UT.

Получение GPC3 CAR/CNK-UT-клеток: согласно Примерам 3-5, нуклеотидную последовательность анти-GPC3 41BB-CD3 ζ -T2A-DAP10-CD3 ζ -T2A-NKG2D-p2A-анти-TCR scFv-AdE3 синтезировали путем синтез всего гена и связали с лентивирусным вектором pCDH-CMV-MCS-EF1 α -Puго молекулярным клонированием для подготовки плазмиды и лентивируса для трансфекции Т-клеток. После размножения трансфицированных Т-клеток получали GPC3 CAR/CNK-UT-клетки.

Экспериментальных животных разделили на группы и, соответственно вводили контрольные Т-клетки, обычные GPC3 CAR-T-клетки и GPC3 CAR/CNK-UT-клетки. Животных взвешивали. 3×10^6 клеток HepG2 инокулировали 15 мышам NSG в правую

подмышку, день инокуляции записывали как день 0. Через 7 дней успешное моделирование наблюдалось у всех мышей. 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 мышшь 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. 9 показано, что GPC3 CAR/CNK-UT-клетки обладают более высокой способностью к удалению опухоли у мышей, чем GPC3 CAR-T-клетки.

После создания модели на основе клеточной линии гепатокарциномы HepG2-Ffluc нетрансфицированные Т-клетки (слева), GPC3 CAR-T (в центре) или GPC3 CAR/CNK-UT (справа) вводили в количестве 2×10^6 клеток на мышшь, и рост опухоли контролировали еженедельно 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 мышшиной модели.

На Фиг. 10 показано, что GPC3 CAR/CNK-UT-клетки обладают более высокой способностью к удалению опухоли, чем GPC3 CAR-T-клетки.

С учетом кривой флуоресценции опухоли, построенной на основе количественной оценки флуоресцентного изображения Фиг. 10, можно видеть, что контрольные Т-клетки (синие) и GPC3 CAR-T (красные) не способны полностью ингибировать рост опухоли, однако GPC3 CAR/CNK-UT (зеленые) могут значительно ингибировать рост опухоли. Флуоресценция опухоли постепенно уменьшалась, пока не стала невидимой, что подтверждает противоопухолевый эффект клеток GPC3 CAR/CNK-UT на мышшиных моделях.

Результаты вышеупомянутых экспериментов были следующими. У мышшей отрицательного контроля размер опухоли постепенно увеличивался, первый случай смерти был между 28 и 42 днями, и ни одна из мышшей 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 GPC3CAR/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 CNK-UT-клеток, в то время как животные в группе изотипического контроля (введение GPC3-CAR-T) и группе отрицательного контроля (введение контрольных Т-клеток) показали постепенное снижение массы тела по мере прогресса эксперимента.

Вышеупомянутые экспериментальные результаты позволяют предположить, что после различных видов обработки, опухоли у мышей, которым вводили контрольные Т-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.

8.2 Способность направленного цитолиза и активации у CNK-UT-клеток в случае трижды негативной клетки рака молочной железы MDA-MB453

На Фиг. 11 показано, что GPC3 CAR/CNK-UT могут специфически распознавать и уничтожать клетку трижды негативного рака молочной железы MDA-MB453.

В эксперименте по совместному культивированию Т-клеток и опухолевых клеток добавляли нетрансфицированные Т-клетки, обычные Т-GPC3 CAR-T-клетки, CNK-UT-клетки или GPC3 CAR/CNK-UT-клетки в соотношении эффект-мишень 1:5 к клеткам MDA-MB453, соответственно. После совместного культивирования в течение 24 часов все клетки отделяли и детектировали с помощью технологии проточной цитометрии. Опухолевые клетки и Т-клетки различали по наличию CD45, затем экспрессию NK-модулей NKG2D, а также поверхностных маркеров активации CD25 анализировали для клеток CD8 и CD4.

MDA-MB453 представляет собой линию клеток трижды негативного рака молочной железы. Клетки не экспрессируют GPC3, поэтому GPC3 CAR-T не могут элиминировать MDA-MB453 (после совместного культивирования в течение 24 часов в системе все еще существует большое количество CD45-отрицательных опухолевых клеток), в то время как продукты CNK-UT могут эффективно убивать и уничтожать опухолевые клетки. Среди CD45(+) Т-клеток CD8(+) и CD4(+) Т-клетки в высокой степени экспрессируют элемент CNK NKG2D и активируют маркер активации Т-клеток CD25.

8.3 Способность направленного цитолиза и активации у CNK-UT-клеток в случае клеточной линии острого миелолейкоза THP1

На Фиг. 12 показано, что GPC3 CAR/CNK-UT могут специфически распознавать и уничтожать клеточную линию острого миелолейкоза THP1.

В эксперименте по совместному культивированию Т-клеток и опухолевых клеток добавляли нетрансфицированные Т-клетки, Т-GPC3 CAR-T-клетки, CNK-UT-клетки и GPC3 CAR/CNK-UT-клетки в соотношении эффект-мишень 1:5 к клеткам THP1, соответственно. Через 24 часа все клетки отделяли и детектировали с помощью технологии проточной цитометрии. Опухолевые клетки и Т-клетки различали по наличию CD3. Затем их анализировали по экспрессии поверхностных маркеров CD123 и CLL1 на CD3(-) опухолевых клетках, а также по экспрессии маркеров поверхностной активации CD25 и CD137 CD3(+) клеток.

Результаты показывают, что THP1 представляет собой линию клеток лейкоза, не экспрессирующую GPC3, поэтому GPC3 CAR-T не может элиминировать THP1. После 24 часов совместного культивирования опухолевые клетки CD3(-), CD123(+), CLL1(+) все еще существуют в системе в большом количестве. Однако продукт GPC3 CAR/CNK-UT может эффективно убивать и уничтожать опухолевые клетки. Обнаружение маркеров активации Т-клеток CD25 и CD137 с повышенным уровнем экспрессии в CD3(+) Т-клетках указывает на то, что GPC3 CAR/CNK-UT могут специфически распознавать клетки THP1, активироваться, убивать и элиминировать опухолевые клетки.

Пример 9. Способность CNK-UT-клеток с модернизированными элементами NCR уничтожать и элиминировать различные опухоли.

В этом примере изучались способности CNK-UT-клеток, которые были получены на основе примера 5 и содержали модернизированные элементы NCR, уничтожать и элиминировать различные опухоли. Линию опухолевых клеток почечно-клеточной карциномы (ПКК) 786-О приобрели у Pronose (CL-0010); линию опухолевых клеток почечно-клеточной карциномы (ПКК) ACHN приобрели у Pronose (CL-0021); линия опухолевых клеток эпителиальной аденомы (эпителиальной карциномы легкого) A549

приобрели у Pronose (CL-0016); линию опухолевых клеток острого миелолейкоза UL60 приобрели у Pronose (CL-0110).

9.1 CNK-UT-клетки распознают и специфически уничтожают линию опухолевых клеток ПКК 786-0.

Получение NCR2 CAR/CNK-UT-клеток: согласно Примерам 3-5, нуклеотидную последовательность NCR2-CD28-CD3 ζ (SEQ ID NO: 124, кодируемая ею аминокислотная последовательность показана в SEQ ID NO: 123) синтезировали синтезом всего гена; нуклеотидную последовательность DAP10-CD3 ζ -T2A-NKG2D-p2A-анти-TCR scFv-AdE3 синтезировали синтезом всего гена. Последовательности соединили с лентивирусным вектором pCDH-CMV-MCS-EF1 α -Puго молекулярным клонированием для получения плазмиды и лентивируса для трансфекции Т-клеток. После размножения трансфицированных Т-клеток получали NCR2 CAR/CNK-UT-клетки.

Фиг. 13 иллюстрирует способность к распознаванию, специфическому уничтожению и активации CNK-UT-клеток в случае клеток почечно-клеточной карциномы 786-0.

В эксперименте по совместному культивированию Т-клеток и опухолевых клеток линию клеток ПКК 786-0 подсчитывали и распределяли в количестве $0,5 \times 10^6$ клеток/лунку в 24-луночном планшете. Нетрансфицированные Т-клетки или NCR2 CAR/CNK-UT-клетки (NCR2-CD28-CD3 ζ ; DAP10-CD3 ζ -T2A-NKG2D-p2A-анти-TCR scFv-AdE3) добавляли, соответственно, в соотношении эффектор-мишень 1:1 и 2:1 к опухолевым клеткам. Через 24 часа все клетки центрифугировали, собирали и обрабатывали антителами 7-AAD, CD45-APC-Cy5.5, CD8-APC, NKG2D-PE-Cy7, Nkp44-PE и CD137-Pacific Blue (приобретенными у Biolegend) для окрашивания. Окрашенные клетки детектировали проточной цитометрией. Экспериментальные данные показали, что NCR2 CAR/CNK-UT-клетки могут эффективно убивать клетки 786-0. В системе культивирования с E:T=1:1 после 48 часов совместного культивирования опухолевые клетки в контрольной группе составляли 59,9%, а контрольные Т-клетки не экспрессировали Nkp44 и не имели положительной регуляции маркера активации CD137. Однако в системе совместного культивирования NCR2CAR/CNK-UT-клеток опухолевые клетки составляли только 2,29%, а 12,8% CD8⁺ Т-клеток имели положительную регуляцию экспрессии CD137. В системе культивирования с E:T=2:1 после 48 часов совместного культивирования опухолевые клетки в контрольной группе составляли 32,9%, а контрольные Т-клетки не экспрессировали Nkp44 и не имели положительной регуляции маркера активации CD137. Напротив, в системе совместного культивирования NCR2CAR/CNK-UT-клеток опухолевые клетки составляли только 0,83%, а 13,3% CD8⁺ Т-

клеток имели положительную регуляцию экспрессии CD137. Видно, что модернизация модулей NCR может еще больше повысить способность CNK-UT-клеток уничтожать и элиминировать различные опухоли.

9.2 CNK-UT-клетки распознают и специфически уничтожают линию опухолевых клеток почечно-клеточной карциномы (ПКК) ACHN.

Фиг. 14 иллюстрирует способность к распознаванию, специфическому уничтожению и активации CNK-UT-клеток в случае клеток почечно-клеточной карциномы ACHN.

В эксперименте по совместному культивированию Т-клеток и опухолевых клеток клеточную линию ПКК ACHN подсчитывали и распределяли в количестве $0,5 \times 10^6$ клеток/лунку в 24-луночном планшете. Нетрансфицированные Т-клетки или NCR2 CAR/CNK-UT-клетки (NCR2-CD28-CD3 ζ ; DAP10-CD3 ζ -T2A-NKG2D-p2A-анти-TCR scFv-AdE3) добавляли, соответственно, в соотношении эффектор-мишень 1:1 и 2:1 к опухолевым клеткам. Через 24 часа все клетки центрифугировали, собирали и обрабатывали антителами 7-AAD, CD45-APC-Cy5.5, CD8-APC, NKG2D-Cy7, Nkp44-PE и CD137-Pacific Blue (приобретенными у Biolegend) для окрашивания. Окрашенные клетки детектировали проточной цитометрией. Экспериментальные данные показали, что NCR2 CAR/CNK-UT-клетки могут эффективно убивать опухолевые клетки ACHN. В системе культивирования с Е:Т=1:1 после 48 часов совместного культивирования опухолевые клетки в контрольной группе составляли 48,1%, а контрольные Т-клетки не экспрессировали Nkp44 и не имели положительной регуляции маркера активации CD137. Однако в системе совместного культивирования с NCR2 CAR/CNK-UT-клетками опухолевые клетки составляли только 17,9%, а 32,1% CD8⁺ Т-клеток имели положительную регуляцию экспрессии CD137. В системе культивирования с Е:Т=2:1 после 48 часов совместного культивирования опухолевые клетки в контрольной группе составляли 30,8%, а контрольные Т-клетки не экспрессировали Nkp44 и не имели положительной регуляции маркера активации CD137. Однако в системе совместного культивирования с NCR2 CAR/CNK-UT-клетками опухолевые клетки составляли только 6,57%, а 30,4% CD8⁺ Т-клеток имели положительную регуляцию экспрессии CD137.

9.3 CNK-UT-клетки распознают и специфически уничтожают линию клеток эпителиальной карциномы легкого A549.

Фиг. 15 иллюстрирует способность к распознаванию, специфическому уничтожению и активации CNK-UT-клеток в случае клеток легочной эпителиальной аденомы A549.

В эксперименте по совместному культивированию Т-клеток и опухолевых клеток

клеточную линию рака легких A549 подсчитывали и распределяли в количестве $0,5 \times 10^6$ клеток/лунку в 24-луночном планшете. Нетрансфицированные Т-клетки или NCR2 CAR/CNK-UT-клетки (NCR2-CD28-CD3 ζ ; DAP10-CD3 ζ -T2A-NKG2D-p2A-анти-TCR scFv-AdE3) добавляли, соответственно, в соотношении эффектор-мишень 1:1 и 2:1 к опухолевым клеткам. Через 24 часа все клетки центрифугировали, собирали и обрабатывали антителами 7-AAD, CD45-APC-Cy5.5, CD8-APC, NKG2D-PE-Cy7, NKp44-PE и CD137-Pacific Blue (приобретенными у Biolegend) для окрашивания. Окрашенные клетки детектировали проточной цитометрией. Экспериментальные данные показали, что NCR2 CAR/CNK-UT-клетки могут эффективно убивать опухолевые клетки A549. В системе культивирования с E:T=1:1 после 48 часов совместного культивирования опухолевые клетки в контрольной группе составляли 49,4%, а контрольные Т-клетки не экспрессировали Nkp44 и не имели положительной регуляции маркера активации CD137. Однако в системе совместного культивирования с NCR2 CAR/CNK-UT-клетками опухолевые клетки составляли только 35,4%, а 27,4% CD8+ Т-клеток имели положительную регуляцию экспрессии CD137. В системе культивирования с E:T=2:1 после 48 часов совместного культивирования опухолевые клетки в контрольной группе составляли 43,7%, а контрольные Т-клетки не экспрессировали Nkp44 и не имели положительной регуляции маркера активации CD137. В системе совместного культивирования с NCR2 CAR/CNK-UT-клетками опухолевые клетки составляли только 5,27%, а 34,1% CD8+ Т-клеток имели положительную регуляцию экспрессии CD137.

9.4 CNK-UT-клетки распознают и специфически уничтожают клеточную линию острого миелолейкоза UL60.

Фиг. 16 иллюстрирует способность к распознаванию, специфическому уничтожению и активации CNK-UT-клеток в случае клеточной линии ОМЛ UL60.

В эксперименте по совместному культивированию Т-клеток и опухолевых клеток клеточную линию рака легкого UL60 подсчитывали и распределяли в количестве $0,5 \times 10^6$ клеток/лунку в 24-луночном планшете. Нетрансфицированные Т-клетки или NCR2 CAR/CNK-UT-клетки (NCR2-CD28-CD3 ζ ; DAP10-CD3 ζ -T2A-NKG2D-p2A-анти-TCR scFv-AdE3) добавляли, соответственно, в соотношении эффектор-мишень 1:1 и 2:1 к опухолевым клеткам. Через 24 часа все клетки центрифугировали, собирали и обрабатывали антителами 7-AAD, CD45-APC-Cy5.5, CD8-APC, NKG2D-PE-Cy7, NKp44-PE и CD137-Pacific Blue (приобретенными у Biolegend) для окрашивания. Окрашенные клетки детектировали проточной цитометрией. Экспериментальные данные показали, что NCR2 CAR/CNK-UT-клетки могут эффективно убивать опухолевые клетки UL60. В системе культивирования с E:T=1:1 после 48 часов совместного культивирования

опухолевые клетки CD3(-) составляли 57,3% в контрольной группе, а контрольные Т-клетки не экспрессировали Nkp44 и не имели положительной регуляции маркера активации CD137. Однако в системе совместного культивирования с NCR2 CAR/CNK-UT-клетками опухолевые клетки составляли только 7,41%, а 10,6% CD8+ Т-клеток имели положительную регуляцию экспрессии CD137. В системе культивирования с Е:Т=2:1 после 48 часов совместного культивирования опухолевые клетки составляли 30,1% в контрольной группе, а контрольные Т-клетки не экспрессировали Nkp44 и не имели положительной регуляции маркера активации CD137. Однако в системе совместного культивирования с NCR2 CAR/CNK-UT-клетками опухолевые клетки составляли только 3,7%, а 8,11% CD8+ Т-клеток имели положительную регуляцию экспрессии CD137.

Пример 10: Оптимизация конструкции элементов UT для улучшения CNK-UT-клеток с точки зрения распознавания и специфического уничтожения линии опухолевых клеток U937.

Получение CNK-UT(UL16)- и CNK-UT(UL16/E3-19K)-клеток: согласно Примерам 3-5, нуклеотидную последовательность DAP10-CD3 ζ -T2A-NKG2D (кодируемая ею аминокислотная последовательность показана в SEQ ID NO: 125) синтезировали синтезом всего гена; нуклеотидную последовательность анти-TCR scFv-AdE3-p2A-UL16 (кодируемая ею аминокислотная последовательность показана в SEQ ID NO: 126) синтезировали синтезом всего гена; нуклеотидную последовательность анти-TCR scFv-AdE3-p2A-UL16-p2A-E3-19K (кодируемая ею аминокислотная последовательность показана в SEQ ID NO: 127) синтезировали синтезом всего гена. Последовательности были связаны с лентивирусным вектором pCDH-CMV-MCS-EF1 α -Puro молекулярным клонированием для подготовки плазмиды и лентивируса для трансфекции Т-клеток. После размножения трансфицированных Т-клеток были получены CNK-UT(UL16)- и CNK-UT(UL16/E3-19K)-клетки.

Фиг. 17 иллюстрирует способность к распознаванию, специфическому уничтожению и активации CNK-UT-клеток в случае клеточной линии AML U937 (приобретенной у U937, артикул CL-0239).

В эксперименте по совместному культивированию Т-клеток и опухолевых клеток клеточную линию рака легкого U937-GFP подсчитывали и распределяли по $0,5 \times 10^6$ клеток/лунку в 24-луночной планшете. Нетрансфицированные Т-клетки, CNK-UT(UL16)-клетки (DAP10-CD3 ζ -T2A-NKG2D; анти-TCR scFv-AdE3-p2A-UL16) или CNK-UT(UL16/E3-19K)-клетки (DAP10-CD3 ζ -T2A-NKG2D; анти-TCR scFv-AdE3-p2A-UL16-p2A-E3-19K) добавляли, соответственно, в соотношении эффектор-мишень 1:1 к опухолевым клеткам. Через 24 часа все клетки центрифугировали, собирали и

обрабатывали антителами 7-AAD, CD33-APC-Cy5.5, CD8-Pacific Blue, NKG2D-APC, CD137-PE-Cy7 (приобретенными у Biolegend) для окрашивания. Окрашенные клетки детектировали проточной цитометрией. Экспериментальные данные показали, что конструкция CNK-UT (UL16/E3-19K) имела более высокую эффективность в уничтожении опухолевых клеток U937, чем CNK-UT-клетки (UL16). В системе культивирования с E:T=1:1 после 48 часов совместного культивирования опухолевые клетки CD33(+) составляли 69,8% в контрольной группе, а контрольные Т-клетки не имели положительной регуляции маркера активации CD137. В системе совместного культивирования CNK-UT-клеток (UL16) опухолевые клетки CD33+ GFP+ составляли только 4,69%, в то время как 23,07% Т-клеток имели положительную регуляцию экспрессии CD137. В системе совместного культивирования CNK-UT-клеток (UL16/E3-19K) опухолевые клетки составляли только 0,079%, а 54,7% Т-клеток имели положительную регуляцию экспрессии CD137.

Пример 11: Оптимизация конструкции NK-элементов для улучшения CNK-UT-клеток против линий опухолевых клеток

11.1 Оптимизация конструкции NK-элементов для улучшения CNK-UT-клеток с точки зрения распознавания и специфического уничтожения линии опухолевых клеток U937.

Получение клеток NCR1 CAR-T, NCR2 CNK-UT и NCR1/2 CNK-UT: согласно Примерам 3-5, нуклеотидную последовательность NCR1-CD28-CD3 ζ (кодируемая ею аминокислотная последовательность показана в SEQ ID NO: 128) синтезировали синтезом всего гена; нуклеотидную последовательность DAP10-CD3 ζ -T2A-NKG2D-p2A-анти-TCR scFv-AdE3 (кодируемая ею аминокислотная последовательность показана в SEQ ID NO: 117) синтезировали синтезом всего гена; нуклеотидную последовательность NCR2-CD28-CD3 ζ (кодируемая ею аминокислотная последовательность показана в SEQ ID NO: 123) синтезировали синтезом всего гена; нуклеотидную последовательность NCR2-CD28-CD3 ζ -p2A-NCR1-CD28-CD3 ζ (кодируемая ею аминокислотная последовательность показана в SEQ ID NO: 129) синтезировали синтезом всего гена. Последовательности были связаны с лентивирусным вектором pCDH-CMV-MCS-EF1 α -Puro молекулярным клонированием для подготовки плазмиды и лентивируса для трансфекции Т-клеток. После размножения трансфицированных Т-клеток были получены NCR1 CAR-T-клетки, NCR2 CNK-UT и NCR1/2 CNK-UT.

Фиг. 18 иллюстрирует способность к распознаванию, специфическому уничтожению и активации CNK-UT-клеток в случае клеточной линии ОМЛ U937.

В эксперименте по совместному культивированию Т-клеток и опухолевых клеток

клеточную линию рака легкого U937-GFP подсчитывали и распределяли по $0,5 \times 10^6$ клеток/лунку в 24-луночном планшете. Нетрансфицированные Т-клетки, NCR1 CAR-Т-клетки (NCR1-CD28-CD3 ζ), клетки NCR2 CNK-UT (DAP10-CD3 ζ -T2A-NKG2D-p2A-анти-TCR scFv-AdE3; NCR2-CD28-CD3 ζ) и NCR1/ 2 CNK-UT-клетки (DAP10-CD3 ζ -T2A-NKG2D-p2A-анти-TCR scFv-AdE3; NCR2-CD28-CD3 ζ -p2A-NCR1-CD28-CD3 ζ) добавляли соответственно при соотношении эффекта к мишени 1:1 и 2:1. Через 48 часов клетки наблюдали и фотографировали под флуоресцентным микроскопом. Экспериментальные данные показали, что добавление элементов распознавания NK может значительно улучшить цитолитический эффект CNK-UT-клеток против опухолевых клеток U937.

11.2 Оптимизация конструкции NK-элементов для улучшения CNK-UT-клеток с точки зрения распознавания и специфического уничтожения линии опухолевых клеток U937.

Фиг. 19 иллюстрирует способность распознавания, специфического уничтожения и активации CNK-UT-клеток в случае клеточной линии рака поджелудочной железы PANC-1 (приобретенной у Pnoxil, артикул CL-0184).

Получение клеток NCR1 CAR-Т, NCR2 CNK-UT и NCR1/2 CNK-UT: согласно Примерам 3-5, нуклеотидную последовательность NCR1-CD28-CD3 ζ -p2A-tEGFR (кодируемая ими аминокислотная последовательность показана на SEQ ID NO: 130) синтезировали синтезом всего гена; нуклеотидную последовательность DAP10-CD3 ζ -T2A-NKG2D-p2A-анти-TCR scFv-AdE3 (кодируемая ими аминокислотная последовательность показана в SEQ ID NO: 117) синтезировали синтезом всего гена; нуклеотидную последовательность NCR2-CD28-CD3 ζ -p2A-tEGFR (кодируемая ими аминокислотная последовательность показана в SEQ ID NO: 131) синтезировали синтезом всего гена; нуклеотидную последовательность NCR2-CD28-CD3 ζ -p2A-NCR1-CD28-CD3 ζ (кодируемая ими аминокислотная последовательность показана в SEQ ID NO: 129) синтезировали синтезом всего гена. Последовательности были связаны с лентивирусным вектором pCDH-CMV-MCS-EF1 α -Puго молекулярным клонированием для подготовки плазмиды и лентивируса для трансфекции Т-клеток. После размножения трансфицированных Т-клеток были получены NCR1 CAR-Т-клетки, NCR2 CNK-UT и NCR1/2 CNK-UT.

В эксперименте по совместному культивированию Т-клеток и опухолевых клеток линию клеток рака поджелудочной железы PANC-1-GFP подсчитывали и распределяли в количестве $0,5 \times 10^6$ клеток/лунку в 24-луночном планшете. Нетрансфицированные Т-клетки, NCR1 CAR-Т-клетки (NCR1-CD28-CD3 ζ -p2A-tEGFR), клетки NCR2 CNK-UT (DAP10-CD3 ζ -T2A-NKG2D-p2A-анти-TCR scFv-AdE3; NCR2-CD28-CD3 ζ -p2A-tEGFR) или NCR1/2 CNK-UT (DAP10-CD3 ζ -T2A-NKG2D-p2A-анти-TCR scFv-AdE3; NCR2-CD28-

CD3 ζ -p2A-NCR1-CD28-CD3 ζ) добавляли, соответственно, при соотношении эффектор-мишень 1:1 к опухолевым клеткам. Через 48 часов все клетки центрифугировали, собирали и обрабатывали антителами 7-AAD, CD33-APC-Cy5.5, CD8-Pacific Blue, NKG2D-APC, NKp44-PE или EGFR-PE, CD137-PE-Cy7 (приобретены в компании Biolegend) для окрашивания. Окрашенные клетки детектировали проточной цитометрией. Экспериментальные данные показали, что по сравнению с NCR2 CAR/CNK-UT, CNK-UT, созданный путем объединения NCR1 и NCR2 CAR, обладал большей способностью эффективного уничтожения и активации опухолевых клеток PANC-1 рака поджелудочной железы. В системе культивирования с E:T=1:1 через 48 часов совместного культивирования опухолевые клетки GFP(+) CD45(-) составляли 65,7% в контрольной группе при показателе проточной цитометрии 6653. Контрольные T-клетки не имели положительной регуляции маркера активации CD137. В системе совместного культивирования NCR1 CAR-T-клеток опухолевые клетки GFP (+) CD45 (-) составляли только 28,3%, количество проточной цитометрии составило 2567, а 16,65% T-клеток имели положительную регуляцию экспрессии CD137. В системе совместного культивирования NCR2 CNK-UT-клеток опухолевые клетки составляли только 15,6%, количество проточной цитометрии составило 1368, в то время как 20,89% T-клеток имели положительную регуляцию экспрессии CD137. В системе совместного культивирования клеток NCR1/2 CNK-UT опухолевые клетки составляли только 7,71%, количество проточной цитометрии составило 662, а 21,9% T-клеток имели положительную регуляцию экспрессии CD137.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Многофункциональный комплекс, включающий следующие модули:

(1) модуль рецептора, активирующего НК, содержащий по меньшей мере рецептор активации НК-клеток, или его функциональный вариант, причем рецептор активации НК-клеток, содержит: (а) внеклеточный домен (ED) рецептора активации НК-клеток или его функциональный вариант, (b) трансмембранный домен (TMD) рецептора активации НК-клеток, или его функциональный вариант, и (с) внутриклеточный домен (ICD) рецептора активации НК-клеток, или его функциональный вариант; и необязательно шарнир или линкер включен между внеклеточным доменом рецептора активации НК-клеток, или его функциональным вариантом, трансмембранным доменом рецептора активации НК-клеток, или его функциональным вариантом, и/или внутриклеточным доменом рецептора активации НК-клеток, или его функциональным вариантом;

(2) модуль передачи сигнала CNK, содержащий по меньшей мере (i) сигнальный адаптер НК-клетки или его функциональный вариант, причем сигнальный адаптер НК-клетки содержит: (а) внеклеточный домен (ED) сигнального адаптера НК-клетки или его функциональный вариант, (b) трансмембранный домен (TMD) сигнального адаптера НК-клетки или его функциональный вариант и (с) внутриклеточный домен (ICD) сигнального адаптера НК-клетки или его функциональный вариант; и где, 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; и

(3) модуль UT, содержащий по меньшей мере (i) молекулу рекомбинантного белка для направленной деградации TCR, MHC и/или мишени НК-клетки, или ее функциональный вариант, причем молекула рекомбинантного белка для направленной деградации TCR, MHC и/или мишени НК-клетки содержит: (а) молекулярный домен связывающего белка, нацеленного на TCR, MHC и/или мишень НК-клетки, или его функциональный вариант, (b) трансмембранный домен вирусного гликопротеина, резидентного в эндоплазматическом ретикулуме (ЭР) или его функциональный вариант и (с) цитоплазматический домен вирусного гликопротеина, резидентного в эндоплазматическом ретикулуме, 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,

образуют домен деградации ERAD; необязательно, молекулярный домен связывающего белка, нацеленного на TCR, или его функциональный вариант, трансмембранный домен вирусного гликопротеина, резидентного в эндоплазматическом ретикулуме, или его функциональный вариант, и/или цитоплазматический домен вирусного гликопротеина, резидентного в эндоплазматическом ретикулуме, или его функциональный вариант, содержат шарнир или линкер;

необязательно, шарниры или линкеры включены между модулем рецептора, активирующего NK, модулем передачи сигнала CNK и/или модулем UT.

2. Многофункциональный комплекс по п. 1, отличающийся тем, что рецептор активации NK-клеток, в модуле рецептора, активирующего NK, выбран из группы, состоящей из NKG2D, NKG2C, NKG2E, NKG2F, NKG2H, CD94, KIR2DL4, KIR2DS1, KIR2DS2, KIR2DS4, KIR3DS1, натуральных цитотоксических рецепторов, TRAIL, DNAM-1, CD16a, 2B4, NTB-A, CRACC и NKp80; предпочтительно натуральные цитотоксические рецепторы выбраны из NKp46, NKp44 и NKp30;

предпочтительно рецептор активации NK-клеток представляет собой рецептор активации NK-клеток млекопитающих; предпочтительно млекопитающее выбрано из числа человека, примата, крысы, лошади, коровы, овцы, козы, кошки, свиньи, собаки, ламы, альпаки, слона, белки, морской свинки;

предпочтительно рецептор активации NK-клеток представляет собой рекомбинантный рецептор активации NK-клеток, содержащий различные исходные домены, активирующие NK-клетки;

предпочтительно рецептор активации NK-клеток представляет собой рецептор активации NK-клеток человека; и предпочтительно, рецептор активации NK-клеток представляет собой рекомбинантный рецептор активации NK-клеток, содержащий различные исходные и человеческие домены, активирующие NK-клетки;

предпочтительно рецептор активации NK-клеток представляет собой рецептор активации NK-клеток мыши; и предпочтительно, рецептор активации NK-клеток представляет собой рекомбинантный рецептор активации NK-клеток, содержащий различные исходные и мышинные домены, активирующие NK-клетки;

предпочтительно, рецептор активации NK-клеток представляет собой рекомбинантный рецептор активации NK-клеток, содержащий домен рецептора активации NK-клеток человека, и домен рецептора активации NK-клеток мыши;

предпочтительно внеклеточный домен рецептора активации NK-клеток представляет собой внеклеточный домен рецептора активации NK-клеток человека или мыши;

предпочтительно трансмембранный домен рецептора активации NK-клеток представляет собой трансмембранный домен рецептора активации NK-клеток человека или мыши;

предпочтительно внутриклеточный домен рецептора активации NK-клеток представляет собой внутриклеточный домен рецептора активации NK-клеток человека или мыши;

предпочтительно функциональный вариант рецептора активации NK-клеток, выбран из мутанта рецептора активации NK-клеток, гибридного белка дикого типа или гибридного белка дикого типа и мутанта;

предпочтительно, внеклеточный домен NKG2D человека включает аминокислотную последовательность, имеющую 80% или более идентичности с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 1, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность внеклеточного домена NKG2D человека показана как SEQ ID NO: 1;

предпочтительно, полноразмерная последовательность NKG2D человека включает аминокислотную последовательность, имеющую 80% или более идентичности с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 2, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность полноразмерной последовательности NKG2D человека показана как SEQ ID NO: 2;

предпочтительно, внеклеточный домен NKG2D мыши включает аминокислотную последовательность, имеющую 80% или более идентичности с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 3, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность внеклеточного домена NKG2D мыши показана как SEQ ID NO: 3;

предпочтительно, полноразмерная последовательность NKG2D мыши включает аминокислотную последовательность, имеющую 80% или более идентичности с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 4, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%,

98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность полноразмерной последовательности NKG2D мыши показана как SEQ ID NO: 4;

предпочтительно, полноразмерная последовательность рекомбинантного NKG2D человека и мыши включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 5, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентификацию 85%, 90 %, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность полноразмерной последовательности рекомбинантного NKG2D человека и мыши показана как SEQ ID NO: 5;

предпочтительно, полноразмерная последовательность NKG2C человека включает аминокислотную последовательность, имеющую 80% или более идентичности с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 6, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность полноразмерной последовательности NKG2C человека показана как SEQ ID NO: 6;

предпочтительно, полноразмерная последовательность NKG2E человека включает аминокислотную последовательность, имеющую 80% или более идентичности с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO:7, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность полноразмерной последовательности NKG2E человека показана как SEQ ID NO: 7;

предпочтительно, полноразмерная последовательность NKG2F человека включает аминокислотную последовательность, имеющую 80% или более идентичности с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 8, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная

последовательность полноразмерной последовательности NKG2F человека показана как SEQ ID NO: 8;

предпочтительно, полноразмерная последовательность CD94 человека включает аминокислотную последовательность, имеющую 80% или более идентичности с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 9, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую 85%, 90% идентичности, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность полноразмерной последовательности CD94 человека показана как SEQ ID NO: 9;

предпочтительно, полноразмерная последовательность KIR2DL4 человека включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 10, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность полноразмерной последовательности KIR2DL4 человека показана как SEQ ID NO: 10;

предпочтительно, полноразмерная последовательность KIR2DS1 человека включает аминокислотную последовательность, имеющую 80% или более идентичности с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 11, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность полноразмерной последовательности KIR2DS1 человека показана как SEQ ID NO: 11;

предпочтительно, полноразмерная последовательность KIR2DS2 человека включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 12, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность полноразмерной последовательности KIR2DS2 человека показана как SEQ ID NO: 12;

предпочтительно, полноразмерная последовательность KIR2DS4 человека

ID NO: 21;

предпочтительно, полноразмерная последовательность NTB-A человека включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 22, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность полноразмерной последовательности NTB-A человека показана как SEQ ID NO: 22;

предпочтительно, полноразмерная последовательность CRACC человека включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 23, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность полноразмерной последовательности CRACC человека показана как SEQ ID NO: 23; и

предпочтительно, полноразмерная последовательность NKp80 человека включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 24, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность полноразмерной последовательности NKp80 человека показана как SEQ ID NO: 24.

3. Многофункциональный комплекс по п. 1 или 2, отличающийся тем, что адаптером сигнала НК-клетки в модуле передачи сигнала CNK является DAP10 или DAP12;

предпочтительно сигнальный адаптер НК-клетки представляет собой сигнальный адаптер НК-клетки млекопитающих; предпочтительно млекопитающее выбрано из человека, примата, крысы, лошади, коровы, овцы, козы, кошки, свиньи, собаки, ламы, альпаки, слона, белки, морской свинки;

предпочтительно сигнальный адаптер НК-клетки представляет собой рекомбинантный сигнальный адаптер НК-клетки, содержащий различные исходные домены сигнального адаптера НК-клетки;

предпочтительно сигнальный адаптер NK-клетки представляет собой сигнальный адаптер NK-клетки человека; предпочтительно сигнальный адаптер NK-клетки представляет собой рекомбинантный сигнальный адаптер NK-клетки, содержащий различные домены сигнального адаптера NK-клетки человека;

предпочтительно сигнальный адаптер NK-клетки представляет собой сигнальный адаптер NK-клетки мыши; предпочтительно сигнальный адаптер NK-клетки представляет собой рекомбинантный сигнальный адаптер NK-клетки, содержащий различные домены сигнального адаптера NK-клетки мыши;

предпочтительно сигнальный адаптер NK-клетки представляет собой рекомбинантный сигнальный адаптер NK-клетки, содержащий адаптерный домен сигнала NK-клетки человека и адаптерный домен сигнала NK-клетки мыши;

предпочтительно внеклеточный домен сигнального адаптера NK-клетки представляет собой внеклеточный домен сигнального адаптера NK-клетки человека или мыши;

предпочтительно трансмембранный домен сигнального адаптера NK-клетки представляет собой трансмембранный домен сигнального адаптера NK-клетки человека или мыши;

предпочтительно внеклеточный домен сигнального адаптера NK-клетки представляет собой внеклеточный домен сигнального адаптера NK-клетки человека или мыши;

функциональный вариант сигнального адаптера клетки CNK выбран из мутанта DAP10 или DAP12, или гибридного белка DAP10 и DAP12, или гибридного белка DAP10 или DAP12 дикого типа с мутантным типом DAP10 или DAP12;

предпочтительно компонент передачи сигнала CNK дополнительно включает (ii) домен передачи сигнала активации иммунного рецептора (ITAM) и/или (iii) костимулирующий домен передачи сигнала T-клеток;

предпочтительно шарнир или линкер включен между сигнальным адаптером NK-клетки или его функциональным вариантом, доменом передачи сигнала активации иммунного рецептора (ITAM) и/или костимулирующим доменом передачи сигнала T-клеток; предпочтительно сигнальный адаптер NK-клетки или его функциональный вариант объединен с доменом передачи сигнала активации иммунного рецептора (ITAM);

предпочтительно домен передачи сигнала активации иммунорецептора (ITAM) происходит из внутриклеточного домена передачи сигнала активации иммунорецептора; предпочтительно иммунорецептор 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 иммунорецептора (ITAM) объединен с адаптером сигнала NK-клетки или его функциональным вариантом; и предпочтительно иммунорецептор представляет собой CD3ζ;

предпочтительно, костимулирующий домен передачи сигнала T-клетки происходит из внутриклеточного домена передачи сигнала костимулирующей молекулы; 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, 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(KLRP1), NKp44, NKp30, NKp46, CD19, CD4, CD8α, CD8β, IL2Rβ, IL2Rγ, IL7Rα, 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(Tactile), CEACAM1, CRTAM, Ly9(CD229), CD160(BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), 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, FcRγ, Fyn, HVEM, ICOS, Lck, LAG3, LAT, LRP, NOTCH1, Wnt, OX40, ROR2, Ryk, SLAMF1, Slp76, pTa, TCRα, TCRβ, TRIM, ZAP70 и PTCH2;

предпочтительно, полноразмерная последовательность DAP10 человека включает аминокислотную последовательность, имеющую 80% или более идентичности с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 25, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность полноразмерной последовательности DAP10 человека показана как SEQ ID NO: 25;

предпочтительно, полноразмерная последовательность DAP10 человека включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 26, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность,

имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность полноразмерной последовательности DAP10 человека показана как SEQ ID NO: 26;

предпочтительно трансмембранный домен DAP10 человека включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 27, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность трансмембранного домена DAP10 человека показана как SEQ ID NO: 27;

предпочтительно, полноразмерная последовательность DAP12 человека включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 28, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность полноразмерной последовательности DAP12 человека показана как SEQ ID NO: 28;

предпочтительно трансмембранный домен DAP12 человека включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 29, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность трансмембранного домена DAP12 человека показана как SEQ ID NO: 29;

предпочтительно, гибридный белок трансмембранных доменов DAP10 человека и DAP12 человека включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 30, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность трансмембранных доменов DAP10 человека и DAP12 человека показана как SEQ ID NO: 30;

предпочтительно, последовательность гибридного белка DAP10-DAP12 человека включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 31, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность гибридного белка DAP10-DAP12 человека показана как SEQ ID NO: 31;

предпочтительно, последовательность внутриклеточного домена передачи сигнала CD3-дзета человека включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 32, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90 %, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность внутриклеточного домена передачи сигнала CD3-дзета человека показана как SEQ ID NO: 32;

предпочтительно последовательность DAP10-CD3-дзета человека включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 33, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность последовательности DAP10-CD3-дзета человека показана как SEQ ID NO: 33;

предпочтительно последовательность DAP12-CD3-дзета человека включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 34, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность последовательности DAP12-CD3-дзета человека показана как SEQ ID NO: 34;

предпочтительно последовательность DAP10-DAP12-CD3-дзета человека включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 35, предпочтительно

аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность последовательности DAP10-DAP12-CD3-дзета человека показана как SEQ ID NO: 35;

предпочтительно, последовательность внутриклеточного домена передачи сигнала 41BB человека включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 36, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность внутриклеточного домена передачи сигнала 41BB человека показана как SEQ ID NO: 36;

предпочтительно последовательность DAP10-41BB человека включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 37, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность последовательности DAP10 человека-41BB показана как SEQ ID NO: 37;

предпочтительно последовательность DAP10-41BB-CD3-дзета человека включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 38, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность последовательности DAP10-41BB-CD3-дзета человека показана как SEQ ID NO: 38;

предпочтительно, последовательность внутриклеточного домена передачи сигнала CD28 человека включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 39, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом

аминокислотная последовательность внутриклеточного домена передачи сигнала CD28 человека показана как SEQ ID NO: 39;

предпочтительно последовательность DAP10-CD28 человека включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 40, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность DAP10 человека-CD28 показана как SEQ ID NO: 40;

предпочтительно последовательность DAP10-CD28-CD3-дзета человека включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 41, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность последовательности DAP10-CD28-CD3-дзета человека показана как SEQ ID NO: 41;

предпочтительно последовательность DAP12-41BB человека включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 42, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность последовательности DAP12-41BB человека показана как SEQ ID NO: 42;

предпочтительно последовательность DAP12-41BB-CD3-дзета человека включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 43, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность последовательности DAP12-41BB-CD3-дзета человека показана как SEQ ID NO: 43;

предпочтительно последовательность DAP12-CD28 человека включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с

аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 44, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность последовательности DAP12-CD28 человека показана как SEQ ID NO: 44;

предпочтительно последовательность DAP12-CD28-CD3-дзета человека включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 45, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность последовательности DAP12-CD28-CD3-дзета человека показана как SEQ ID NO: 45;

4. Многофункциональный комплекс по любому из пп. 1-3, отличающийся тем, что в молекуле рекомбинантного белка для направленной деградации TCR модуля UT молекулярный домен связывающего белка, нацеленного на TCR, или его функциональный вариант получен из антитела к TCR или его функционального фрагмента или их комбинации;

предпочтительно 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; и функциональный фрагмент антитела выбран из Fd, Fv, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv (scFv), одноцепочечного антитела (scFv) или нанотела (нанотело), двухцепочечного антитела, трехцепочечного антитела и четырехцепочечного антитела; предпочтительно антитело к TCR представляет собой одноцепочечное антитело к TCR; предпочтительно аминокислотная последовательность одноцепочечного антитела к TCR включает аминокислотную последовательность, имеющую 80% или более идентичности, предпочтительно 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности, и более предпочтительно 98%, 99% или более идентичности аминокислотной последовательности, показанной в SEQ ID NO: 116; при этом аминокислотная последовательность полноразмерной последовательности одноцепочечного антитела к TCR показана как SEQ ID NO:116;

предпочтительно 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;

предпочтительно полноразмерная последовательность гликопротеина US2 HCMV включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 46, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность полноразмерной последовательности гликопротеина US2 HCMV показана как SEQ ID NO: 46;

предпочтительно, HLA-связывающий домен гликопротеина US2 HCMV включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 47, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность HLA-связывающего домена гликопротеина US2 HCMV показана как SEQ ID NO: 47;

предпочтительно, домен деградации ERAD гликопротеина US2 HCMV включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 48, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность домена деградации ERAD гликопротеина US2 HCMV показана как SEQ ID NO: 48;

предпочтительно, полноразмерная последовательность гликопротеина US3 HCMV включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 49, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность полноразмерной последовательности гликопротеина US3 HCMV показана как SEQ ID NO: 49;

предпочтительно, HLA-связывающий домен гликопротеина US3 HCMV включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 50, предпочтительно

аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность HLA-связывающего домена гликопротеина US3 HCMV показана как SEQ ID NO: 50;

предпочтительно, домен деградации ERAD гликопротеина US3 HCMV включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 51, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность домена деградации ERAD гликопротеина US3 HCMV показана как SEQ ID NO: 51;

предпочтительно, полноразмерная последовательность гликопротеина US11 HCMV включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 52, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность полноразмерной последовательности гликопротеина US11 HCMV показана как SEQ ID NO: 52;

предпочтительно, MHC-связывающий домен гликопротеина US11 HCMV включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 53, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность MHC-связывающего домена гликопротеина US11 HCMV показана как SEQ ID NO: 53;

предпочтительно, домен деградации ERAD гликопротеина US11 HCMV включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 54, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная

последовательность домена деградации ERAD гликопротеина US11 HCMV показана как SEQ ID NO: 54;

предпочтительно, полноразмерная последовательность гликопротеина US10 HCMV включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 55, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность полноразмерной последовательности гликопротеина US10 HCMV показана как SEQ ID NO: 55;

предпочтительно, HLA-связывающий домен гликопротеина US10 HCMV включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 56, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность HLA-связывающего домена гликопротеина US10 HCMV показана как SEQ ID NO: 56;

предпочтительно домен деградации ERAD гликопротеина US10 HCMV включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 57, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность домена деградации ERAD гликопротеина US10 HCMV показана как SEQ ID NO: 57;

предпочтительно, полноразмерная последовательность E3-19K аденовируса включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 58, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90 %, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность полноразмерной последовательности аденовируса E3-19K показана как SEQ ID NO: 58;

предпочтительно, MHC-связывающий домен E3-19K аденовируса включает

аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 59, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность МНС-связывающего домена E3-19K аденовируса показана как SEQ ID NO: 59;

предпочтительно, домен деградации ERAD E3-19K аденовируса включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 60, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность домена деградации ERAD E3-19K аденовируса показана как SEQ ID NO: 60;

предпочтительно, полноразмерная последовательность US21 HHV-7 включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 61, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность полноразмерной последовательности US21 HHV-7 показана как SEQ ID NO: 61;

предпочтительно, МНС-связывающий домен US21 HHV-7 включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 62, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность МНС-связывающего домена US21 HHV-7 показана как SEQ ID NO: 62;

предпочтительно, домен деградации ERAD US21 HHV-7 включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 63, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%

или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность домена деградации ERAD US21 HHV-7 показана как SEQ ID NO: 63;

5. Многофункциональный комплекс по любому из пп. 1-4, отличающийся тем, что модуль UT дополнительно содержит (ii) молекулярный домен связывающего белка, нацеленного на МНС I и/или МНС II, или его функциональный вариант;

предпочтительно, молекулярный домен связывающего белка, нацеленного на МНС I и/или МНС II, или его функциональный вариант представляет собой молекулярный домен связывающего белка, нацеленного на HLA, или его функциональный вариант;

предпочтительно молекулярный домен связывающего белка, нацеленного на МНС I и/или МНС II или его функциональный вариант, дополнительно происходит из вирусного белка, резидентного в эндоплазматическом ретикулуме, который ингибирует экспрессию молекулы МНС или способствует ее деградации; предпочтительно гликопротеин, резидентный в эндоплазматическом ретикулуме, выбран из группы, состоящей из US6 HCMV, ICP47 HSV, CPXV012, E6/E7 HPV, BNFL2a EBV или UL49.5 BHV; предпочтительно, молекулярный домен связывающего белка, нацеленного на МНС I и/или МНС II, или его функциональный вариант, содержит TAP-связывающий домен;

предпочтительно, полноразмерная последовательность US6 HCMV включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 64, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность полноразмерной последовательности US6 HCMV показана как SEQ ID NO: 64;

предпочтительно TAP-связывающий домен US6 HHV-7 включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 65, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность TAP-связывающего домена US6 HHV-7 показана как SEQ ID NO: 65;

предпочтительно, полноразмерная последовательность ICP47 HSV включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 66, предпочтительно

аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность полноразмерной последовательности ICP47 HSV показана как SEQ ID NO: 66;

предпочтительно, TAP-связывающий домен ICP47 HSV включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 67, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность TAP-связывающего домена ICP47 HSV показана как SEQ ID NO: 67;

предпочтительно, полноразмерная последовательность CPXV012 включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 68, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность полноразмерной последовательности CPXV012 показана как SEQ ID NO:68;

предпочтительно, TAP-связывающий домен CPXV012 включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 69, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность TAP-связывающего домена CPXV012 показана как SEQ ID NO: 69;

предпочтительно, полноразмерная последовательность BNFL2a EBV включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 70, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность полноразмерной последовательности BNFL2a EBV показана как SEQ ID NO: 70;

предпочтительно, ТАР-связывающий домен BNFL2a EBV включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 71, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность ТАР-связывающего домена BNFL2a EBV показана как SEQ ID NO: 71;

предпочтительно, полноразмерная последовательность UL49.5 BHV включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 72, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90 %, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность полноразмерной последовательности UL49.5 BHV показана как SEQ ID NO: 72;

предпочтительно, ТАР-связывающий домен UL49.5 BHV включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 73, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность ТАР-связывающего домена UL49.5 BHV показана как SEQ ID NO: 73;

предпочтительно белок-связывающий молекулярный домен, нацеленный на МНС I и/или МНС II или его функциональные варианты, получен из вирусных гликопротеинов, которые приводят к деградации молекул МНС и/или МНС II; предпочтительно вирусные гликопротеины выбраны из гликопротеина US2, US3, US11 или US10 из HCMV, E3-19K аденовируса или US21 HHV-7;

предпочтительно, полноразмерная последовательность US2 включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 74, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность полноразмерной последовательности US2 показана как SEQ ID

NO:74;

предпочтительно HLA-связывающий домен US2 включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 75, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность HLA-связывающего домена US2 показана как SEQ ID NO: 75;

предпочтительно домен деградации ERAD US2 включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 76, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность домена деградации ERAD US2 показана как SEQ ID NO: 76;

предпочтительно, полноразмерная последовательность US3 включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 77, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность полноразмерной последовательности US3 показана как SEQ ID NO:77;

предпочтительно, HLA-связывающий домен US3 включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 78, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность HLA-связывающего домена US3 показана как SEQ ID NO: 78;

предпочтительно домен деградации ERAD US3 включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 79, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую

идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность домена деградации ERAD US3 показана как SEQ ID NO: 79;

предпочтительно, полноразмерная последовательность US11 включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 80, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность полноразмерной последовательности US11 показана как SEQ ID NO:80;

предпочтительно, HLA-связывающий домен US11 включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 81, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность HLA-связывающего домена US11 показана как SEQ ID NO: 81;

предпочтительно домен деградации ERAD US11 включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 82, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность домена деградации ERAD US11 показана как SEQ ID NO: 82;

предпочтительно молекулярный домен связывающего белка, нацеленного на МНС I и/или МНС II или его функциональный вариант, дополнительно включает вирусный белок, который направленно ингибирует или разрушает белок-мишень NK MICA, MICB, ULBP1, ULBP2, ULBP3, ULBP4, ULBP5. или ULBP6; предпочтительно вирусный белок выбран из UL16, UL141, UL142 HCMV или E3-19K аденовируса;

предпочтительно, полноразмерная последовательность UL16 HCMV включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 83, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная

последовательность полноразмерной последовательности UL16 HCMV показана как SEQ ID NO: 83;

предпочтительно, домен связывания белка-мишени NK UL16 HCMV включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 84, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность домена связывания белка-мишени NK UL16 HCMV показана как SEQ ID NO: 84;

предпочтительно домен деградации ERAD UL16 HCMV включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 85, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность домена деградации ERAD UL16 HCMV показана как SEQ ID NO: 85;

предпочтительно, полноразмерная последовательность UL141 HCMV включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 86, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность полноразмерной последовательности UL141 HCMV показана как SEQ ID NO: 86;

предпочтительно, домен связывания белка-мишени NK UL141 HCMV включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 87, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность домена связывания белка-мишени NK UL141 HCMV показана как SEQ ID NO: 87;

предпочтительно, домен деградации ERAD UL141 HCMV включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с

аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 88, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность домена деградации ERAD UL141 HCMV показана как SEQ ID NO: 88;

предпочтительно, полноразмерная последовательность UL142 HCMV включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 89, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность полноразмерного UL142 HCMV показана как SEQ ID NO: 89;

предпочтительно, чтобы MICA и ULBP3-связывающий домен UL142 HCMV включал аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 90, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность MICA и ULBP3-связывающего домена UL142 HCMV показана как SEQ ID NO: 90;

предпочтительно домен для локализации в Гольджи из UL142 HCMV включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 91, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность домена для локализации в Гольджи из UL142 HCMV показана как SEQ ID NO: 91;

предпочтительно молекулярный домен связывающего белка, нацеленного на МНС I и/или МНС II или его функциональный вариант, дополнительно включает вирусный белок, который транспортирует молекулы МНС I из аппарата Гольджи в лизосомы для деградации; предпочтительно вирусный белок выбран из Nef HIV, Vpu HIV, U21 HHV-7, KK3 HHV-8, KK5 HHV-8, MK3 MHV-68 и p12 HTLV-1;

предпочтительно, Nef HIV включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью,

показанной в SEQ ID NO: 92, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность Nef HIV показана как SEQ ID NO:92;

предпочтительно, Vpr HIV включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 93, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность Vpr HIV показана как SEQ ID NO:93;

предпочтительно KK3 HHV-8 включает аминокислотную последовательность, имеющую 80% или более идентичности с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 94, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, и более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность KK3 HHV-8 показана как SEQ ID NO: 94;

предпочтительно KK5 HHV-8 включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 95, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, и более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность KK5 HHV-8 показана как SEQ ID NO: 95;

предпочтительно МК3 MHV-68 включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 96, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, и более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность МК3 MHV-68 показана как SEQ ID NO: 96;

предпочтительно, p12 HTLV-1 включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью,

показанной в SEQ ID NO: 97, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, и более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность p12 HTLV-1 показана как SEQ ID NO: 97;

предпочтительно молекулярный домен связывающего белка, нацеленного на МНС I и/или МНС II или его функциональный вариант, 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 оспы коров;

модуль UT дополнительно включает МНС-связывающую структуру и домен, связывающий рецептор KDEL, вирусного функционального белка, которые опосредуют возврат молекул МНС-полипептида из аппарата Гольджи в эндоплазматический ретикулум и способствуют их деградации, например, CPXV203 белков вируса осповакцины;

предпочтительно, полноразмерная последовательность белка CPXV203 вируса осповакцины включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 98, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность полноразмерной последовательности белка CPXV203 вируса осповакцины показана как SEQ ID NO: 98;

предпочтительно, МНС-связывающий домен белка CPXV203 вируса осповакцины включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 99, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность МНС-связывающего домена белка CPXV203 вируса осповакцины показана как SEQ ID NO: 99;

предпочтительно, домен, связывающий рецептор KDEL, белка CPXV203 вируса осповакцины включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 100, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%

%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность рецептор-связывающего домена KDEL белка CPXV203 вируса осповакцины показана как SEQ ID NO: 100;

предпочтительно, полноразмерная последовательность белка CPXV203 вируса осповакцины включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 101, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность полноразмерной последовательности белка CPXV203 вируса осповакцины показана как SEQ ID NO: 101;

предпочтительно, МНС-связывающий домен белка CPXV203 вируса осповакцины включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 102, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность МНС-связывающего домена белка CPXV203 вируса осповакцины показана как SEQ ID NO: 102;

предпочтительно, домен, связывающий рецептор KDEL, белка CPXV203 вируса осповакцины включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 103, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность связывающего домена рецептора KDEL белка CPXV203 вируса осповакцины показана как SEQ ID NO: 103.

6. Многофункциональный комплекс по любому из пп. 1-5, отличающийся тем, что многофункциональный комплекс дополнительно содержит (4) модуль химерного адаптера и/или рецепторный модуль с направленной активностью уничтожения в отношении опухолевых клеток;

(4) модуль химерного адаптера содержит: (i) внеклеточный домен распознавания, нацеленный на опухоль, (ii) трансмембранный домен и (iii) внутриклеточный домен передачи сигнала; необязательно, шарнир или линкер включен между внеклеточным

доменом распознавания, нацеленным на опухоль, трансмембранным доменом и/или внутриклеточным доменом передачи сигнала;

предпочтительно внеклеточный домен 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;

предпочтительно, внеклеточный домен распознавания, нацеленный на опухоль, выбран из антитела, способного нацеливаться на опухолеассоциированный антиген или его функциональный фрагмент, TCR или их комбинации, функциональный фрагмент антитела выбран из Fd, Fv, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv (scFv), одноцепочечного антитела (scFv) или нанотела, двухцепочечного антитела, трехцепочечного антитела и четырехцепочечного антитела;

предпочтительно, трансмембранный домен модуля химерного адаптера выбран из трансмембранного домена рецептора активации NK-клеток, 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; предпочтительно рецептор активации NK-клеток, выбран из KKG2D, NKG2C, NKG2E, NKG2F, NKG2H, CD94, KIR2DL4, KIR2DS1, KIR2DS2, KIR2DS4, KIR3DS1, натурального цитотоксического рецептора, TRAIL, DNAM-1, CD16a, 2B4, NTB-A, CRACC и NKp80; предпочтительно натуральный цитотоксический рецептор выбран из Nkp46, Nkp44 и Nkp30;

предпочтительно, домен передачи внутриклеточного сигнала химерного адаптера включает домен передачи внутриклеточного сигнала рецептора активации NK-клеток, и/или костимулирующий домен передачи сигнала;

предпочтительно рецептор активации NK-клеток, 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;

предпочтительно, внутриклеточный сигнальный домен дополнительно содержит костимулирующий домен передачи сигнала; предпочтительно, костимулирующий домен передачи сигнала выбран из группы, состоящей из костимулирующего домена передачи сигнала Т-клеток, включающего, без ограничения указанным, внутриклеточный

сигнальный домен, полученный из молекул МНС класса I, белков рецептора TNF, иммуноглобулиноподобных белков, цитокиновых рецепторов, белков интегринов, сигнальных молекул активации лимфоцитов (белки SLAM), активированные рецепторы NK-клеток, BTLA, рецепторов 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(Tactile), 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, TCR α , TCR β , TRIM, ZAP70, PTCH2 и т.п.; более предпочтительно, костимулирующий домен передачи сигнала выбран из внутриклеточного сигнального домена NKG2D, внутриклеточного сигнального домена DAP10, внутриклеточного сигнального домена DAP12, внутриклеточного сигнального домена NCR, внутриклеточного сигнального домена CD28, внутриклеточного сигнального домена 4-1BB, внутриклеточного сигнального домена OX40 и внутриклеточного сигнального домена ICOS;

рецепторный модуль с направленной активностью уничтожения в отношении опухолевых клеток включает: (i) внеклеточный домен распознавания, нацеленный на опухолевый антиген; (ii) трансмембранный домен; и (iii) внутриклеточный костимулирующий домен передачи сигнала; (iv) домен передачи сигнала активации Т-клеток (ITAM); необязательно, шарнир или линкер содержится между внеклеточным доменом распознавания, 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 активностью уничтожения 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 комбинаций;

домен передачи сигнала активации Т-клеток происходит 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 других внутриклеточных доменов передачи сигнала;

предпочтительно линкер представляет собой гибкий линкер; предпочтительно, гибкий линкер включает указанную аминокислотную последовательность (Gly(x)Ser(y)) $_n$, где n представляет собой целое число от 1 до 10, а x и y независимо представляют собой целые числа от 0 до 10, при условии, что x и y представляют собой не оба 0 и более предпочтительно, линкер включает аминокислотную последовательность (Gly $_4$ Ser) $_2$, указанную в SEQ ID NO: 104, или аминокислотную последовательность (Gly $_3$ Ser) $_2$, указанную в SEQ ID NO: 105;

предпочтительно, линкер представляет собой шарнир; предпочтительно шарнир представляет собой шарнир IgG1 или шарнир IgG4;

предпочтительно шарнир IgG1 включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 106, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность шарнира IgG1 показана как SEQ ID NO: 106;

предпочтительно шарнир IgG4 включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 107, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, а более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность шарнира IgG4 показана как SEQ ID NO: 107;

предпочтительно, расщепляемый пептид включен между модулем рецептора, активирующего НК, модулем передачи сигнала CNK и/или модулем UT; и расщепляемый

пептид выбран из пептида T2A, пептида GSG-T2A, пептида E2A, пептида GSG-E2A, пептида F2A, пептида GSG-F2A, пептида P2A или пептида GSG-P2A;

предпочтительно T2A включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 108, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97 %, 98% или 99% или более, и более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность T2A показана как SEQ ID NO: 108;

предпочтительно аминокислотная последовательность пептида GSG-T2A показана в SEQ ID NO:109.

предпочтительно P2A включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 110, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97 %, 98% или 99% или более, и более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность P2A показана как SEQ ID NO: 110;

предпочтительно аминокислотная последовательность пептида GSG-T2A показана в SEQ ID NO:111;

предпочтительно, E2A включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 112, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97 %, 98% или 99% или более, и более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность E2A показана как SEQ ID NO: 112;

предпочтительно аминокислотная последовательность пептида GSG-E2A показана в SEQ ID NO:113;

предпочтительно F2A включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 114, предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 85%, 90%, 95%, 96%, 97 %, 98% или 99% или более, и более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность F2A показана как SEQ ID

или более, и более предпочтительно аминокислотную последовательность, имеющую идентичность 98% или 99% или более; при этом аминокислотная последовательность многофункционального комплекса показана как SEQ ID NO: 131.

7. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая любой из многофункциональных комплексов по любому из пп. 1-6;

предпочтительно молекула нуклеиновой кислоты представляет собой ДНК или РНК;

предпочтительно РНК представляет собой мРНК;

предпочтительно молекула нуклеиновой кислоты включает нуклеотидную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с нуклеотидной последовательностью, представленной 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; при этом нуклеотидная последовательность молекулы нуклеиновой кислоты показана как SEQ ID NO: 118;

предпочтительно, молекула нуклеиновой кислоты включает нуклеотидную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с нуклеотидной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 122, 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; при этом нуклеотидная последовательность молекулы нуклеиновой кислоты показана в SEQ ID NO: 122;

предпочтительно, молекула нуклеиновой кислоты включает нуклеотидную последовательность, имеющую идентичность 80% или более с нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 124, 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; при этом нуклеотидная последовательность молекулы нуклеиновой кислоты показана в SEQ ID NO: 124.

8. Экспрессирующий вектор, включающий нуклеиновую кислоту по п. 7;

предпочтительно вектор выбран из: плазмиды, космиды, вирусного вектора, РНК-вектора или линейных или кольцевых молекул ДНК или РНК;

предпочтительно вирусный вектор выбран из: ретровируса, аденовируса, парвовируса (например, аденоассоциированного вируса), 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 малые РНК-вирусы, альфавируса и вируса с двухцепочечной ДНК, где вирус с двухцепочечной ДНК включает аденовирус, герпесвируса (например, вирус простого герпеса типов 1 и 2, вирус Эпштейна-Барр, цитомегаловирус) и вируса оспы (например, вируса осповакцины, вируса оспы домашней птицы и вируса оспы канареек), вируса Норуолка, тогавируса, флавивируса, реовируса, паповавируса, гепаднавируса, бакуловируса и вируса гепатита;

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

предпочтительно лентивирусный вектор выбран из HIV-1, HIV-2, SIV, FIV, BIV, EIAV, CAEV или лентивируса демиелинизирующего лейкоэнцефалита овец;

предпочтительно, модуль рецептора, активирующего НК, модуль передачи сигнала CNK и/или модуль UT могут регулировать экспрессию под одним и тем же промотором одного и того же вектора, или под разными промоторами, или во множестве векторов;

предпочтительно вектор представляет собой лентивирусный вектор, причем ген, кодирующий расщепляемый пептид, включен между геном, кодирующим модуль рецептора, активирующего НК, модуль передачи сигнала CNK и/или модуль UT; предпочтительно расщепляемый пептид представляет собой линкер 2A; линкер 2A выбран из T2A, P2A, E2A и F2A;

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

9. Иммунная клетка, содержащая нуклеиновую кислоту по п. 8 или экспрессирующий вектор по п. 8;

предпочтительно иммунная клетка выбрана из Т-клетки, НКТ-клетки, НК-клетки, В-клетки, моноцита, макрофага и т.п.

10. Способ получения иммунных клеток, включающий введение нуклеиновой кислоты по п. 8 или экспрессирующего вектора по п. 8 в клетки способами, выбранными из следующих: электропорация, акустическая перфорация, генная пушка (например, генная пушка с частицами золота), липидная трансфекция, полимерная трансфекция, наночастицы или полимерные комплексы.

11. Фармацевтическая композиция, содержащая многофункциональный комплекс по любому из пп. 1-6, нуклеиновую кислоту по п. 7, экспрессирующий вектор по п. 8, иммунную клетку по п. 9 и/или иммунную клетку, полученную способом по п. 10, и фармацевтически приемлемые носители.

12. Применение многофункционального комплекса по любому из пп. 1-6, нуклеиновой кислоты по п. 7, экспрессирующего вектора по п. 8, иммунной клетки по п. 9, иммунной клетки, полученной способом по п. 10, и/или фармацевтической композиции по п. 11 при производстве лекарственного средства для лечения заболеваний.

13. Способ лечения заболеваний, включающий введение субъекту многофункционального комплекса по любому из пп. 1-6, нуклеиновой кислоты по п. 7, экспрессирующего вектора по п. 8, иммунной клетки по п. 9 и/или фармацевтической композиции по п. 10;

предпочтительно заболевания включают различные солидные опухоли и гематологические опухоли, вирусные инфекционные заболевания, аутоиммунные заболевания;

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 Коксаки; 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;

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.; лихорадка 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.;

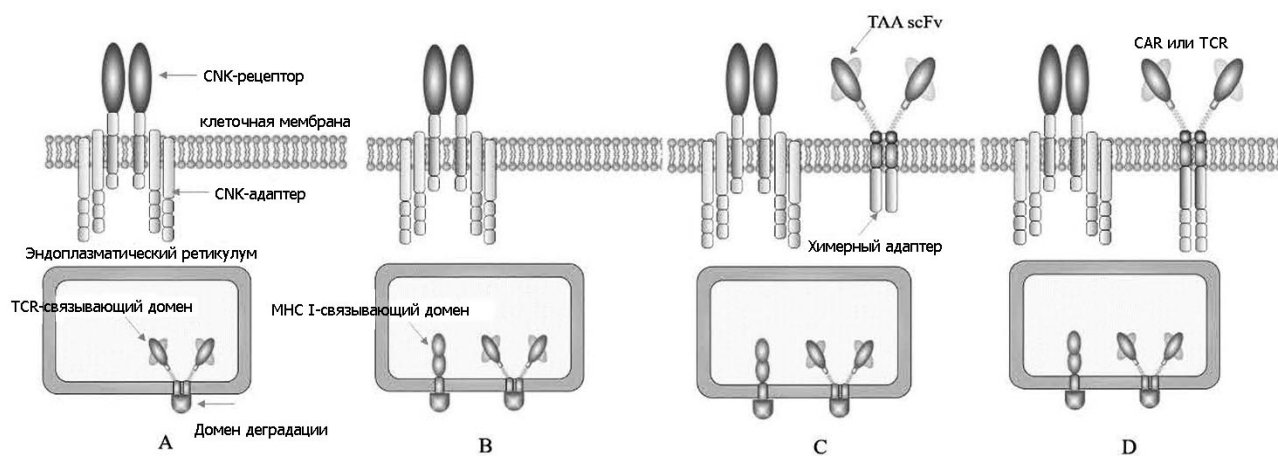
предпочтительно аутоиммунные заболевания включают органоспецифические аутоиммунные заболевания и системные аутоиммунные заболевания;

предпочтительно органоспецифические аутоиммунные заболевания включают хронический лимфоцитарный тиреозит, 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.;

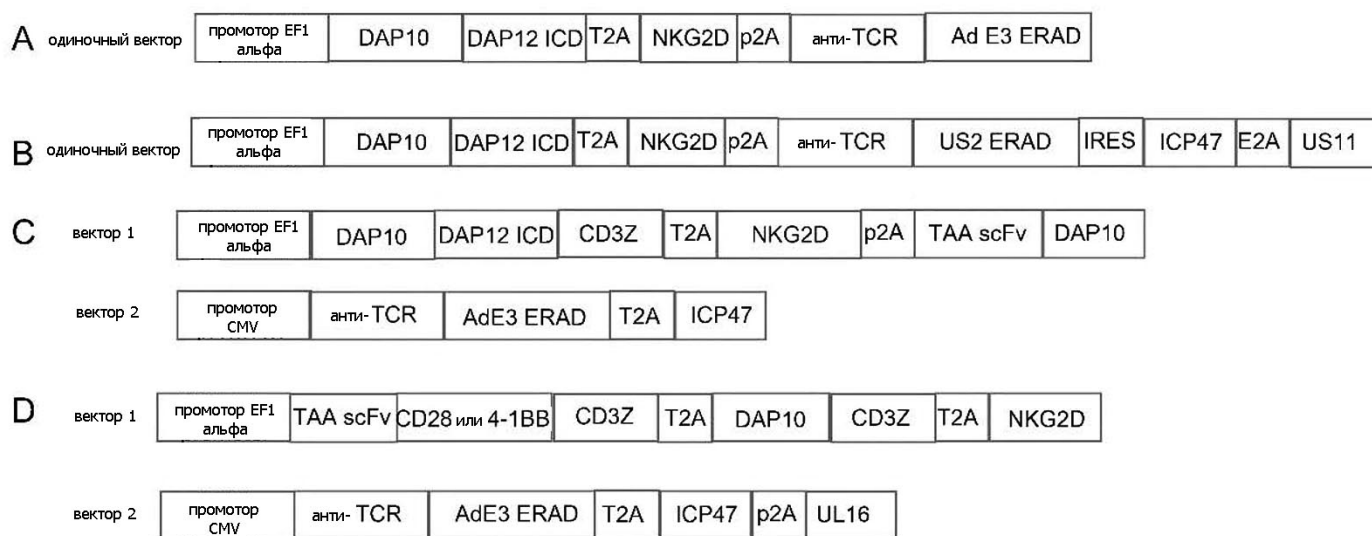
предпочтительно системные аутоиммунные заболевания включают системную красную волчанку, ревматоидный артрит, системный васкулит, склеродермию, пузырчатку, дерматомиозит, смешанное заболевание соединительной ткани, аутоиммунную гемолитическую анемию, аутоиммунные заболевания щитовидной железы, язвенный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

14. Способ стимуляции иммунного ответа у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества многофункционального комплекса по любому из пп. 1-6, нуклеиновой кислоты по п. 7, экспрессирующего вектора по п. 8, иммунной клетки по п.

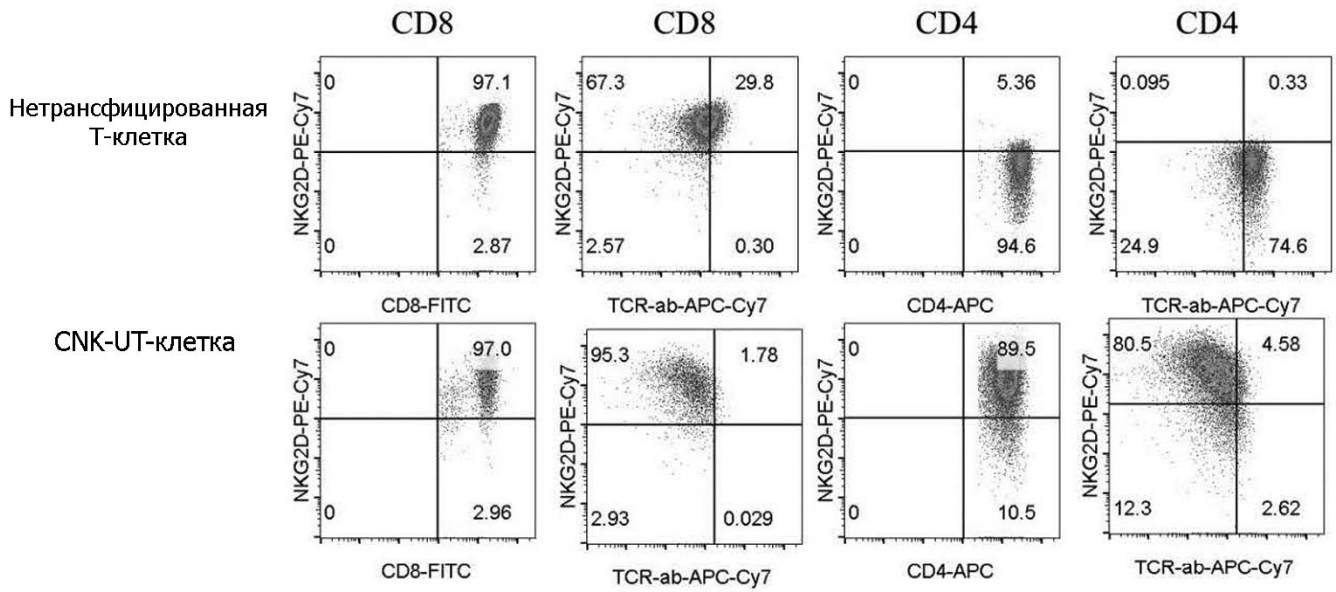
9, иммунной клетки, полученной способом по п. 10, и/или фармацевтической композиции по п. 11.



ФИГ. 1



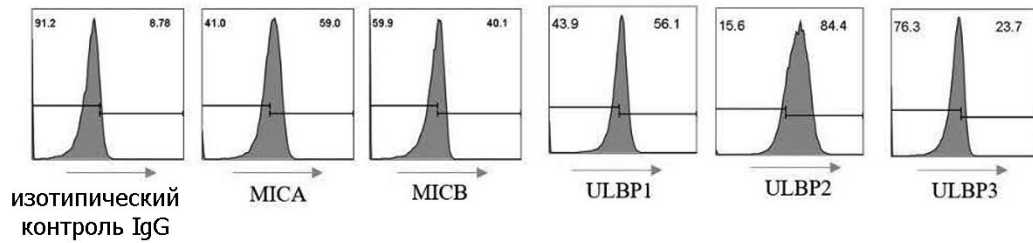
ФИГ. 2



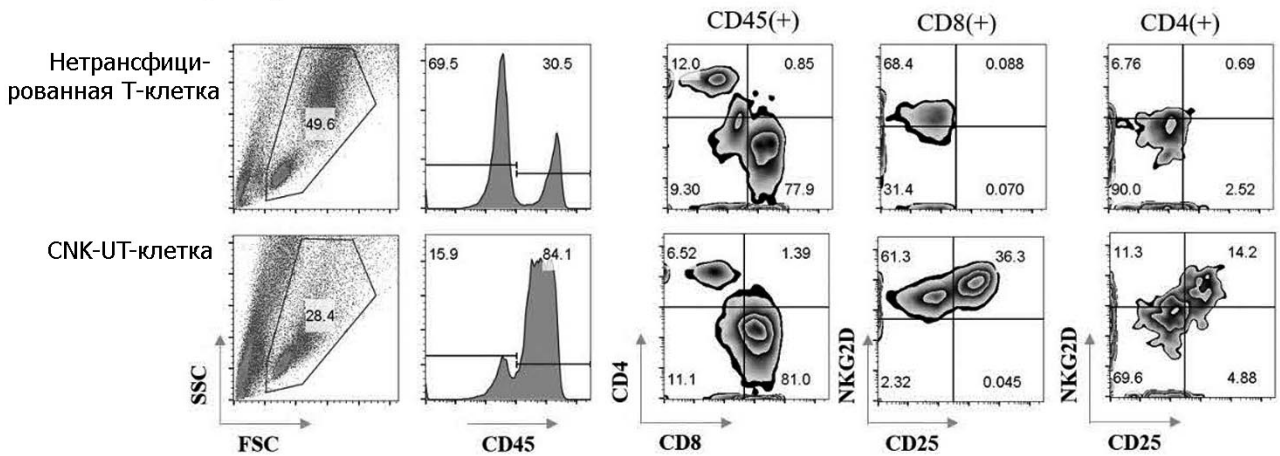
ФИГ. 3

HT-29 (клеточная линия аденомы ободочной кишки человека)

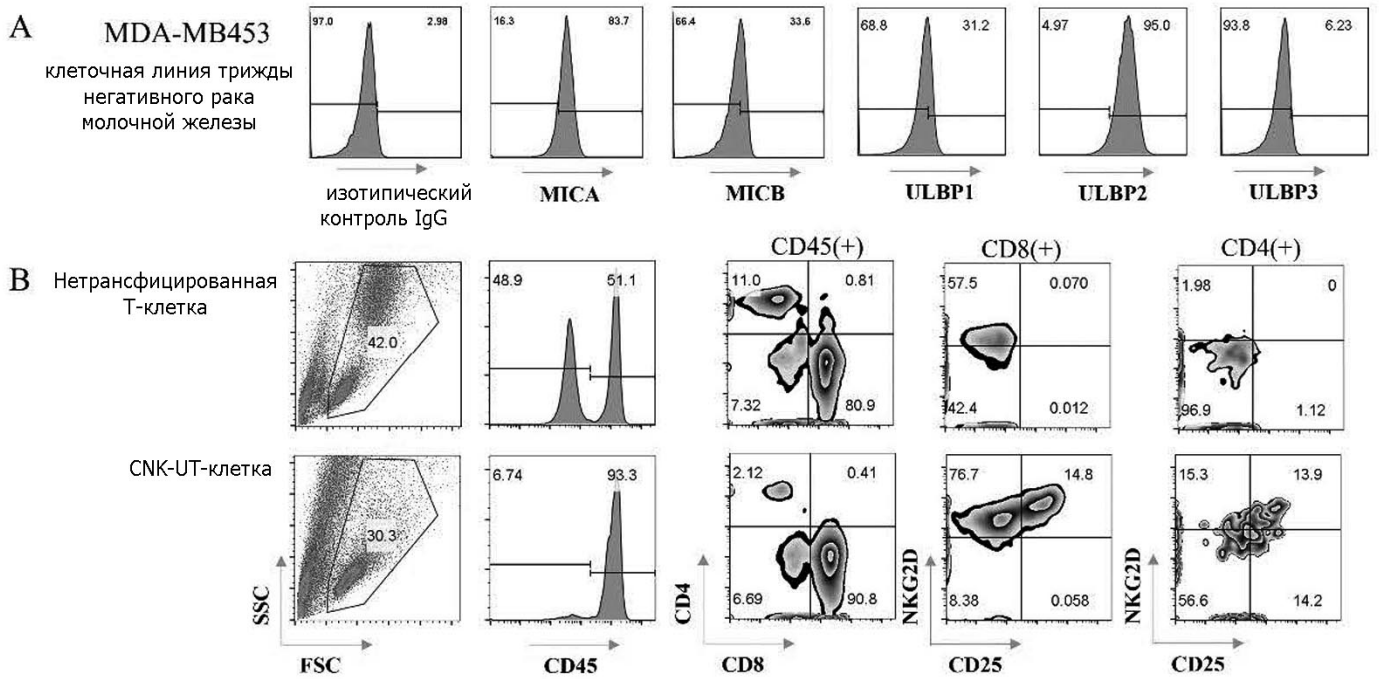
A



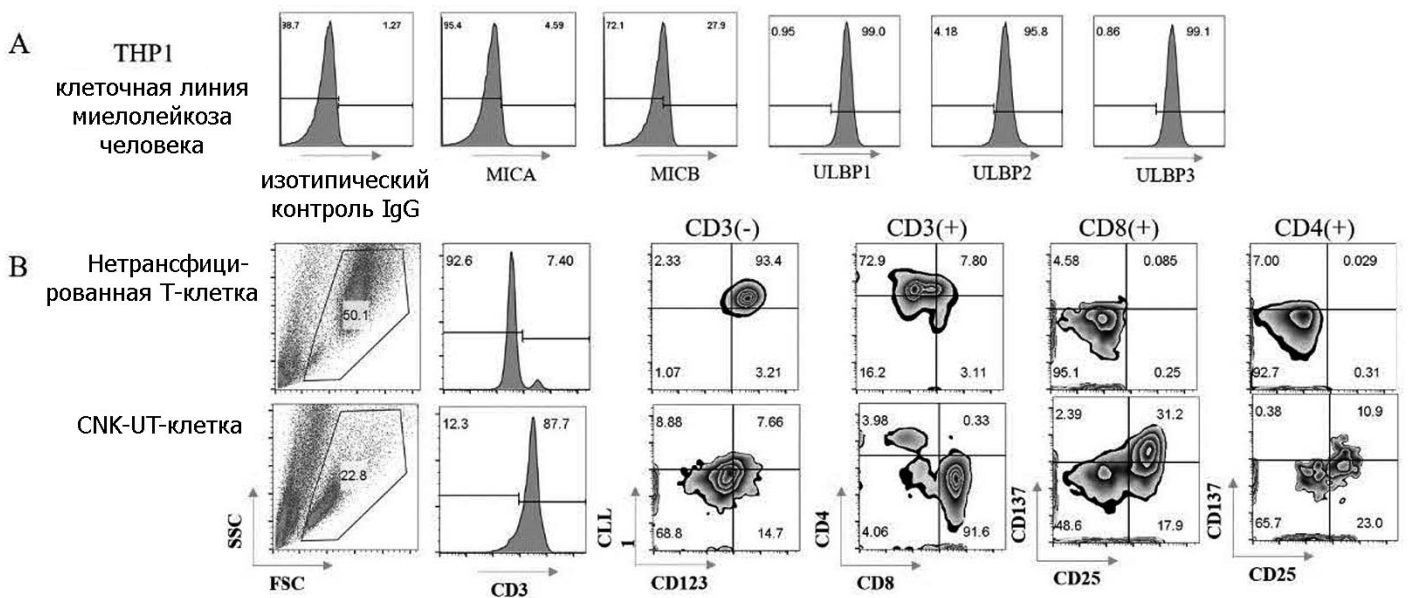
B



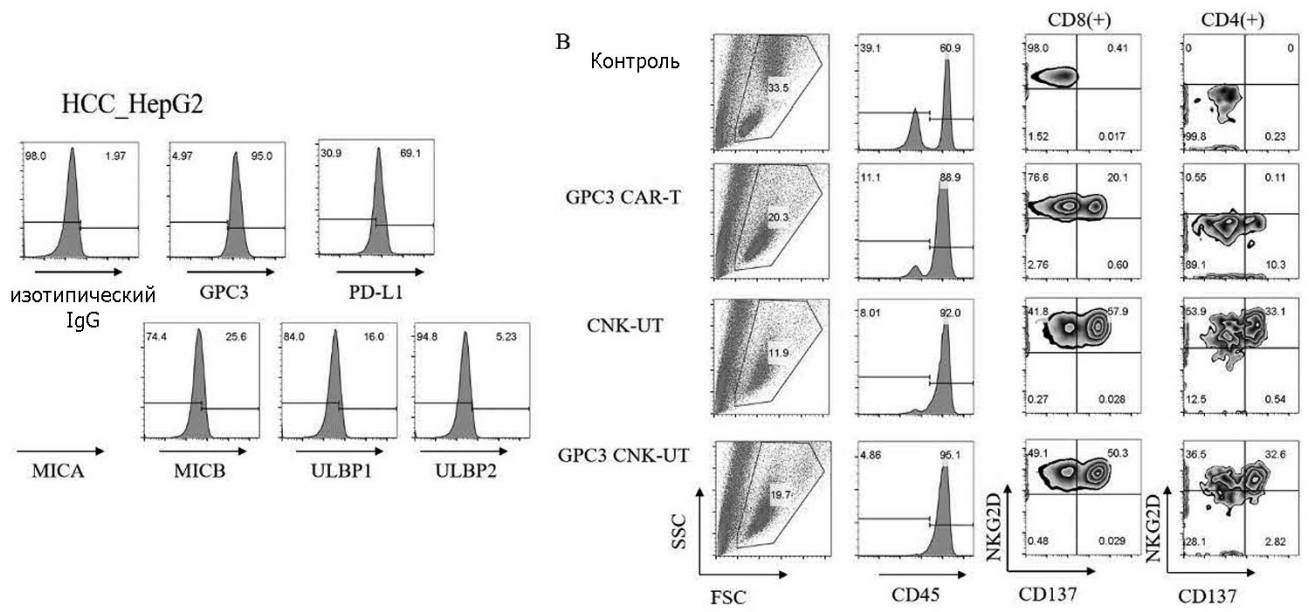
ФИГ. 4



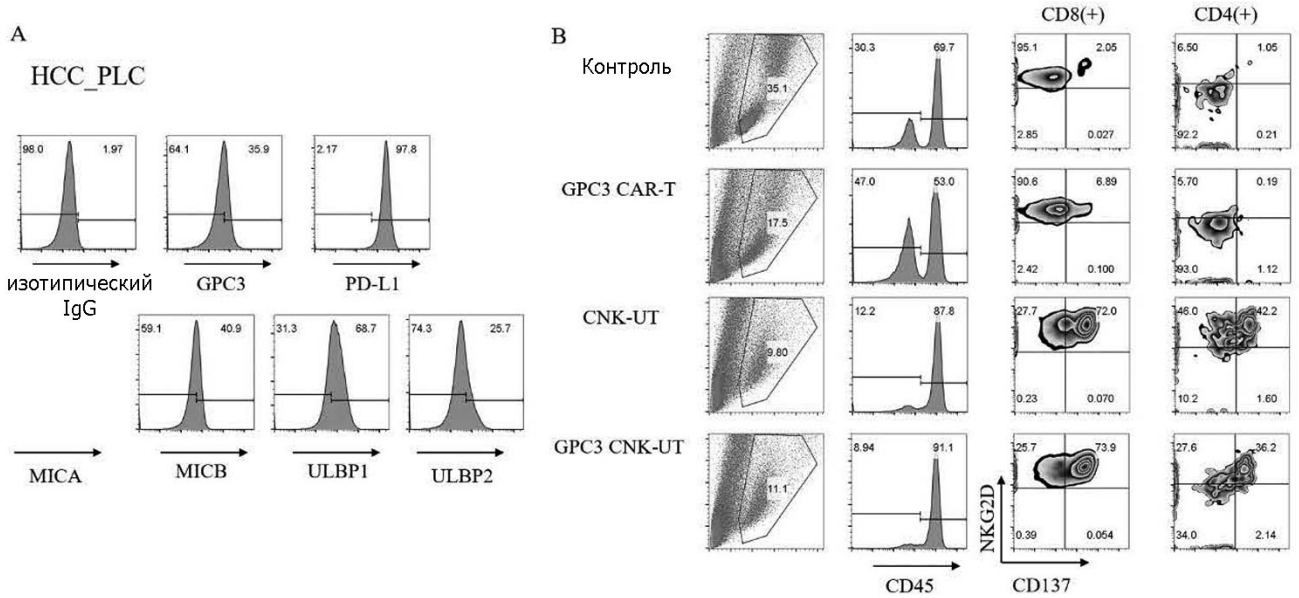
ФИГ. 5



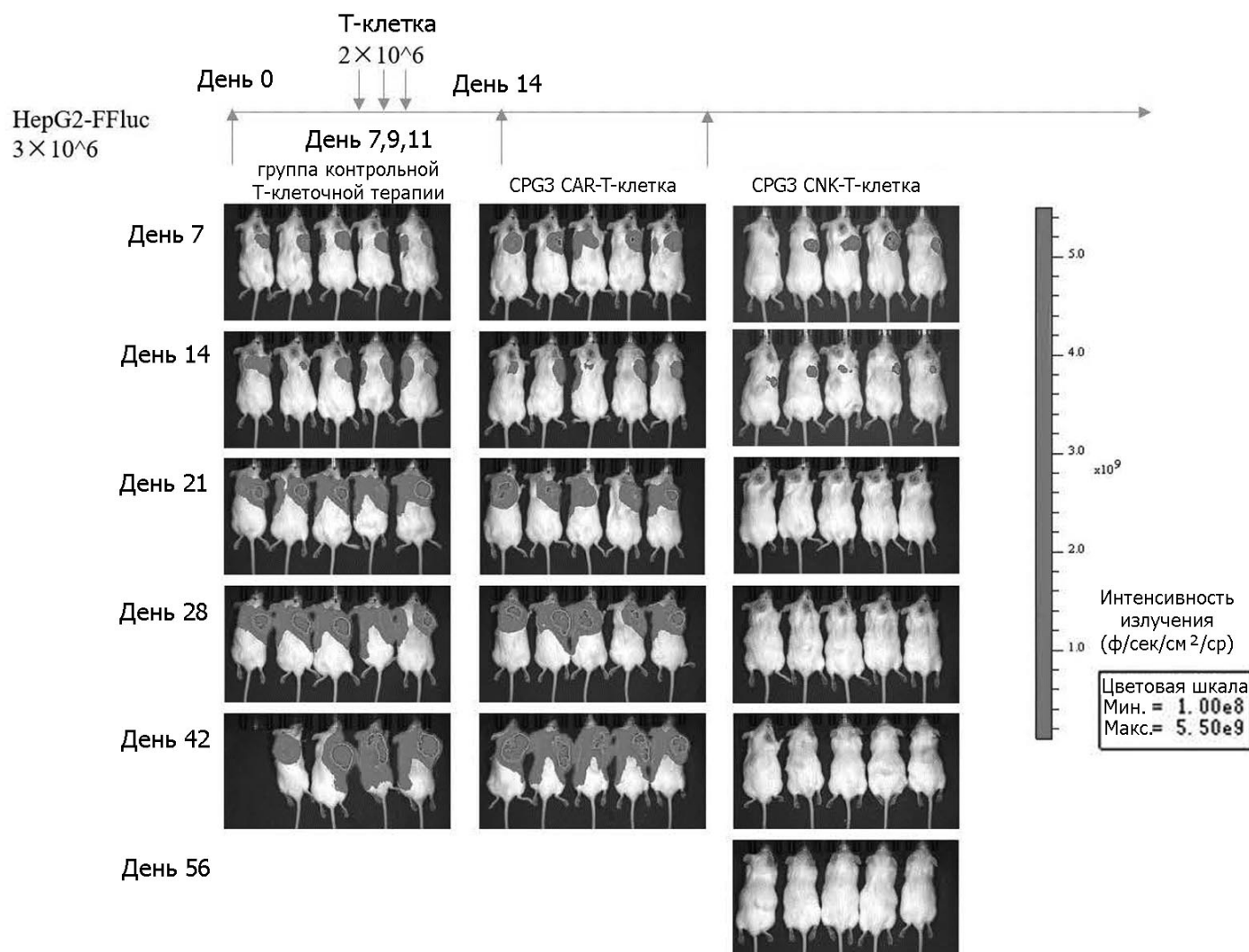
ФИГ. 6



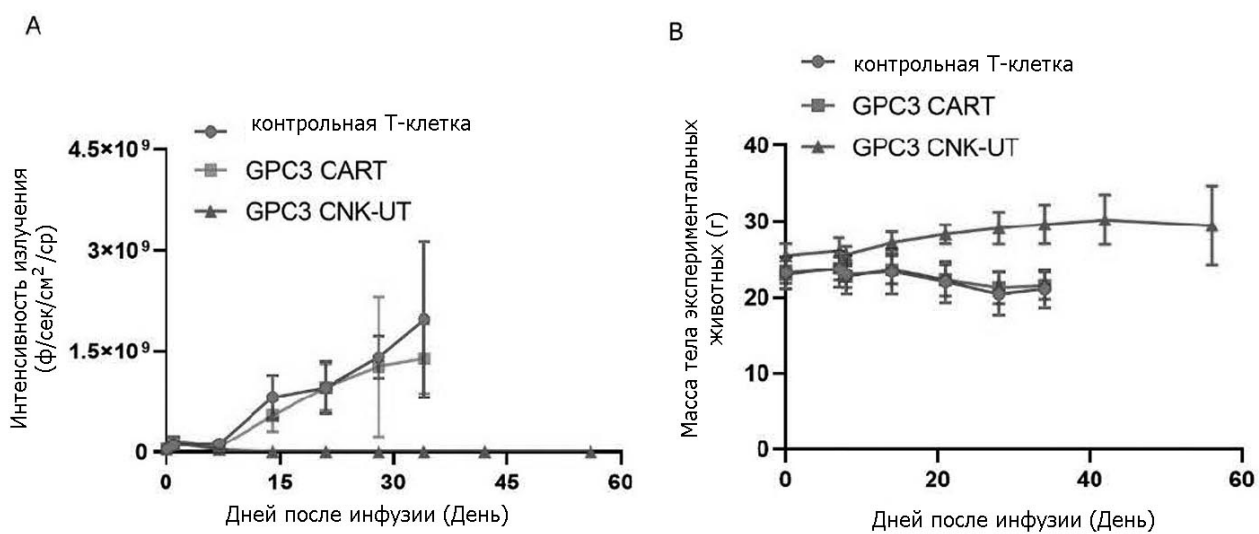
ФИГ. 7



ФИГ. 8

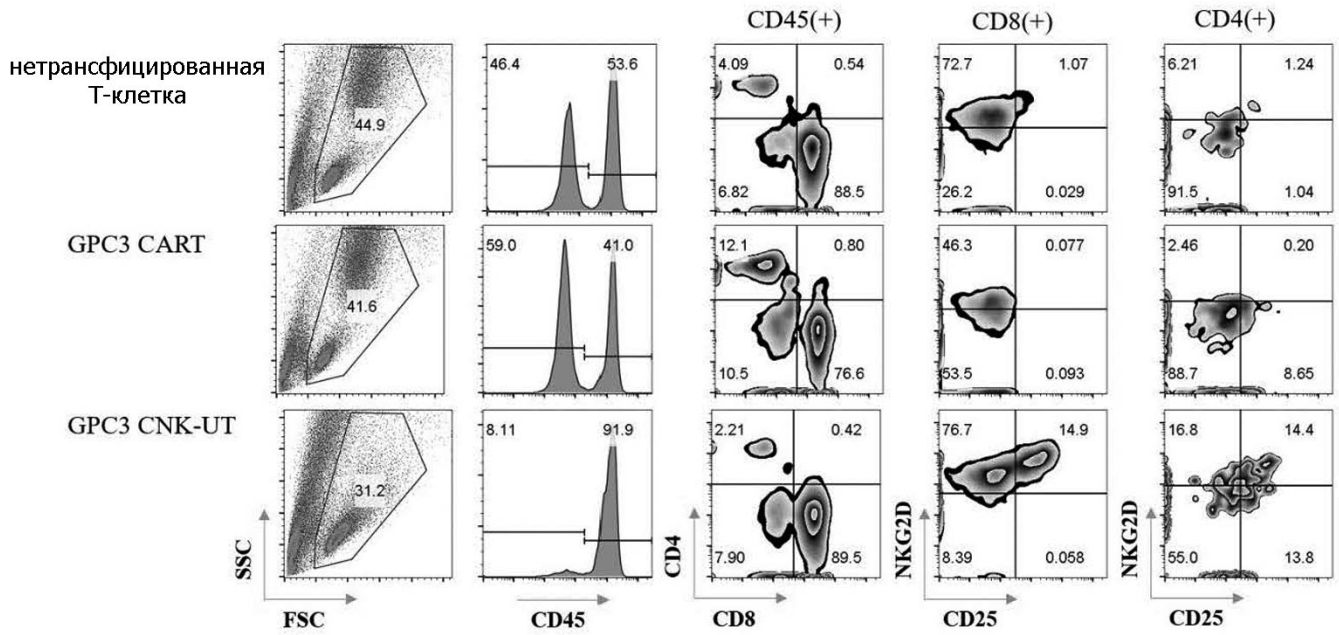


Фиг. 9



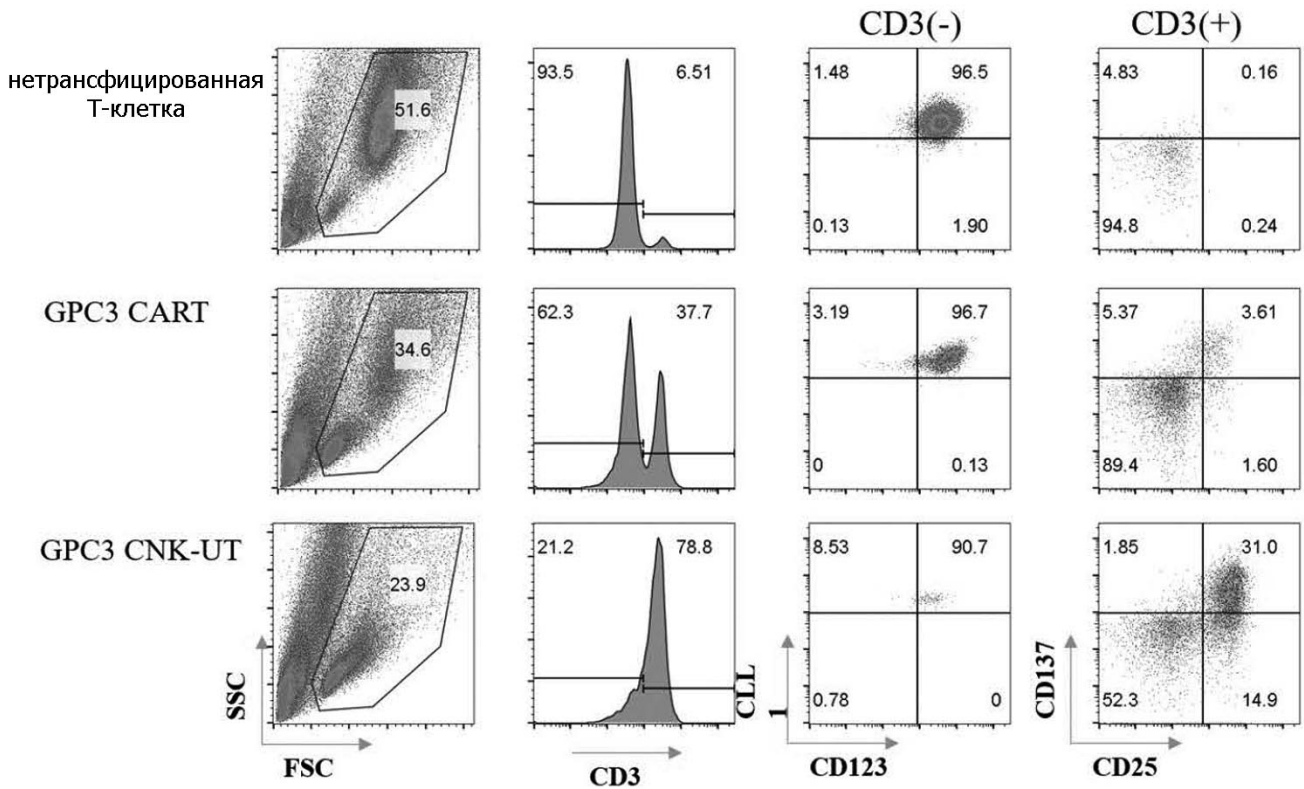
Фиг. 10

VS MDA-MB453



Фиг. 11

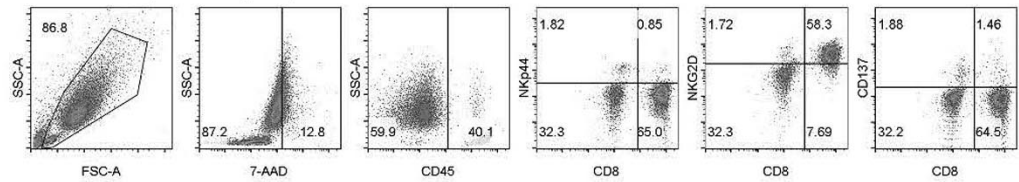
vs THP1



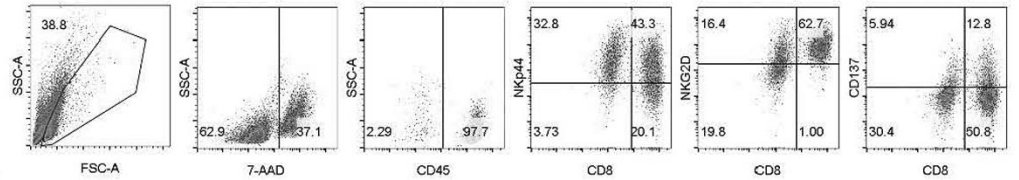
Фиг. 12

vs 786-O
клеточная линия почечно-клеточной карциномы (ПКК)

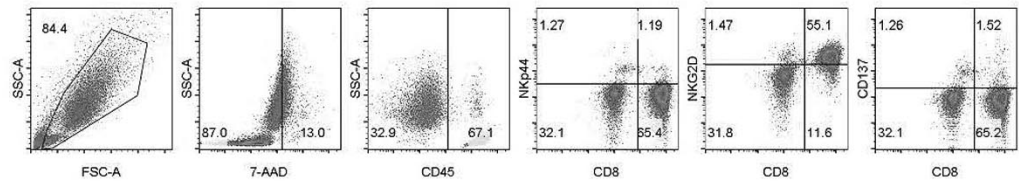
нетрансфицированная
Т-клетка
E:T=1:1



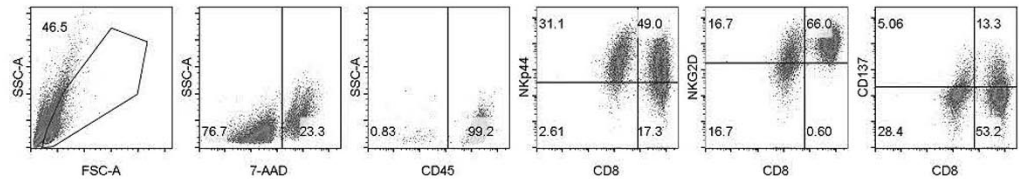
NCR2 CAR/CNK-UT
E:T=1:1



нетрансфицированная
Т-клетка
E:T=2:1



NCR2 CAR/CNK-UT
E:T=2:1

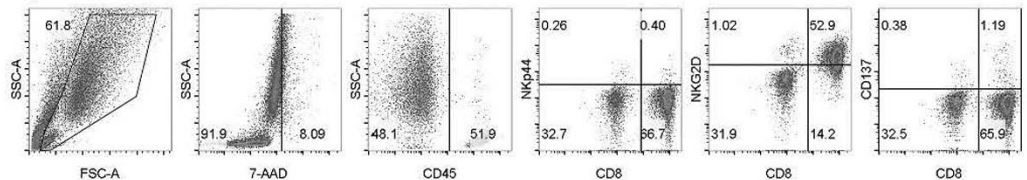


Фиг. 13

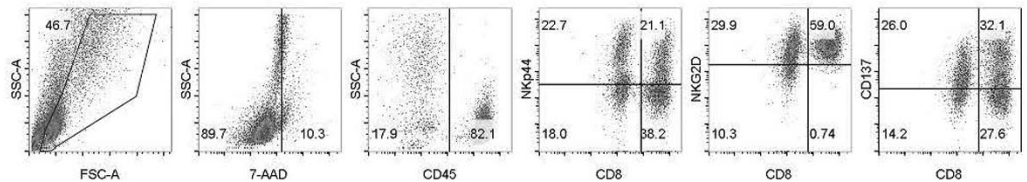
vs ACHN

клеточная линия почечно-клеточной карциномы (ПКК)

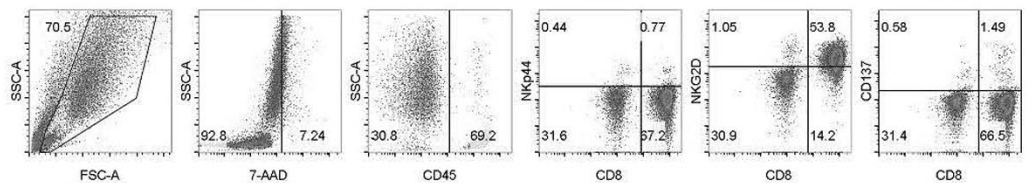
нетрансфицированная
Т-клетка
E:T=1:1



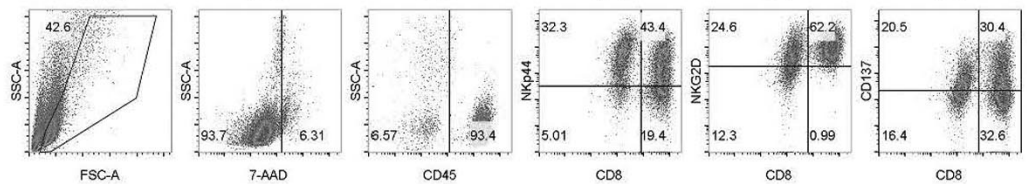
NCR2 CAR/CNK-UT
E:T=1:1



нетрансфицированная
Т-клетка
E:T=2:1



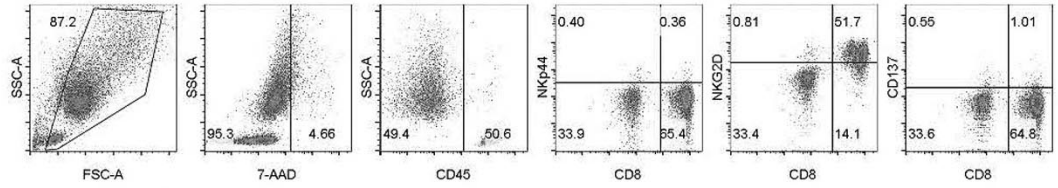
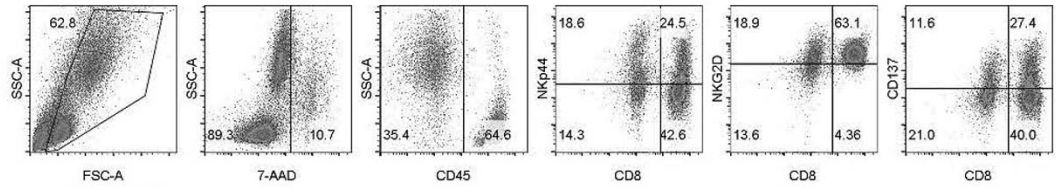
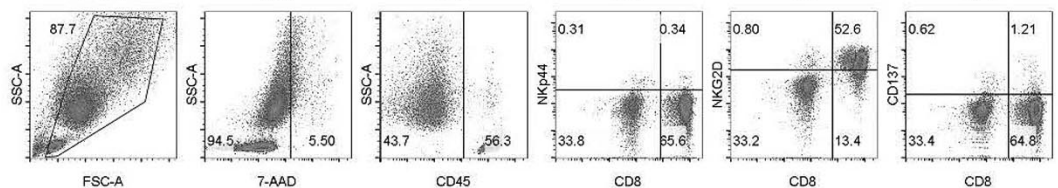
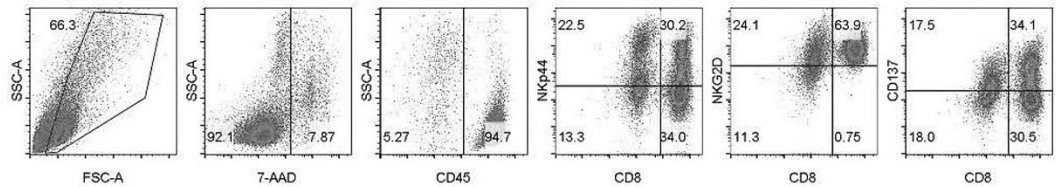
NCR2 CAR/CNK-UT
E:T=2:1



Фиг. 14

vs A-549

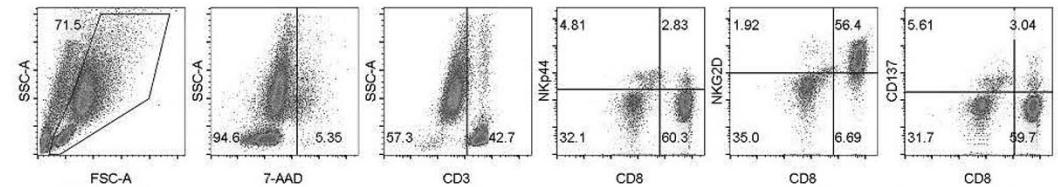
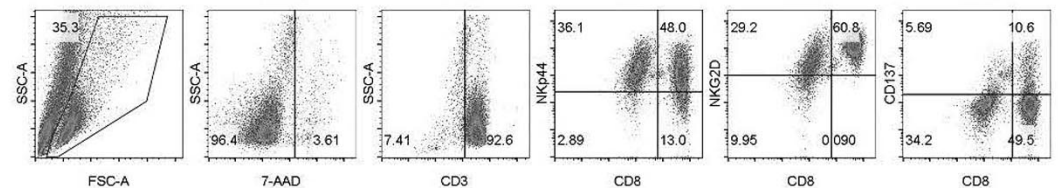
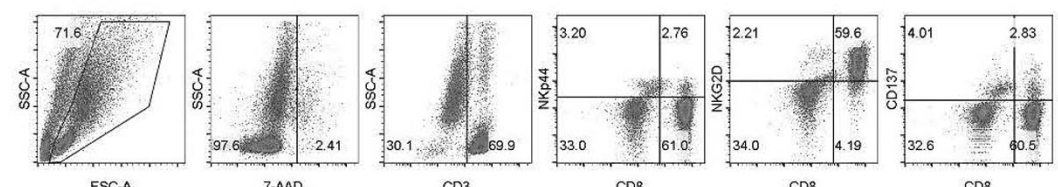
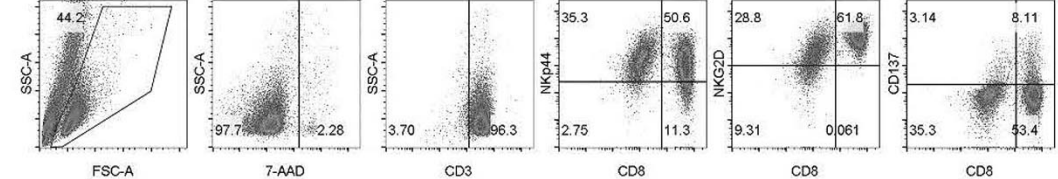
клеточная линия карциномы эпителия легкого

нетрансфицированная
Т-клетка
E:T=1:1NCR2 CAR/CNK-UT
E:T=1:1нетрансфицированная
Т-клетка
E:T=2:1NCR2 CAR/CNK-UT
E:T=2:1

Фиг. 15

vs HL60

клеточная линия ОМЛ

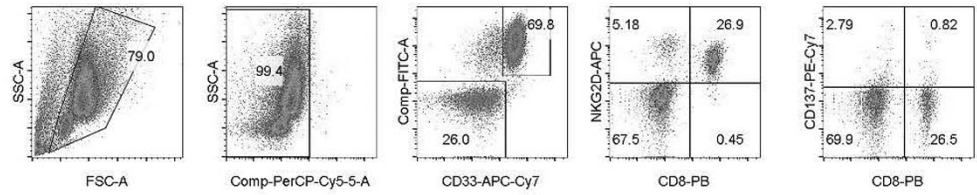
нетрансфицированная
Т-клетка
E:T=1:1NCR2 CAR/CNK-UT
E:T=1:1нетрансфицированная
Т-клетка
E:T=2:1NCR2 CAR/CNK-UT
E:T=2:1

Фиг. 16

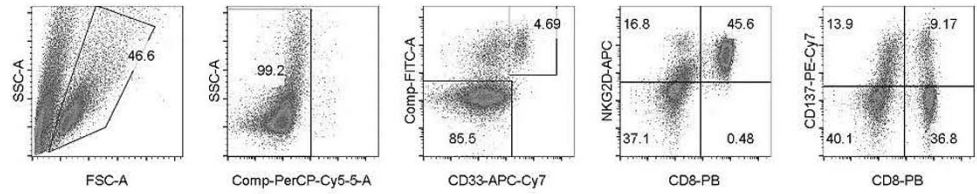
vs U937-GFP
клеточная линия ОМЛ

9/9

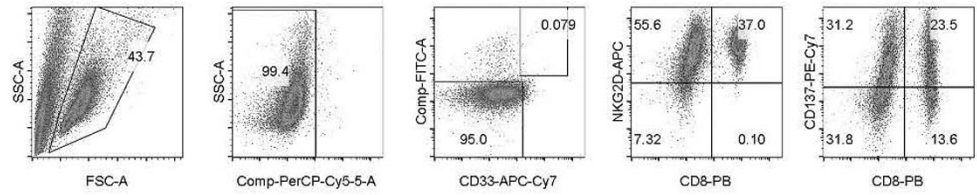
нетрансфицированная
Т-клетка
E:T=1:1



CNK-UT(UL16)
E:T=1:1



CNK-UT (UL16/E3-19K)
E:T=1:1



Фиг. 17

vs PANC-1-GFP

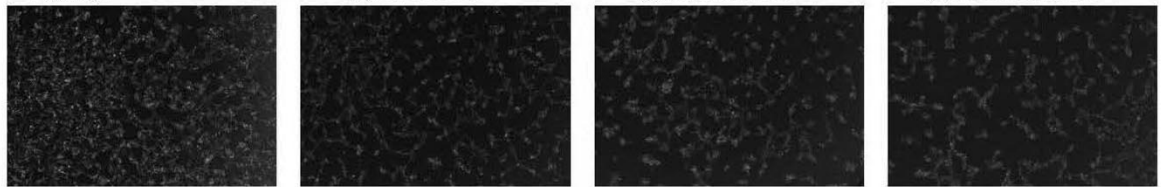
(1) нетрансфицированная
Т-клетка

(2)NCR1 CART

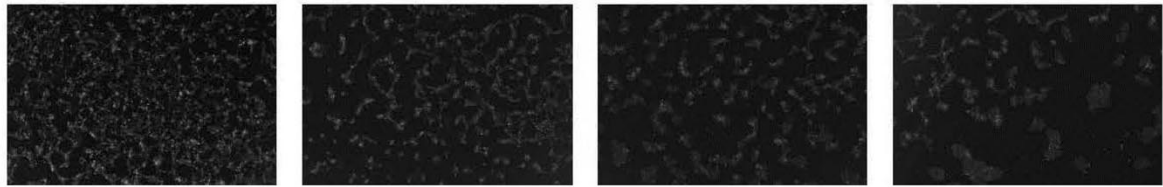
(3)NCR2 CNK-UT

(4)NCR1/2 CNK-UT

E:T=1:1



E:T=2:1



Фиг. 18

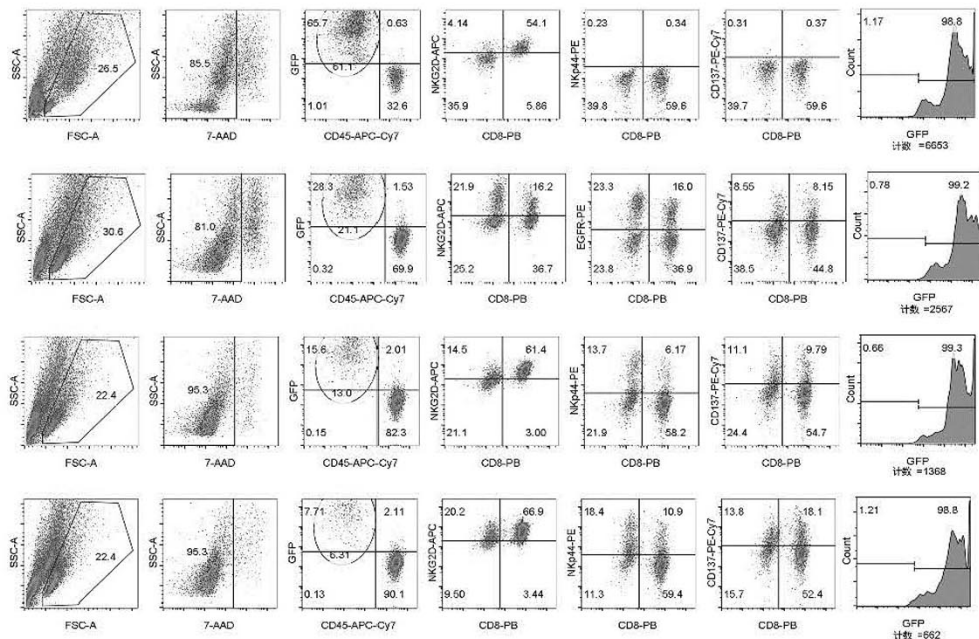
vs PANC-1-GFP E:T=1:1

(1) нетрансфицированная
Т-клетка

(2)NCR1 CART

(3)NCR2 CNK-UT

(4)NCR1/2 CNK-UT



Фиг. 19