

通用型 T 细胞及其应用

5 技术领域

本公开涉及细胞治疗领域，更具体地，涉及一种通用型 T 细胞及其应用，特别是嵌合自然杀伤受体通用型 T 细胞（CNK-UT）及其应用。

背景技术

10 细胞治疗，通过基因工程技术改造免疫细胞使其能呈递肿瘤相关抗原或表达特异性识别疾病细胞的受体，在体外指数级扩增后回输至患者体内，激活体内免疫系统对肿瘤细胞进行攻击或直接特异性识别并杀伤疾病细胞的疗效。2012 年 CD19 靶向 CAR-T 细胞实现了人类医学史上首次定向清除 B 细胞白血病患者体内肿瘤细胞，成为继骨髓干细胞移植治疗技术后又一项能真正治愈白血病的治疗技术，开启了精准医学细胞治疗的新时代。这项技术有望应用于各种血液肿瘤和实体瘤的治疗上。但目前常规 CAR-T 治疗实体肿瘤的临床疗效不佳，其原因：(1) CAR-T 的杀伤功能高度依赖于 CAR 结构对肿瘤相关抗原 TAA 的识别，但由于实体肿瘤的异质性，肿瘤细胞表面靶点蛋白表达存在很大差异；目前单一靶向的 CAR-T 无法完全识别和杀伤所有肿瘤细胞，从而导致肿瘤的免疫逃逸和复发转移；(2) 实体肿瘤的直接免疫抑制效应，表达 PD-L1, B3H7 等，直接抑制 T 细胞的激活；(3) 实体肿瘤的免疫抑制微环境，有大量的免疫抑制细胞，如 TAM、Treg、MDSC，传统 CAR-T 的设计很难突破肿瘤内部的免疫抑制细胞的限制；(4) 传统 CAR-T 是个性化的细胞治疗，T 细胞来源患者本身，如果患者已经接受大量的放化疗等，免疫系统功能受损，很难从患者外周血分离出足够数量的 T 细胞，即使分离出来改造，T 细胞的增殖和杀伤功能还是很薄弱，因此很难发挥治疗效果。

免疫系统具有强大的可塑性和具有近乎无限的检测入侵病毒，细菌，异源细胞和病变细胞的能力。这种非凡的免疫监测能力主要通过体液免疫和细胞免疫实现的，其中包括两种重要分子结构：免疫球蛋白和 T 细胞受体（TCR）。TCR 是 T 细胞的定义结构，是一种跨膜异源二聚体，由通过二硫键连接的 α 和 β 链或 δ 和 γ 链组成。在这些链中，互补决定区（CDR）决定了 TCR 将结合的抗原。在 TCR 中，TCR α 和 TCR β 亚基（或 $\gamma\delta$ T 细胞中的 TCR γ 和 TCR δ ）负责识别主要组织相容性复合体（MHC）/抗原配体。

25 人类 MHC I 类基因区包括 HLA-A、B、C 位点的等位基因，编码 HLA-A 抗原、B 抗原和 C 抗原等经典的 I 类抗原（分子），称为 HLA-A、HLA-B 和 HLA-C。这些抗原分子存在于所有体细胞的表面，并与细胞内蛋白质表位肽段结合，供免疫系统进行识别。如果细胞产生突变蛋白，或有外来细菌或病毒入侵，细胞将这些突变蛋白或异源蛋白抗原表位呈递后，免疫细胞进行识别后会进行免疫攻击和杀伤，从而清除病变细胞，病菌和病毒入侵细胞。

由于 MHC 类分子是呈递病毒抗原，触发免疫系统针对病毒病原体的攻击的关键因素，在数百万年的进化中，病毒逐渐形成了靶向抑制 MHC 类分子的策略，以避免免疫监视和清除。其中非常典型的例子是人巨细胞病毒（HCMV），与其宿主一起进化，通过诸多基因组功能蛋白实现免疫逃逸。HCMV 独特的短（unique short, US）基因组区域编码至少五种糖蛋白（US2、US3、US6、US10、US11），这些糖蛋白使用专门的机制下调 MHC I 类分子，从而阻碍病毒抗原呈递给细胞毒性 T 淋巴细胞（CTL）。

CMV US 糖蛋白能够劫持内质网相关降解（ER-associated degradation, ERAD）机制来抑制 MHC 分子介导的病毒抗原呈递，从而避免免疫监视系统。ER 相关降解（ERAD）是一种蛋白质清除系统。内质网中错误折叠、错误组装或代谢调节的蛋白质通过特定的膜穿透机制选择性地由内质网脱位到胞质溶胶中，随后被胞质泛素蛋白酶体系统（ubiquitin proteasome system, UPS）降解。

40 HCMV US2 和 US11 这两种蛋白都是 ER 驻留 I 型整合膜糖蛋白，它们共同选择该 ERAD 途径以促进 MHC I 类重链的降解，从而抑制 MHC I 类抗原呈递。两种蛋白中的任何一种蛋白质的表达都会导致新合成的 MHC I 类重链快速降解。US2 和 US11 通过其腔结构域与重链结合并募集宿主细胞蛋白，这些蛋白通过“拉动”重链的胞质尾部从内质网膜中提取多肽。MHC I 类分子易位进入细胞质后，被泛素化，并被蛋白酶体降解。

45 除了 I 类分子外，US2 还导致 II 类途径的两种蛋白质 DR- α 和 DM- α 以及 HFE（一种参与铁调节的非经典主要组织相容性复合体（MHC）I 类蛋白质）的降解。

US2 的腔结构域负责结合 MHC I 类和 II 类分子，跨膜结构域（TM）和胞质结构域（CT）与 ER 相关降解途径的细胞成分相互作用，并有助于易位和促进 I 类和 II 类这两种蛋白的酶解。US2 的胞质尾部足以与信号肽酶（SPP）相互作用，SPP 是 US2 依赖性 MHC I 位错复合物的必要成分。此外，US2 通过其 TM 结构域与内质网驻留 RING 型 E3 连接酶 TRC8 相互作用，这也有助于 US2 尾锚定 MHC I 和 II 分子的泛素化和蛋白酶体降解。

50 相比之下，US11 诱导的 MHC-I 分子降解需要 Derlin1 而不是 SPP。US11 的 ER 腔域与 MHC-I 重链的腔域相互作用，而 US11 的 TM 域与 Derlin-1 结合。因此，US11 的主要功能可能是将 MHC-I 分子传递到 Derlin-1，然后诱导它们错位到胞质溶胶中进行蛋白酶体降解。此外，US11 激活未折叠蛋白。通过 Derlin-1，US11 与作为 ERAD RING E3 连接酶的 TMEM129 相关联并招募 Ube2J2 在 US11 诱导降解之前泛素化 MHC-I。

55 US3 糖蛋白不是促进 MHC 蛋白的降解，而是与载有肽的 MHC I 类异二聚体物理结合，导致 I 类复合物保留在

域交换实验表明, US3 的腔结构域足以使 US3 本身保持内质网, 而腔内结构域和跨膜结构域对于内质网中 I 类 MHC 分子的保留都是必需的。

除了 MHC I 分子外, US2 和 US3 糖蛋白通过破坏或消除 II 类蛋白的功能来抑制 II 类抗原呈递。US2 与 II 类 DR 结合并导致仅 II 类 DR $\alpha\beta$ 复合物的 α 链的快速有效的蛋白酶体介导的降解。US2 还导致 DM α 链的降解, 该 DM 是将抗原肽加载到 II 类 DR 复合物上所需的 MHC II 类复合物。HCMV US3 与 II 类 DR $\alpha\beta$ 异源二聚体结合, 抑制不变链(Ii)的结合, 导致细胞内错误定位并减少 DR 复合物的肽负载。

HCMV US10 编码内质网膜糖蛋白, 该糖蛋白也与 MHC I 类抗原呈递的成分相互作用。US10 结合游离的 I 类重链并延迟它们从 ER 的运输。但是, US10 不影响 US2 或 US11。

腺病毒基因产物 E3/19K (E19) 也可以在分泌途径中保留 I 类分子并干扰抗原呈递。E19 也是内质网驻留糖蛋白, 它可以消除主要组织相容性复合体 I 类 (MHC-I) 和 MHC-I 相关链 A 和 B (MICA/B) 分子的细胞表面转运。E3/19K 包含三个功能模块: 用于与 MHC-I 和 MICA/B 分子相互作用的腔域、跨膜域和细胞质尾中的二赖氨酸基序, 该基序可将高尔基体返回到内质网。研究表明, 需要跨膜结构域 (TMD) 和 ER 返回信号来确保有效的 ER 定位、MHC-I 和 MICA/B 分子的转运抑制以及蛋白酶体降解。

与 US2、US3、US10 和 US11 不同, HCMV L 蛋白 US6 通过完全不同的策略影响抗原呈递。相反于与游离 I 类重链或完全组装的 I 类复合物相互作用, US6 通过 TAP 复合物 (TAP1/2) 抑制胞质肽的易位。US6 与 TAP1 的 ER 腔侧结合并导致构象变化, 从而阻止 ATP 的结合。US6 的 ER-腔结构域中的残基 89-108 有助于 US6 与 TAP 的结合, 并且是这种抑制的充分必要条件。这种对 TAP 活性的抑制不仅影响经典 MHC I 类等位基因的表达, 还会影响胎儿细胞滋养层细胞中非经典等位基因 HLA-C 和 HLA-G 的表达。

作为 HCMV US6 蛋白, HSV ICP47 在感染周期的早期表达, 对于体外复制是可有可无的, 也可以应用相同的策略来阻止 I 类分子组装。ICP47 阻断 TAP 介导的肽转运并与 TAP1-TAP2 复合物紧密结合。ICP47 阻断 TAP 机制的一个线索是它表现出高物种选择性。HSV1 和 HSV2 ICP47 均抑制猿、猴、猪、狗和牛 TAP, 对小鼠、大鼠、豚鼠或兔 TAP 几乎没有影响。ICP47 对人 TAP 的亲和力比小鼠 TAP 的亲和力高约 100 倍。ICP47 抑制肽与 TAP 的结合, 但不影响 ATP 结合。ICP47 对 TAP 的亲和力比大多数肽高 10-1000 倍, 可作为肽与 TAP 结合的竞争性抑制剂, 并被认为是直接与肽结合位点结合。

$\alpha\beta$ T 淋巴细胞通过称为 $\alpha\beta$ T 细胞抗原受体 (TCR) CD3 复合物的多聚蛋白集合识别肽-MHC 配体。该结构由结合抗原的可变 $\alpha\beta$ TCR 二聚体和参与 TCR/CD3 表面转运、稳定和信号转导的三个不变二聚体 (CD3 $\gamma\epsilon$ 、 $\delta\epsilon$ 和 $\zeta\zeta$) 组成。 $\alpha\beta$ T 细胞受体 ($\alpha\beta$ TCR) 在大多数 (约 95%) T 细胞上表达, 并通过识别主要组织相容性复合体 (MHC) 锚定抗原在 T 细胞活化中发挥关键作用。因此, TCR 介导的 T 细胞活化是同种异体造血细胞移植 (allo-HCT) 和同种异体 CAR-T 细胞治疗过程中移植抗宿主病 (GVHD) 发病机制的关键步骤。

人类白细胞抗原 (HLA) 系统或复合物是一组由人类主要组织相容性复合物 (MHC) 基因复合物编码的相关蛋白质。这些细胞表面蛋白负责调节免疫系统。在治疗性移植环境中, 当同种异体移植上的供体 HLA 与受体不同时, 就会发生“HLA 不匹配”。HLA 不匹配导致同种异体反应性 T 细胞的激活, 这会在移植后的六个月内引起急性细胞排斥 (ACR)。错配的供体 HLA 抗原也是新生供体特异性 HLA 抗体 (dnDSA) 开发的靶标, 其在急性和慢性移植 T 细胞排斥中发挥增强作用。因此, 为了产生用于安全同种异体输注和治疗目的的通用 T 细胞, 建议通过基因破坏 TCR 来有效阻断移植抗宿主病 (GVHD)。此外, 有必要抑制同种异体 T 细胞上的 HLA 表达, 以减少受体免疫系统对同种异体 T 细胞 TCR $\alpha\beta$ 和/或 HLA I 类的排斥反应。

因此, 需要开发新的细胞治疗方法, 以便能克服现有细胞治疗中面临的肿瘤靶标差异性, 肿瘤免疫抑制环境, 个性化治疗细胞来源问题, 无法标准化和规模化生产, 杀伤效率低等问题。

发明内容

本公开的目的是为了克服现有肿瘤细胞治疗中面临的肿瘤靶标多样性, 肿瘤免疫抑制环境, 个性化治疗细胞来源问题, 无法标准化和规模化生产, 杀伤效率低等的问题, 本公开的一个目的是提供一种通用 T (Universal T, UT) 组件, 其可以劫持 ERAD 机制以阻止 ER 中的 TCR、MHC 分子, 阻止其运输并促进其易位到细胞质中, 以通过蛋白酶体进行泛素化和降解。这种设计可以针对任何蛋白质 (包括内源性蛋白质或外源性蛋白质), 以有效抑制表达和快速降解以达到治疗目的。

UT 组件的概念是基于发现病毒 ER 驻留糖蛋白可以劫持 ERAD 调节机制来抑制/阻断 MHC 分子组装、运输或促进其泛素化和蛋白酶体降解, 从而抑制 MHC 介导的病毒抗原呈递以避免免疫监视。TCR 的有效下调将显著抑制 TCR 介导的免疫攻击并减少 T 细胞同种异体输血过程中的 GVHD。包括天然病毒内质网驻留糖蛋白可以进一步抑制 MHC 分子, 从而阻止肽呈递给受体 CD8⁺T 细胞并抑制同种异体 T 细胞的免疫识别。因此, UT 组件可以提高输注后同种异体 T 细胞的相容性和长期持久性。对于细胞治疗目的, TCR $\alpha\beta$ 和 MHC 分子表面表达有缺陷的通用 T 细胞可以进一步基因工程用于治疗目的。

本公开的另一个目的是提供通过导入 NK 元件, 特别是优化重组的 NK 元件, 让 T 细胞能象 NK 细胞一样高效广谱的识别所有病毒感染细胞和肿瘤细胞, 通过优化转导元件, CNK-T 细胞能高效激活并杀伤肿瘤细胞。因为 NK 靶点包括 MICA、MICB 和 ULBP1-6 等家族成员蛋白, 能广泛表达在各类肿瘤细胞并覆盖肿瘤进展的不同阶

效激活 T 细胞, 并实现对肿瘤细胞的杀伤。复合型转接器 (Chimeric Adaptor) 实现放大 CNK-T 细胞信号, 能抵抗肿瘤环境中的免疫抑制, 实现对 T 细胞的激活, 实现对肿瘤细胞的杀伤; 再有 CNK-T 细胞通过 NK 识别靶点, 还能清除 MDSC 等免疫抑制细胞。病毒感染细胞后, 表达特定功能蛋白, MHC I 的组装或转运或直接促进 MHC I 分子的定向降解, 从而抑制病毒抗原表位的呈递, 产生免疫逃逸。

本公开通过重新设计病毒元件, 靶向 TCR 分子, 实现 TCR 分子内质网滞留和定向降解, 同时, 本公开还通过导入特定病毒元件, 实现 MHC I 分子的表达抑制或定向降解, 从而实现 T 细胞通用型改造。

在本公开中验证了 CNK-UT 具有广谱的肿瘤识别和杀伤能力。本公开进一步设计复合特定靶点 CAR/CNK-UT 产品, 论证了 CAR/CNK-UT 产品比常规 CAR-T 对肿瘤细胞具有更强大的杀伤和激活功能; 在动物实验, CAR/CNK-UT 产品也具有更高效的肿瘤清除能力。UT 技术实现了异体通用型的改造, T 细胞来源健康供者, 从而实现了 CNK-UT 产品的标准化和规模化生产, 可以提前制备, 并保证 T 细胞对肿瘤细胞杀伤和激活的功能。

附图说明

图 1 示出了四种结构的 CNK-UT 多功能复合体 (multi-functional complex), 其中, 图 1A 为基本 CNK-UT 多功能复合体; 图 1B 为增加靶向 MHC I 结合蛋白分子结构域的 CNK-UT 多功能复合体; 图 1C 为增加靶向 MHC I 的结合蛋白分子结构域和复合型转接器的 CNK-UT 多功能复合体; 图 1D 为增加靶向 MHC I 的结合蛋白分子结构域和 CAR 或 TCR 等靶向杀伤肿瘤细胞的受体的 CNK-UT 多功能复合体。

图 2 示出了四种表达 CNK-UT 多功能复合体的 CNK-UT 元件的结构, 其中, 如图 2A 所示, 单一慢病毒 EF1 α 启动子表达载体, 启动表达 CNK-UT 元件其中一种组合: DAP10-DAP12 ICD-T2A-NKG2D-p2A-anti-TCR-AdE3 ERAD; 如图 2B 所示, 利用单一慢病毒 EF1 α 启动子表达载体, 启动表达 CNK-UT 元件其中一种组合: DAP10-DAP12 ICD-T2A-NKG2D-p2A-anti-TCR-US2 ERAD; 如图 2C 所示, 利用单一慢病毒表达载体, 利用 EF1 α 和 CMV 启动子, 分别调控 DAP10-CD3 ζ -T2A-NKG2D-p2A-anti-TAA scFv-DAP10 和 anti-TCR-AdE3 ERAD-E2A-AdE3 多基因的表达, 实现在单个载体上表达多个 CNK-UT 功能元件; 如图 2D 所示, 利用两种不同慢病毒表达载体, 分别调控 anti-TAA scFv-CD28/4-1BB-CD3 ζ -T2A-CD3 ζ -p2A-NKG2D 和 anti-TCR- AdE3 ERAD-T2A-AdE3 的表达, 共转染 T 细胞后, 实现同一 T 细胞上表达 CNK-UT 多个功能元件。

图 3 示出了一种 CNK-UT (DAP10-CD3 ζ -T2A-NKG2D-p2A-anti-TCR scFv-AdE3) 细胞基本表型的流式细胞检测结果。

图 4 示出了 CNK-UT 细胞对人结肠腺瘤细胞系 HT29 的识别和特异性杀伤结果, 其中, 图 4A 示出了人结肠腺瘤细胞系 HT29 不同 NK 靶点蛋白的表达情况; 图 4B 示出了 CNK-UT 细胞具有对 HT29 高效的杀伤和激活功能。

图 5 示出了 CNK-UT 细胞对 MDA-MB453 的识别和特异性杀伤, 其中, 图 5A 示出了三阴乳腺癌细胞系 MDA-MB453 不同 NK 靶点蛋白的表达情况; 图 5B 示出了 CNK-UT 细胞对 THP1 显示高效的杀伤和激活功能。

图 6 示出了 CNK-UT 细胞对 THP1 的识别和特异性杀伤, 其中, 图 6A 示出了急性髓系白血病细胞 THP1 不同 NK 靶点的表达情况; 图 6B 示出了 CAR/CNK-UT 细胞比常规 CAR-T 细胞显示对 HepG2 细胞更高效的杀伤和激活功能。

图 7 示出了 CNK-UT 细胞能升级常规 CAR-T 技术, 实现更强大的靶向杀伤和激活能力, 其中, 图 7A 示出了肝细胞癌 (HCC) HepG2 的 GPC3、PD-L1 和不同 NK 靶点的表达情况; 图 7B 示出了

图 8 示出了 CNK-UT 细胞能升级常规 CAR-T 技术, 实现对高表达 PD-L1 肿瘤细胞的靶向杀伤和激活能力, 其中, 图 8A 示出了肝细胞癌 (HCC) PLC 的 GPC3、PD-L1 和不同 NK 靶点的表达情况; 图 8B 示出了 CNK-UT 细胞比常规 CAR-T 细胞显示对 HepG2 细胞更高效的杀伤和激活功能。

图 9 示出了 GPC3 CAR/CNK-UT 细胞比 GPC3 CAR-T 细胞在小鼠体内具有更高效的肿瘤清除能力。

图 10 示出了 GPC3 CAR/CNK-UT 细胞比 GPC3 CAR-T 具有高效的肿瘤清除能力。

图 11 示出了 GPC3 CAR/CNK-UT 能特异性的识别和杀伤三阴乳腺癌细胞 MDA-MB453。

图 12 示出了 GPC3 CAR/CNK-UT 能特异性的识别和杀伤急性髓系白血病细胞系 THP1。

图 13 示出了 CNK-UT 细胞对肾细胞癌 786-O 细胞的识别, 特异性杀伤和激活能力。

图 14 示出了 CNK-UT 细胞对肾细胞癌 ACHN 细胞的识别, 特异性杀伤和激活能力。

图 15 示出了 CNK-UT 细胞对肺上皮腺瘤 A549 细胞的识别, 特异性杀伤和激活能力。

图 16 示出了 CNK-UT 细胞对 AML 细胞系 UL60 的识别, 特异性杀伤和激活能力。

图 17 示出了 CNK-UT 细胞对 AML 细胞系 U937 (购自 U937, 货号 CL-0239) 的识别, 特异性杀伤和激活能力。

图 18 示出了 CNK-UT 细胞对 AML 细胞系 U937 的识别, 特异性杀伤和激活能力。

图 19 示出了 CNK-UT 细胞对胰腺癌细胞系 PANC-1 (购自普诺赛, 货号 CL-0184) 的识别, 特异性杀伤和激活能力。

具体实施方式

在本发明中, 除非另有说明, 否则本文中使用的科学和技术名词具有本领域技术人员所通常理解的含义。并

释。

术语“嵌合自然杀伤受体”（chimeric natural killer receptor, CNK）是指含有嵌合型 NK 激活受体组件和嵌合型 NK 信号转接组件的组合物。

术语“CNK T 细胞”是指含有 CNK 构建体的 T 细胞。

术语“嵌合自然杀伤受体通用型 T 细胞”（chimeric natural killer receptor-Universal T cell, CNK-UT）是指表达 NK 激活受体组件构建体、CNK 信号转接组件构建体和 UT 组件构建体的 T 细胞。

术语“CAR/CNK-UT”是嵌合抗原受体和嵌合自然杀伤受体通用型 T 细胞（chimeric antigen receptor & chimeric natural killer receptor-Universal T cell, CNK-UT），是指表达靶向特定肿瘤抗原 CAR 结构，NK 激活受体组件构建体、CNK 信号转接组件构建体和 UT 组件构建体的 T 细胞。

如在本文中所使用的术语“约”指可测量的值，例如量、持续时间等，并且包括与指定值相差 $\pm 20\%$ 、 $\pm 10\%$ 、 $\pm 5\%$ 、 $\pm 1\%$ 、 $\pm 0.5\%$ 或 $\pm 0.1\%$ 的变化方式。

如在本文中所使用的术语“抗体”指与抗原特异性结合的免疫球蛋白分子。抗体可以是源自天然来源或重组来源的完整免疫球蛋白并且可以是完整免疫球蛋白的免疫反应部分。抗体通常是免疫球蛋白分子的四聚体。本公开中的抗体可以以多种形式存在，包括例如多克隆抗体、单克隆抗体、Fv、Fab 和 F(ab)，以及单链抗体和人源化抗体。

如在本文中所使用的术语“共刺激配体”包括在抗原呈递细胞（例如 APC、树突状细胞、B 细胞和其他免疫细胞）上的分子，其特异性结合 T 细胞上的关联共刺激分子，从而提供信号，该信号除了通过例如 TCR/CD3 复合物与载有肽的 MHC 分子结合提供的初级信号外，还介导 T 细胞响应，包括但不限于增殖、激活、分化等。共刺激配体可包括但不限于 CD7、B7-1（CD80）、B7-2（CD86）、PD-L1、PD-L2、4-1BBL、OX40L、诱导型共刺激配体（ICOS-L）、细胞间粘附分子（ICAM）、CD30L、CD40、CD70、CD83、HLA-G、MICA、MICB、HVEM、淋巴瘤病毒 β 受体、3/TR6、ILT3、ILT4、HVEM，与 Toll 配体受体结合的激动剂或抗体以及与 B7-H3 特异性结合的配体。共刺激配体还包括尤其是与 T 细胞上存在的共刺激分子特异性结合的抗体，例如但不限于 CD27、CD28、4-1BB、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、淋巴细胞功能相关抗原-1（LFA-1）、CD2、CD7LIGHT、NKG2C、B7-H3 和与 CD83 特异性结合的配体。

“共刺激分子”或“共刺激受体”指 T 细胞上的关联结合配偶体，其与共刺激配体特异性结合，从而介导 T 细胞的共刺激响应，例如但不限于增殖。共刺激分子包括但不限于 MHC I 类分子、BTLA、Toll 配体受体。共刺激分子还包括非天然工程化蛋白。

如在本文中所使用的“共刺激信号”指与初级信号例如 TCR/CD3 连接结合，导致 T 细胞增殖和/或关键分子的上调或下调的信号。

术语“刺激”是指通过刺激性分子（例如 TCR/CD3 复合物）与其关联配体结合诱导的初级响应，从而介导信号转导事件，例如但不限于，通过 TCR/CD3 复合物进行信号转导。刺激可以介导某些分子的改变的表达，例如 TGF- β 的下调，和/或细胞骨架结构的重组，等等。

如在本文中所使用的术语“刺激性分子”指 T 细胞上与抗原呈递细胞上存在的关联刺激性配体特异性结合分子。

如在本文中所使用的“刺激性配体”指当存在于抗原呈递细胞（例如 APC、树突状细胞、B 细胞等）上时可以与 T 细胞上的关联结合配偶体（在本文中称为“刺激性分子”）特异性结合，从而介导 T 细胞的初级应答，包括但不限于激活、免疫应答的启动、增殖等的配体。刺激性配体在本领域中是众所周知的，并且包括，尤其是，载有肽的 MHC I 类分子、抗 CD3 抗体、超激动剂抗 CD28 抗体，和超激动剂抗 CD2 抗体。

“载体”是包含分离的核酸并且可以用于将分离的核酸递送至细胞内部的物质组合物。许多载体是本领域已知的，包括但不限于线性多核苷酸、与离子或两性化合物相关的多核苷酸、质粒和病毒。因此，术语“载体”包括自主复制质粒或病毒。该术语也应解释为包括有助于核酸转移到细胞中的非质粒和非病毒化合物，例如聚赖氨酸化合物、脂质体等。病毒载体的实例包括但不限于慢病毒、腺病毒载体、腺相关病毒载体、逆转录病毒载体等。非病毒载体的实例包括但不限于 CRISPR 载体系统、Sleeping Beauty 转座子系统。如在本文中所使用的“激活”指已经被充分刺激以诱导可检测的细胞增殖的 T 细胞的状态。激活还可以与诱导的细胞因子产生和可检测的效应子功能相关。术语“激活的 T 细胞”尤其指正在进行细胞分裂的 T 细胞。

在一方面，本公开提供了一种多功能复合体（multi-functional complex），其包含以下组件：

（1）NK 激活受体组件，其至少包含 NK 细胞激活受体或其功能变体，所述 NK 细胞激活受体包含：（a）NK 细胞激活受体胞外结构域（ED）或其功能变体，（b）NK 细胞激活受体跨膜结构域（TMD）或其功能变体，以及（c）NK 细胞激活受体胞内结构域（ICD）或其功能变体；任选地，所述 NK 细胞激活受体胞外结构域或其功能变体、所述 NK 细胞激活受体跨膜结构域或其功能变体和/或所述 NK 细胞激活受体胞内结构域或其功能变体之间包含铰链或接头；

（2）CNK 信号转接组件，其至少包含（i）NK 细胞信号转换器（adaptor）或其功能变体，所述 NK 细胞信号转换器包含：（a）NK 细胞信号转换器胞外结构域（ED）或其功能变体，（b）NK 细胞信号转换器跨膜结构域（TMD）或其功能变体，以及（c）NK 细胞信号转换器胞内结构域（ICD）或其功能变体；任选地，所述 NK 细

(3) UT 组件, 其至少包含 (i) 靶向降解 TCR、MHC 和/或 NK 细胞靶点的重组蛋白分子或其功能变体, 所述靶向降解 TCR、MHC 和/或 NK 细胞靶点的重组蛋白分子包含: (a) 靶向 TCR、MHC 和/或 NK 细胞靶点的结合蛋白分子结构域或其功能变体, (b) 病毒内质网 (ER) 驻留糖蛋白的跨膜结构域或其功能变体, 以及 (c) 病毒内质网驻留糖蛋白的胞质结构域或其功能变体; 所述病毒内质网驻留糖蛋白的跨膜结构域或其功能变体和病毒内质网驻留糖蛋白的胞质结构域或其功能变体形成 ERAD 降解结构域; 任选地, 所述靶向 TCR 的结合蛋白分子结构域或其功能变体、所述病毒内质网驻留糖蛋白的跨膜结构域或其功能变体和/或所述病毒内质网驻留糖蛋白的胞质结构域或其功能变体之间包含铰链或接头。

任选地, 所述 NK 激活受体组件、所述 CNK 信号转接组件和/或所述 UT 组件之间包含铰链或接头。

在一些实施方案中, 所述 NK 激活受体组件中的所述 NK 细胞激活受体选自 NKG2D、NKG2C、NKG2E、NKG2F、NKG2H、CD94、KIR2DL4、KIR2DS1、KIR2DS2、KIR2DS4、KIR3DS1, 天然细胞毒性受体、TRAIL、DNAM-1、CD16a、2B4、NTB-A、CRACC 以及 NKp80; 优选地, 所述天然细胞毒性受体选自 NKp46、NKp44 和 NKp30。

在一些优选的实施方案中, 所述 NK 细胞激活受体是哺乳动物来源的 NK 细胞激活受体; 优选地, 所述哺乳动物选自人、灵长类动物、鼠、马、牛、绵羊、山羊、猫、猪、狗、美洲驼、羊驼、大象、松鼠、豚鼠。

在一些优选的实施方案中, 所述 NK 细胞激活受体是包含不同来源 NK 细胞激活受体结构域的重组 NK 细胞激活受体。

在一些优选的实施方案中, 所述 NK 细胞激活受体是人源的 NK 细胞激活受体; 优选地, 所述 NK 细胞激活受体是包含不同的人源 NK 细胞激活受体结构域的重组 NK 细胞激活受体。

在一些优选的实施方案中, 所述 NK 细胞激活受体是鼠源的 NK 细胞激活受体; 优选地, 所述 NK 细胞激活受体是包含不同的鼠源 NK 细胞激活受体结构域的重组 NK 细胞激活受体。

在一些优选的实施方案中, 所述 NK 细胞激活受体是包含人源和鼠源 NK 细胞激活受体结构域的重组 NK 细胞激活受体。

在一些优选的实施方案中, 所述 NK 细胞激活受体的胞外结构域为人或鼠的 NK 细胞激活受体的胞外结构域。

在一些优选的实施方案中, 所述 NK 细胞激活受体的跨膜结构域为人或鼠的 NK 细胞激活受体的跨膜结构域。

在一些优选的实施方案中, 所述 NK 细胞激活受体的胞内结构域为人或鼠的 NK 细胞激活受体的胞内结构域。

在一些优选的实施方案中, 所述 NK 细胞激活受体功能变体选自 NK 细胞激活受体的突变体, 野生型融合蛋白, 或野生型与突变型的融合蛋白。

在一些优选的实施方案中, 人 NKG2D 的胞外域包含与 SEQ ID NO. 1 所示氨基酸序列具有 80%或以上同一性的氨基酸序列, 优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一性的氨基酸序列, 更优选具有 98%或 99%以上同一性的氨基酸序列; 人 NKG2D 的胞外域的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 1 所示。

在一些优选的实施方案中, 人 NKG2D 的全长序列包含与 SEQ ID NO. 2 所示氨基酸序列具有 80%或以上同一性的氨基酸序列, 优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一性的氨基酸序列, 更优选具有 98%或 99%以上同一性的氨基酸序列; 人 NKG2D 的全长序列的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 2 所示。

在一些优选的实施方案中, 小鼠 NKG2D 的胞外域包含与 SEQ ID NO. 3 所示氨基酸序列具有 80%或以上同一性的氨基酸序列, 优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一性的氨基酸序列, 更优选具有 98%或 99%以上同一性的氨基酸序列; 小鼠 NKG2D 的胞外域的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 3 所示。

在一些优选的实施方案中, 小鼠 NKG2D 的全长序列包含与 SEQ ID NO:4 所示氨基酸序列具有 80%或以上同一性的氨基酸序列, 优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一性的氨基酸序列, 更优选具有 98%或 99%以上同一性的氨基酸序列; 小鼠 NKG2D 的全长序列的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 4 所示。

在一些优选的实施方案中, 人鼠重组 NKG2D 的全长序列包含与 SEQ ID NO:5 所示氨基酸序列具有 80%或以上同一性的氨基酸序列, 优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一性的氨基酸序列, 更优选具有 98%或 99%以上同一性的氨基酸序列; 人鼠重组 NKG2D 的全长序列的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 5 所示。

在一些优选的实施方案中, 人 NKG2C 的全长序列包含与 SEQ ID NO. 6 所示氨基酸序列具有 80%或以上同一性的氨基酸序列, 优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一性的氨基酸序列, 更优选具有 98%或 99%以上同一性的氨基酸序列; 人 NKG2C 的全长序列的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 6 所示。

在一些优选的实施方案中, 人 NKG2E 的全长序列包含与 SEQ ID NO: 7 所示氨基酸序列具有 80%或以上同一性的氨基酸序列, 优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一性的氨基酸序列, 更优选具有 98%或 99%以上同一性的氨基酸序列; 人 NKG2E 的全长序列的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 7 所示。

在一些优选的实施方案中, 人 NKG2F 的全长序列包含与 SEQ ID NO: 8 所示氨基酸序列具有 80%或以上同一性的氨基酸序列, 优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一性的氨基酸序列, 更优选具有 98%或 99%以上同一性的氨基酸序列; 人 NKG2F 的全长序列的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 8 所示。

在一些优选的实施方案中, 人 CD94 的全长序列包含与 SEQ ID NO. 9 所示氨基酸序列具有 80%或以上同一性的氨基酸序列, 优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一性的氨基酸序列, 更优选具有 98%或 99%以上同一性的氨基酸序列; 的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 9 所示。

有 98%或 99%以上同一性的氨基酸序列；人 KIR2DL4 的全长序列的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 10 所示。

5 在一些优选的实施方案中，人 KIR2DS1 的全长序列包含与 SEQ ID NO: 11 所示氨基酸序列具有 80%或以上同一性的氨基酸序列，优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一性的氨基酸序列，更优选具有 98%或 99%以上同一性的氨基酸序列；人 KIR2DS1 的全长序列的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 11 所示。

在一些优选的实施方案中，人 KIR2DS2 的全长序列包含与 SEQ ID NO: 12 所示氨基酸序列具有 80%或以上同一性的氨基酸序列，优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一性的氨基酸序列，更优选具有 98%或 99%以上同一性的氨基酸序列；人 KIR2DS2 的全长序列的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 12 所示。

10 在一些优选的实施方案中，人 KIR2DS4 的全长序列包含与 SEQ ID NO: 13 所示氨基酸序列具有 80%或以上同一性的氨基酸序列，优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一性的氨基酸序列，更优选具有 98%或 99%以上同一性的氨基酸序列；人 KIR2DS4 的全长序列的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 13 所示。

在一些优选的实施方案中，人 KIR3DS1 的全长序列包含与 SEQ ID NO: 14 所示氨基酸序列具有 80%或以上同一性的氨基酸序列，优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一性的氨基酸序列，更优选具有 98%或 99%以上同一性的氨基酸序列；人 KIR3DS1 的全长序列的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 14 所示。

15 在一些优选的实施方案中，人 NKp46 的全长序列包含与 SEQ ID NO. 15 所示氨基酸序列具有 80%或以上同一性的氨基酸序列，优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一性的氨基酸序列，更优选具有 98%或 99%以上同一性的氨基酸序列；人 NKp46 的全长序列的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 15 所示。

20 在一些优选的实施方案中，人 NKp44 的全长序列包含与 SEQ ID NO. 16 所示氨基酸序列具有 80%或以上同一性的氨基酸序列，优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一性的氨基酸序列，更优选具有 98%或 99%以上同一性的氨基酸序列；人 NKp44 的全长序列的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 16 所示。

在一些优选的实施方案中，人 NKp30 的全长序列包含与 SEQ ID NO. 17 所示氨基酸序列具有 80%或以上同一性的氨基酸序列，优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一性的氨基酸序列，更优选具有 98%或 99%以上同一性的氨基酸序列；人 NKp30 的全长序列的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 17 所示。

25 在一些优选的实施方案中，人 DNAM1 的全长序列包含与 SEQ ID NO: 18 所示氨基酸序列具有 80%或以上同一性的氨基酸序列，优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一性的氨基酸序列，更优选具有 98%或 99%以上同一性的氨基酸序列；人 DNAM1 的全长序列的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 18 所示。

30 在一些优选的实施方案中，人 TRAIL 的全长序列包含与 SEQ ID NO: 19 所示氨基酸序列具有 80%或以上同一性的氨基酸序列，优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一性的氨基酸序列，更优选具有 98%或 99%以上同一性的氨基酸序列；人 TRAIL 的全长序列的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 19 所示。

在一些优选的实施方案中，人 CD16a 的全长序列包含与 SEQ ID NO: 20 所示氨基酸序列具有 80%或以上同一性的氨基酸序列，优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一性的氨基酸序列，更优选具有 98%或 99%以上同一性的氨基酸序列；人 CD16a 的全长序列的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 20 所示。

35 在一些优选的实施方案中，人 2B4 的全长序列包含与 SEQ ID NO: 21 所示氨基酸序列具有 80%或以上同一性的氨基酸序列，优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一性的氨基酸序列，更优选具有 98%或 99%以上同一性的氨基酸序列；人 2B4 的全长序列的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 21 所示。

在一些优选的实施方案中，人 NTB-A 的全长序列包含与 SEQ ID NO: 22 所示氨基酸序列具有 80%或以上同一性的氨基酸序列，优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一性的氨基酸序列，更优选具有 98%或 99%以上同一性的氨基酸序列；人 NTB-A 的全长序列的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 22 所示。

40 在一些优选的实施方案中，人 CRACC 的全长序列包含与 SEQ ID NO: 23 所示氨基酸序列具有 80%或以上同一性的氨基酸序列，优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一性的氨基酸序列，更优选具有 98%或 99%以上同一性的氨基酸序列；人 CRACC 的全长序列的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 23 所示。

45 在一些优选的实施方案中，人 NKp80 的全长序列包含与 SEQ ID NO: 24 所示氨基酸序列具有 80%或以上同一性的氨基酸序列，优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一性的氨基酸序列，更优选具有 98%或 99%以上同一性的氨基酸序列；人 NKp80 的全长序列的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 24 所示。

在一些实施方案中，所述 CNK 信号转接组件中的所述 NK 细胞信号转换器为 DAP10 或 DAP12。

在一些优选的实施方案中，所述 NK 细胞信号转换器是哺乳动物来源的 NK 细胞信号转换器；优选地，所述哺乳动物选自人、灵长类动物、鼠、马、牛、绵羊、山羊、猫、猪、狗、美洲驼、羊驼、大象、松鼠、豚鼠。

50 在一些优选的实施方案中，所述 NK 细胞信号转换器是包含不同来源 NK 细胞信号转换器结构域的重组 NK 细胞信号转换器。

在一些优选的实施方案中，所述 NK 细胞信号转换器是人源的 NK 细胞信号转换器；优选地，所述 NK 细胞信号转换器是包含不同的人源 NK 细胞信号转换器结构域的重组 NK 细胞信号转换器。

在一些优选的实施方案中，所述 NK 细胞信号转换器是鼠源的 NK 细胞信号转换器；优选地，所述 NK 细胞信号转换器是包含不同的鼠源 NK 细胞信号转换器结构域的重组 NK 细胞信号转换器。

55 在一些优选的实施方案中，所述 NK 细胞信号转换器是包含人源和鼠源 NK 细胞信号转换器结构域的重组 NK 细胞信号转换器。

在一些优选的实施方案中,所述NK细胞信号转换器的跨膜结构域为人或鼠的NK细胞信号转换器的跨膜结构域。

在一些优选的实施方案中,所述NK细胞信号转换器的胞内结构域为人或鼠的NK细胞信号转换器的胞内结构域;

在一些优选的实施方案中,所述CNK细胞信号转换器功能变体选自DAP10突变体或DAP12的突变体,或DAP10和DAP12的融合蛋白,或野生型DAP10或DAP12与突变型DAP10或DAP12的融合蛋白。

在一些优选的实施方案中,所述CNK信号转接组件还包含(ii)免疫受体活化信号传导结构域(ITAM)和/或(iii)T细胞共刺激信号传导结构域。

在一些优选的实施方案中,所述NK细胞信号转换器或其功能变体、所述免疫受体活化信号传导结构域(ITAM)和/或所述T细胞共刺激信号传导结构域之间包含铰链或接头;优选地,所述NK细胞信号转换器或其功能变体与所述免疫受体活化信号传导结构域(ITAM)域融合。

在一些优选的实施方案中,所述免疫受体活化信号传导结构域(ITAM)来自免疫受体的胞内激活信号传导结构域;优选地,所免疫受体选自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、Dectin-1、CLEC-1、CD72、CD79A、CD79B;优选地,所述免疫受体活化信号传导结构域(ITAM)与NK细胞信号转换器或其功能变体融合;优选地,所述免疫受体是CD3 ζ 。

在一些优选的实施方案中,所述T细胞共刺激信号传导结构域来自共刺激分子的胞内信号结构域;优选地,所述共刺激分子选自MHC I类分子、TNF受体蛋白、免疫球蛋白样蛋白质、细胞因子受体、整联蛋白、淋巴细胞活化信号分子(SLAM蛋白)、活化NK细胞受体、BTLA、Toll配体受体、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、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、CD100 SEMA4D)、CD69、SLAMF6(NTB-A、Ly108)、SLAM(SLAMF1、CD150、IPO-3)、BLAME(SLAMF8)、SELPLG(CD162)、LTBR、LAT、GADS、SLP-76、PAG/Cbp、CD19a、与CD83特异性结合的配体、CARD11、FcRa、FcRp、FcR γ 、Fyn、HVEM、ICOS、Lck、LAG3、LAT、LRP、NOTCH1、Wnt、OX40、ROR2、Ryk、SLAMF1、Slp76、pTa、TCRa、TCRp、TRIM、ZAP70、PTCH2。

在一些优选的实施方案中,人DAP10的全长序列包含与SEQ ID NO. 25所示氨基酸序列具有80%或以上同一性的氨基酸序列,优选具有85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一性的氨基酸序列,更优选具有98%或99%以上同一性的氨基酸序列;人DAP10的全长序列的氨基酸序列如SEQ ID NO. 25所示。

在一些优选的实施方案中,人DAP10的全长序列包含与SEQ ID NO. 26所示氨基酸序列具有80%或以上同一性的氨基酸序列,优选具有85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一性的氨基酸序列,更优选具有98%或99%以上同一性的氨基酸序列;人DAP10的全长序列的氨基酸序列如SEQ ID NO. 26所示。

在一些优选的实施方案中,人DAP10的跨膜结构域包含与SEQ ID NO. 27所示氨基酸序列具有80%或以上同一性的氨基酸序列,优选具有85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一性的氨基酸序列,更优选具有98%或99%以上同一性的氨基酸序列;人DAP10的跨膜结构域的氨基酸序列如SEQ ID NO. 27所示。

在一些优选的实施方案中,人DAP12的全长序列包含与SEQ ID NO. 28所示氨基酸序列具有80%或以上同一性的氨基酸序列,优选具有85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一性的氨基酸序列,更优选具有98%或99%以上同一性的氨基酸序列;人DAP12的全长序列的氨基酸序列如SEQ ID NO. 28所示。

在一些优选的实施方案中,人DAP12的跨膜结构域包含与SEQ ID NO. 29所示氨基酸序列具有80%或以上同一性的氨基酸序列,优选具有85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一性的氨基酸序列,更优选具有98%或99%以上同一性的氨基酸序列;人DAP12的跨膜结构域的氨基酸序列如SEQ ID NO. 29所示。

在一些优选的实施方案中,人DAP10和人DAP12的跨膜结构域融合蛋白包含与SEQ ID NO. 30所示氨基酸序列具有80%或以上同一性的氨基酸序列,优选具有85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一性的氨基酸序列,更优选具有98%或99%以上同一性的氨基酸序列;人DAP10和人DAP12的跨膜结构域的氨基酸序列如SEQ ID NO. 30所示。

在一些优选的实施方案中,人DAP10-DAP12融合蛋白序列包含与SEQ ID NO. 31所示氨基酸序列具有80%或以上同一性的氨基酸序列,优选具有85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一性的氨基酸序列,更优选具有98%或99%以上同一性的氨基酸序列;人DAP10-DAP12融合蛋白序列的氨基酸序列如SEQ ID NO. 31所示。

在一些优选的实施方案中,人CD3zeta胞内信号传导结构域序列包含与SEQ ID NO. 32所示氨基酸序列具有80%或以上同一性的氨基酸序列,优选具有85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一性的氨基酸序列。

在一些优选的实施方案中，人 DAPI0-CD3zeta 序列包含与 SEQ ID NO. 33 所示氨基酸序列具有 80%或以上同一性的氨基酸序列，优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一性的氨基酸序列，更优选具有 98%或 99%以上同一性的氨基酸序列；人 DAPI0-CD3zeta 序列的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 33 所示。

在一些优选的实施方案中，人 DAPI2-CD3zeta 序列包含与 SEQ ID NO. 34 所示氨基酸序列具有 80%或以上同一性的氨基酸序列，优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一性的氨基酸序列，更优选具有 98%或 99%以上同一性的氨基酸序列；人 DAPI2-CD3zeta 序列的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 34 所示。

在一些优选的实施方案中，人 DAPI0-DAPI2-CD3zeta 序列包含与 SEQ ID NO. 35 所示氨基酸序列具有 80%或以上同一性的氨基酸序列，优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一性的氨基酸序列，更优选具有 98%或 99%以上同一性的氨基酸序列；人 DAPI0-DAPI2-CD3zeta 序列的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 35 所示。

在一些优选的实施方案中，人 41BB 胞内信号传导结构域序列包含与 SEQ ID NO. 36 所示氨基酸序列具有 80%或以上同一性的氨基酸序列，优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一性的氨基酸序列，更优选具有 98%或 99%以上同一性的氨基酸序列；人 41BB 胞内信号传导结构域序列的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 36 所示。

在一些优选的实施方案中，人 DAPI0-41BB 序列包含与 SEQ ID NO. 37 所示氨基酸序列具有 80%或以上同一性的氨基酸序列，优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一性的氨基酸序列，更优选具有 98%或 99%以上同一性的氨基酸序列；人 DAPI0-41BB 序列的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 37 所示。

在一些优选的实施方案中，人 DAPI0-41BB-CD3zeta 序列包含与 SEQ ID NO. 38 所示氨基酸序列具有 80%或以上同一性的氨基酸序列，优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一性的氨基酸序列，更优选具有 98%或 99%以上同一性的氨基酸序列；人 DAPI0-41BB-CD3zeta 序列的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 38 所示。

在一些优选的实施方案中，人 CD28 胞内信号传导结构域序列包含与 SEQ ID NO. 39 所示氨基酸序列具有 80%或以上同一性的氨基酸序列，优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一性的氨基酸序列，更优选具有 98%或 99%以上同一性的氨基酸序列；人 CD28 胞内信号传导结构域序列的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 39 所示。

在一些优选的实施方案中，人 DAPI0-CD28 序列包含与 SEQ ID NO. 40 所示氨基酸序列具有 80%或以上同一性的氨基酸序列，优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一性的氨基酸序列，更优选具有 98%或 99%以上同一性的氨基酸序列；人 DAPI0-CD28 序列的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 40 所示。

在一些优选的实施方案中，人 DAPI0-CD28-CD3zeta 序列包含与 SEQ ID NO. 41 所示氨基酸序列具有 80%或以上同一性的氨基酸序列，优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一性的氨基酸序列，更优选具有 98%或 99%以上同一性的氨基酸序列；人 DAPI0-CD28-CD3zeta 序列的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 41 所示。

在一些优选的实施方案中，人 DAPI2-41BB 序列包含与 SEQ ID NO. 42 所示氨基酸序列具有 80%或以上同一性的氨基酸序列，优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一性的氨基酸序列，更优选具有 98%或 99%以上同一性的氨基酸序列；人 DAPI2-41BB 序列的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 42 所示。

在一些优选的实施方案中，人 DAPI2-41BB-CD3zeta 序列包含与 SEQ ID NO. 43 所示氨基酸序列具有 80%或以上同一性的氨基酸序列，优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一性的氨基酸序列，更优选具有 98%或 99%以上同一性的氨基酸序列；人 DAPI2-41BB-CD3zeta 序列的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 43 所示。

在一些优选的实施方案中，人 DAPI2-CD28 序列包含与 SEQ ID NO. 44 所示氨基酸序列具有 80%或以上同一性的氨基酸序列，优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一性的氨基酸序列，更优选具有 98%或 99%以上同一性的氨基酸序列；人 DAPI2-CD28 序列的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 44 所示。

在一些优选的实施方案中，人 DAPI2-CD28-CD3zeta 序列包含与 SEQ ID NO. 45 所示氨基酸序列具有 80%或以上同一性的氨基酸序列，优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一性的氨基酸序列，更优选具有 98%或 99%以上同一性的氨基酸序列；人 DAPI2-CD28-CD3zeta 序列的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 45 所示。

在一些实施方案中，在所述 UT 组件的靶向降解 TCR 的重组蛋白分子中，所述靶向 TCR 的结合蛋白分子结构域或其功能变体来自 TCR 抗体或其功能片段或其组合。

在一些优选的实施方案中，所述抗体选自 TCR α 抗体、TCR β 抗体、TCR $\alpha\beta$ 抗体、TCR γ 抗体、TCR δ 抗体、TCR $\gamma\delta$ 抗体、TCR V δ 2 抗体、TCR C β 1 抗体；所述抗体的功能片段选自 Fd、Fv、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv(scFv)、单链抗体 (scFv) 或纳米抗体 (nanobody)、双链抗体、三链抗体和四链抗体；优选地，所述 TCR 抗体是 TCR 单链抗体；优选地，所述 TCR 单链抗体的氨基酸序列包含与 SEQ ID NO. 116 所示氨基酸序列具有 80%或以上同一性的氨基酸序列，优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一性的氨基酸序列，更优选具有 98%或 99%以上同一性的氨基酸序列；所述 TCR 单链抗体的全长序列的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 116 所示。

在一些优选的实施方案中，所述 UT 组件中的 ERAD 降解结构域来自 HCMV 糖蛋白 US2、US3、US11 或

5

10

15

30

50

有 80%或以上同一性的氨基酸序列, 优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一性的氨基酸序列, 更优选具有 98%或 99%以上同一性的氨基酸序列; 所述腺病毒 E3-19K 的 ERAD 降解结构域的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 60 所示。

在一些优选的实施方案中, 所述 HHV-7 US21 的全长序列包含与 SEQ ID NO. 61 所示氨基酸序列具有 80%或以上同一性的氨基酸序列, 优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一性的氨基酸序列, 更优选具有 98%或 99%以上同一性的氨基酸序列; 所述 HHV-7 US21 的全长序列的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 61 所示。

在一些优选的实施方案中, 所述 HHV-7 US21 的 MHC 结合结构域包含与 SEQ ID NO. 62 所示氨基酸序列具有 80%或以上同一性的氨基酸序列, 优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一性的氨基酸序列, 更优选具有 98%或 99%以上同一性的氨基酸序列; 所述 HHV-7 US21 的 MHC 结合结构域的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 62 所示。

在一些优选的实施方案中, 所述 HHV-7 US21 的 ERAD 降解结构域包含与 SEQ ID NO. 63 所示氨基酸序列具有 80%或以上同一性的氨基酸序列, 优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一性的氨基酸序列, 更优选具有 98%或 99%以上同一性的氨基酸序列; 所述 HHV-7 US21 的 ERAD 降解结构域的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 63 所示。

在一些实施方案中, 所述 UT 组件还包含 (ii) 靶向 MHC I 和/或 MHC II 的结合蛋白分子结构域或其功能变体。

在一些优选的实施方案中, 所述靶向 MHC I 和/或 MHC II 的结合蛋白分子结构域或其功能变体为靶向 HLA 的结合蛋白分子结构域或其功能变体。

在一些优选的实施方案中, 所述靶向 MHC I 和/或 MHC II 的结合蛋白分子结构域或其功能变体来自抑制 MHC 分子表达或促进其降解的病毒内质网蛋白; 优选地, 所述病毒内质网糖蛋白选自 HCMV US6、HSV ICP47、CPXV012、HPV E6/E7、EBV BNFL2a 或 BHV UL49.5; 优选地, 所述靶向 MHC I 和/或 MHC II 的结合蛋白分子结构域或其功能变体包含 TAP 结合结构域。

在一些优选的实施方案中, 所述 HCMV US6 的全长序列包含与 SEQ ID NO. 64 所示氨基酸序列具有 80%或以上同一性的氨基酸序列, 优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一性的氨基酸序列, 更优选具有 98%或 99%以上同一性的氨基酸序列; 所述 HCMV US6 的全长序列的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 64 所示。

在一些优选的实施方案中, 所述 HHV-7 US6 的 TAP 结合结构域包含与 SEQ ID NO. 65 所示氨基酸序列具有 80%或以上同一性的氨基酸序列, 优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一性的氨基酸序列, 更优选具有 98%或 99%以上同一性的氨基酸序列; 所述 HHV-7 US6 的 TAP 结合结构域的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 65 所示。

在一些优选的实施方案中, 所述 HSV ICP47 的全长序列包含与 SEQ ID NO. 66 所示氨基酸序列具有 80%或以上同一性的氨基酸序列, 优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一性的氨基酸序列, 更优选具有 98%或 99%以上同一性的氨基酸序列; 所述 HSV ICP47 的全长序列的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 66 所示。

在一些优选的实施方案中, 所述 HSV ICP47 的 TAP 结合结构域包含与 SEQ ID NO. 67 所示氨基酸序列具有 80%或以上同一性的氨基酸序列, 优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一性的氨基酸序列, 更优选具有 98%或 99%以上同一性的氨基酸序列; 所述 HSV ICP47 的 TAP 结合结构域的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 67 所示。

在一些优选的实施方案中, 所述 CPXV012 的全长序列包含与 SEQ ID NO. 68 所示氨基酸序列具有 80%或以上同一性的氨基酸序列, 优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一性的氨基酸序列, 更优选具有 98%或 99%以上同一性的氨基酸序列; 所述 CPXV012 的全长序列的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 68 所示。

在一些优选的实施方案中, 所述 CPXV012 的 TAP 结合结构域包含与 SEQ ID NO. 69 所示氨基酸序列具有 80%或以上同一性的氨基酸序列, 优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一性的氨基酸序列, 更优选具有 98%或 99%以上同一性的氨基酸序列; 所述 CPXV012 的 TAP 结合结构域的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 69 所示。

在一些优选的实施方案中, 所述 EBV BNFL2a 的全长序列包含与 SEQ ID NO. 70 所示氨基酸序列具有 80%或以上同一性的氨基酸序列, 优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一性的氨基酸序列, 更优选具有 98%或 99%以上同一性的氨基酸序列; 所述 EBV BNFL2a 的全长序列的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 70 所示。

在一些优选的实施方案中, 所述 EBV BNFL2a 的 TAP 结合结构域包含与 SEQ ID NO. 71 所示氨基酸序列具有 80%或以上同一性的氨基酸序列, 优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一性的氨基酸序列, 更优选具有 98%或 99%以上同一性的氨基酸序列; 所述 EBV BNFL2a 的 TAP 结合结构域的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 71 所示。

在一些优选的实施方案中, 所述 BHV UL49.5 的全长序列包含与 SEQ ID NO. 72 所示氨基酸序列具有 80%或以上同一性的氨基酸序列, 优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一性的氨基酸序列, 更优

在一些优选的实施方案中,所述 BHV UL49.5 的 TAP 结合结构域包含与 SEQ ID NO. 73 所示氨基酸序列具有 80%或以上同一性的氨基酸序列,优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一性的氨基酸序列,更优选具有 98%或 99%以上同一性的氨基酸序列;所述 BHV UL49.5 的 TAP 结合结构域的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 73 所示。

在一些优选的实施方案中,所述靶向 MHC I 和/或 MHC II 的结合蛋白分子结构域或其功能变体来自降解 MHC 和/或 MHC II 分子的病毒糖蛋白;优选地,病毒糖蛋白选自 HCMV 糖蛋白 US2、US3、US11 或 US10、腺病毒 E3-19K 或 HHV-7 US21。

在一些优选的实施方案中,所述 US2 的全长序列包含与 SEQ ID NO. 74 所示氨基酸序列具有 80%或以上同一性的氨基酸序列,优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一性的氨基酸序列,更优选具有 98%或 99%以上同一性的氨基酸序列;所述 US2 的全长序列的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 74 所示。

在一些优选的实施方案中,所述 US2 的 HLA 结合结构域包含与 SEQ ID NO. 75 所示氨基酸序列具有 80%或以上同一性的氨基酸序列,优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一性的氨基酸序列,更优选具有 98%或 99%以上同一性的氨基酸序列;所述 US2 的 HLA 结合结构域的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 75 所示。

在一些优选的实施方案中,所述 US2 的 ERAD 降解结构域包含与 SEQ ID NO. 76 所示氨基酸序列具有 80%或以上同一性的氨基酸序列,优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一性的氨基酸序列,更优选具有 98%或 99%以上同一性的氨基酸序列;所述 US2 的 ERAD 降解结构域的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 76 所示。

在一些优选的实施方案中,所述 US3 的全长序列包含与 SEQ ID NO. 77 所示氨基酸序列具有 80%或以上同一性的氨基酸序列,优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一性的氨基酸序列,更优选具有 98%或 99%以上同一性的氨基酸序列;所述 US3 的全长序列的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 77 所示。

在一些优选的实施方案中,所述 US3 的 HLA 结合结构域包含与 SEQ ID NO. 78 所示氨基酸序列具有 80%或以上同一性的氨基酸序列,优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一性的氨基酸序列,更优选具有 98%或 99%以上同一性的氨基酸序列;所述 US3 的 HLA 结合结构域的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 78 所示。

在一些优选的实施方案中,所述 US3 的 ERAD 降解结构域包含与 SEQ ID NO. 79 所示氨基酸序列具有 80%或以上同一性的氨基酸序列,优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一性的氨基酸序列,更优选具有 98%或 99%以上同一性的氨基酸序列;所述 US3 的 ERAD 降解结构域的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 79 所示。

在一些优选的实施方案中,所述 US11 的全长序列包含与 SEQ ID NO. 80 所示氨基酸序列具有 80%或以上同一性的氨基酸序列,优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一性的氨基酸序列,更优选具有 98%或 99%以上同一性的氨基酸序列;所述 US11 的全长序列的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 80 所示。

在一些优选的实施方案中,所述 US11 的 HLA 结合结构域包含与 SEQ ID NO. 81 所示氨基酸序列具有 80%或以上同一性的氨基酸序列,优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一性的氨基酸序列,更优选具有 98%或 99%以上同一性的氨基酸序列;所述 US11 的 HLA 结合结构域的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 81 所示。

在一些优选的实施方案中,所述 US11 的 ERAD 降解结构域包含与 SEQ ID NO. 82 所示氨基酸序列具有 80%或以上同一性的氨基酸序列,优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一性的氨基酸序列,更优选具有 98%或 99%以上同一性的氨基酸序列;所述 US11 的 ERAD 降解结构域的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 82 所示。

在一些优选的实施方案中,所述靶向 MHC I 和/或 MHC II 的结合蛋白分子结构域或其功能变体还包含定向抑制或降解 MICA、MICB、ULBP1、ULBP2、ULBP3、ULBP4、ULBP5 或 ULBP6 的 NK 靶点蛋白的病毒蛋白;优选地,所述病毒蛋白选自 HCMV UL16、UL141、UL142 或腺病毒 E3-19K。

在一些优选的实施方案中,所述 HCMV UL16 的全长序列包含与 SEQ ID NO. 83 所示氨基酸序列具有 80%或以上同一性的氨基酸序列,优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一性的氨基酸序列,更优选具有 98%或 99%以上同一性的氨基酸序列;所述 HCMV UL16 的全长序列的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 83 所示。

在一些优选的实施方案中,所述 HCMV UL16 的 NK 靶点蛋白结合结构域包含与 SEQ ID NO. 84 所示氨基酸序列具有 80%或以上同一性的氨基酸序列,优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一性的氨基酸序列,更优选具有 98%或 99%以上同一性的氨基酸序列;所述 HCMV UL16 的 NK 靶点蛋白结合结构域的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 84 所示。

在一些优选的实施方案中,所述 HCMV UL16 的 ERAD 降解结构域包含与 SEQ ID NO. 85 所示氨基酸序列具有 80%或以上同一性的氨基酸序列,优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一性的氨基酸序列,更优选具有 98%或 99%以上同一性的氨基酸序列;所述 HCMV UL16 的 ERAD 降解结构域的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 85 所示。

在一些优选的实施方案中,所述 HCMV UL141 的全长序列包含与 SEQ ID NO. 86 所示氨基酸序列具有 80%或

示。

在一些优选的实施方案中，所述 HCMV UL141 的 NK 靶点蛋白结合结构域包含与 SEQ ID NO. 87 所示氨基酸序列具有 80%或以上同一性的氨基酸序列，优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一性的氨基酸序列，更优选具有 98%或 99%以上同一性的氨基酸序列；所述 HCMV UL141 的 NK 靶点蛋白结合结构域的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 87 所示。

在一些优选的实施方案中，所述 HCMV UL141 的 ERAD 降解结构域包含与 SEQ ID NO. 88 所示氨基酸序列具有 80%或以上同一性的氨基酸序列，优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一性的氨基酸序列，更优选具有 98%或 99%以上同一性的氨基酸序列；所述 HCMV UL141 的 ERAD 降解结构域的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 88 所示。

在一些优选的实施方案中，所述 HCMV UL142 的全长序列包含与 SEQ ID NO. 89 所示氨基酸序列具有 80%或以上同一性的氨基酸序列，优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一性的氨基酸序列，更优选具有 98%或 99%以上同一性的氨基酸序列；所述 HCMV UL142 的全长序列的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 89 所示。

在一些优选的实施方案中，所述 HCMV UL142 的 MICA、ULBP3 结合结构域包含与 SEQ ID NO. 90 所示氨基酸序列具有 80%或以上同一性的氨基酸序列，优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一性的氨基酸序列，更优选具有 98%或 99%以上同一性的氨基酸序列；所述 HCMV UL142 的 MICA、ULBP3 结合结构域的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 90 所示。

在一些优选的实施方案中，所述 HCMV UL142 的高尔基驻留结构域包含与 SEQ ID NO. 91 所示氨基酸序列具有 80%或以上同一性的氨基酸序列，优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一性的氨基酸序列，更优选具有 98%或 99%以上同一性的氨基酸序列；所述 HCMV UL142 的高尔基驻留结构域的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 91 所示。

在一些优选的实施方案中，所述靶向 MHC I 和/或 MHC II 的结合蛋白分子结构域或其功能变体还包含把 MHC I 分子从高尔基体转运到溶酶体进行降解的病毒蛋白；优选地，所述病毒蛋白选自 HIV Nef、HIV Vpu、HHV-7 U21、HHV-8 KK3、HHV-8 KK5、MHV-68 MK3 和 HTLV-1 p12。

在一些优选的实施方案中，所述 HIV Nef 包含与 SEQ ID NO. 92 所示氨基酸序列具有 80%或以上同一性的氨基酸序列，优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一性的氨基酸序列，更优选具有 98%或 99%以上同一性的氨基酸序列；所述 HIV Nef 的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 92 所示。

在一些优选的实施方案中，所述 HIV Vpu 包含与 SEQ ID NO. 93 所示氨基酸序列具有 80%或以上同一性的氨基酸序列，优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一性的氨基酸序列，更优选具有 98%或 99%以上同一性的氨基酸序列；所述 HIV Vpu 的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 93 所示。

在一些优选的实施方案中，所述 HHV-8 KK3 包含与 SEQ ID NO. 94 所示氨基酸序列具有 80%或以上同一性的氨基酸序列，优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一性的氨基酸序列，更优选具有 98%或 99%以上同一性的氨基酸序列；所述 HHV-8 KK3 的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 94 所示。

在一些优选的实施方案中，所述 HHV-8 KK5 包含与 SEQ ID NO. 95 所示氨基酸序列具有 80%或以上同一性的氨基酸序列，优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一性的氨基酸序列，更优选具有 98%或 99%以上同一性的氨基酸序列；所述 HHV-8 KK5 的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 95 所示。

在一些优选的实施方案中，所述 MHV-68 MK3 包含与 SEQ ID NO. 96 所示氨基酸序列具有 80%或以上同一性的氨基酸序列，优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一性的氨基酸序列，更优选具有 98%或 99%以上同一性的氨基酸序列；所述 MHV-68 MK3 的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 96 所示。

在一些优选的实施方案中，所述 HTLV-1 p12 包含与 SEQ ID NO. 97 所示氨基酸序列具有 80%或以上同一性的氨基酸序列，优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一性的氨基酸序列，更优选具有 98%或 99%以上同一性的氨基酸序列；所述 HTLV-1 p12 的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 97 所示。

在一些优选的实施方案中，所述靶向 MHC I 和/或 MHC II 的结合蛋白分子结构域或其功能变体还包含介导 MHC-多肽分子从高尔基体返回内质网并促进其降解的病毒蛋白；优选地，所述病毒蛋白包含 MHC 结合结构和 KDEL receptor 结合结构域；优选地，所述病毒蛋白是 Cowpox Virus 蛋白 CPXV203。

在一些优选的实施方案中，所述牛痘病毒蛋白 CPXV203 的全长序列包含与 SEQ ID NO. 98 所示氨基酸序列具有 80%或以上同一性的氨基酸序列，优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一性的氨基酸序列，更优选具有 98%或 99%以上同一性的氨基酸序列；所述牛痘病毒蛋白 CPXV203 的全长序列的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 98 所示。

在一些优选的实施方案中，所述牛痘病毒蛋白 CPXV203 的 MHC 结合结构域包含与 SEQ ID NO. 99 所示氨基酸序列具有 80%或以上同一性的氨基酸序列，优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一性的氨基酸序列，更优选具有 98%或 99%以上同一性的氨基酸序列；所述牛痘病毒蛋白 CPXV203 的 MHC 结合结构域的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 99 所示。

在一些优选的实施方案中，所述牛痘病毒蛋白 CPXV203 的 KDEL 受体结合结构域包含与 SEQ ID NO. 100 所

体结合结构域的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 100 所示。

在一些优选的实施方案中，所述牛痘病毒蛋白 CPXV203 的全长序列包含与 SEQ ID NO. 101 所示氨基酸序列具有 80%或以上同一性的氨基酸序列，优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一性的氨基酸序列，更优选具有 98%或 99%以上同一性的氨基酸序列；所述牛痘病毒蛋白 CPXV203 的全长序列的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 101 所示。

在一些优选的实施方案中，所述牛痘病毒蛋白 CPXV203 的 MHC 结合结构域包含与 SEQ ID NO. 102 所示氨基酸序列具有 80%或以上同一性的氨基酸序列，优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一性的氨基酸序列，更优选具有 98%或 99%以上同一性的氨基酸序列；所述牛痘病毒蛋白 CPXV203 的 MHC 结合结构域的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 102 所示。

在一些优选的实施方案中，所述牛痘病毒蛋白 CPXV203 的 KDEL 受体结合结构域包含与 SEQ ID NO. 103 所示氨基酸序列具有 80%或以上同一性的氨基酸序列，优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一性的氨基酸序列，更优选具有 98%或 99%以上同一性的氨基酸序列；所述牛痘病毒蛋白 CPXV203 的 KDEL 受体结合结构域的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 103 所示。

在一些实施方案中，所述多功能复合体还包含组件 (4) 复合型转接器 (Chimeric adaptor) 组件和/或靶向杀伤肿瘤细胞受体组件；

所述 (4) 复合型转接器包含：(i) 靶向肿瘤的胞外识别结构域；(ii) 跨膜结构域；和 (iii) 胞内信号传导结构域；任选地，所述靶向肿瘤的胞外识别结构域、跨膜结构域和/或胞内信号传导结构域之间包含铰链或接头；

优选地，所述复合型转接器组件的靶向肿瘤的胞外识别结构域选自肿瘤抗原特异结合结构域、肿瘤微环境靶抗原结合结构域和/或靶向肿瘤微环境的趋化受体。

在一些优选的实施方案中，所述靶向肿瘤的胞外识别结构域选自能靶向识别肿瘤相关抗原的抗体或其功能片段、TCR 或其组合；所述抗体的功能片段选自 Fd、Fv、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv(scFv)、单链抗体 (scFv) 或纳米抗体 (nanobody)、双链抗体、三链抗体和四链抗体。

在一些优选的实施方案中，所述复合型转接器组件的跨膜结构域选自 NK 细胞激活受体跨膜结构域、DAP10 跨膜结构域、DAP12 跨膜结构域、CD8 跨膜结构域、CD28 跨膜结构域、CD4 跨膜结构域、4-1BB 跨膜结构域、OX40 跨膜结构域、ICOS 跨膜结构域、CTLA-4 跨膜结构域、PD-1 跨膜结构域、LAG-3 跨膜结构域、2B4 跨膜结构域和 BTLA 跨膜结构域以及其组合；优选地，所述 NK 细胞激活受体选自 NKG2D、NKG2C、NKG2E、NKG2F、NKG2H、CD94、KIR2DL4、KIR2DS1、KIR2DS2、KIR2DS4、KIR3DS1，天然细胞毒性受体、TRAIL、DNAM-1、CD16a、2B4、NTB-A、CRACC 以及 NKp80；优选地，所述天然细胞毒性受体选自 NKp46、NKp44 和 NKp30。

在一些优选的实施方案中，所述复合型转接器组件的胞内信号传导结构域包括 NK 细胞激活受体的胞内信号结构域和/或共刺激信号传导结构域。

在一些优选的实施方案中，所述 NK 细胞激活受体选自 NKG2D、NKG2C、NKG2E、NKG2F、NKG2H、CD94、KIR2DL4、KIR2DS1、KIR2DS2、KIR2DS4、KIR3DS1，天然细胞毒性受体、TRAIL、DNAM-1、CD16a、2B4、NTB-A、CRACC 以及 NKp80。

在一些优选的实施方案中，所述胞内信号结构域还包括共刺激信号传导结构域；优选地，所述共刺激信号传导结构域选自 T 细胞共刺激信号传导结构域；包括，但不限于衍生自 MHC I 类分子、TNF 受体蛋白、免疫球蛋白样蛋白质、细胞因子受体、整联蛋白、淋巴细胞活化信号分子 (SLAM 蛋白)、活化 NK 细胞受体、BTLA、Toll 受体、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(LIGHT)、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、CD100 SEMA4D)、CD69、SLAMF6(NTB-A、Ly108)、SLAM(SLAMF1、CD150、IPO-3)、BLAME(SLAMF8)、SELPLG(CD162)、LTBR、LAT、GADS、SLP-76、PAG/Cbp、CD19a 和与 CD83 特异性结合的配体、CARD11、FcRa、FcRp、FcRy、Fyn、HVEM、ICOS、Lck、LAG3、LAT、LRP、NOTCH1、Wnt、OX40、ROR2、Ryk、SLAMF1、Slp76、pTa、TCRa、TCRp、TRIM、ZAP70、PTCH2 等胞内信号结构域；更优选地，所述共刺激信号传导结构域选自 NKG2D 胞内信号结构域，DAP10 胞内信号结构域，DAP12 胞内信号结构域，NCR 胞内信号结构域，CD28 胞内信号结构域、4-1BB 胞内信号结构域、OX40 胞内信号结构域、ICOS 胞内信号结构域；

所述靶向杀伤肿瘤细胞受体组件包含 (i) 靶向肿瘤抗原的胞外识别结构域；(ii) 跨膜结构域；和 (iii) 胞内共刺激信号传导结构域；(iv) T 细胞活化信号传导结构域 (ITAM)；任选地，所述靶向肿瘤抗原的胞外识别结构域、跨膜结构域、胞内共刺激信号传导结构域和/或 T 细胞活化信号传导结构域 (ITAM) 之间包含铰链或接头；

域、CD9 跨膜结构域、CD16 跨膜结构域、CD22 跨膜结构域、CD33 跨膜结构域、CD37 跨膜结构域、CD64 跨膜结构域、CD80 跨膜结构域、CD86 跨膜结构域、CD134 跨膜结构域、CD137 跨膜结构域、CD154 跨膜结构域、GITR 跨膜结构域以及其组合；

所述 T 细胞活化信号传导结构域衍生自 CD3 ζ 、共同 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 和 DAP12 等胞内信号结构域。

在一些优选的实施方案中，所述接头是柔性接头；优选地，所述柔性接头包含所示的氨基酸序列 (Gly(x)Ser(y))_n，其中 n 是 1 到 10 的整数，并且 x 和 y 独立地是 0 到 10 的整数，前提是 x 和 y 不都是 0；更优选地，所述接头包含 SEQ ID NO. 105 所示的氨基酸序列或 SEQ ID NO. 106 所示的氨基酸序列。

在一些优选的实施方案中，所述接头是铰链；优选地，所述铰链是 IgG1 铰链或 IgG4 铰链。

在一些优选的实施方案中，所述 IgG1 铰链包含与 SEQ ID NO. 106 所示氨基酸序列具有 80%或以上同一性的氨基酸序列，优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一性的氨基酸序列，更优选具有 98%或 99%以上同一性的氨基酸序列；所述 IgG1 铰链的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 106 所示。

在一些优选的实施方案中，所述 IgG4 铰链包含与 SEQ ID NO. 107 所示氨基酸序列具有 80%或以上同一性的氨基酸序列，优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一性的氨基酸序列，更优选具有 98%或 99%以上同一性的氨基酸序列；所述 IgG4 铰链的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 107 所示。

在一些优选的实施方案中，所述 NK 激活受体组件、CNK 信号转接组件和/或 UT 组件之间包含可切割肽；例如，T2A 肽、GSG-T2A 肽、E2A 肽、GSG-E2A 肽、F2A 肽、GSG-F2A 肽、P2A 肽或 GSG-P2A 肽。

在一些优选的实施方案中，所述 T2A 包含与 SEQ ID NO. 108 所示氨基酸序列具有 80%或以上同一性的氨基酸序列，优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一性的氨基酸序列，更优选具有 98%或 99%以上同一性的氨基酸序列；所述 T2A 的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 108 所示。

在一些优选的实施方案中，GSG-T2A 肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 109 所示。

在一些优选的实施方案中，所述 P2A 包含与 SEQ ID NO. 110 所示氨基酸序列具有 80%或以上同一性的氨基酸序列，优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一性的氨基酸序列，更优选具有 98%或 99%以上同一性的氨基酸序列；所述 P2A 的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 110 所示。

在一些优选的实施方案中，GSG-P2A 肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 111 所示。

在一些优选的实施方案中，所述 E2A 包含与 SEQ ID NO. 112 所示氨基酸序列具有 80%或以上同一性的氨基酸序列，优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一性的氨基酸序列，更优选具有 98%或 99%以上同一性的氨基酸序列；所述 E2A 的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 112 所示。

在一些优选的实施方案中，GSG-E2A 肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 113 所示。

在一些优选的实施方案中，所述 F2A 包含与 SEQ ID NO. 114 所示氨基酸序列具有 80%或以上同一性的氨基酸序列，优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一性的氨基酸序列，更优选具有 98%或 99%以上同一性的氨基酸序列；所述 F2A 的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 114 所示。

在一些优选的实施方案中，GSG-F2A 肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 115 所示。

在一些优选的实施方案中，所述多功能复合体包含与 SEQ ID NO. 116 所示的氨基酸序列有 80%或以上同一性的氨基酸序列，优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一性的氨基酸序列，更优选具有 98%或 99%以上同一性的氨基酸序列；所述多功能复合体的氨基酸序列包含如 SEQ ID NO. 116 所示的 TCR 抗体单链抗体。

在一些优选的实施方案中，所述多功能复合体包含与 SEQ ID NO. 117 所示的氨基酸序列有 80%或以上同一性的氨基酸序列，优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一性的氨基酸序列，更优选具有 98%或 99%以上同一性的氨基酸序列；所述多功能复合体的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 117 所示。

在一些优选的实施方案中，所述多功能复合体包含与 SEQ ID NO. 121 所示的氨基酸序列有 80%或以上同一性的氨基酸序列，优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一性的氨基酸序列，更优选具有 98%或 99%以上同一性的氨基酸序列；所述多功能复合体的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 121 所示。

在一些优选的实施方案中，所述多功能复合体包含与 SEQ ID NO. 123 所示的氨基酸序列有 80%或以上同一性的氨基酸序列，优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一性的氨基酸序列，更优选具有 98%或 99%以上同一性的氨基酸序列；所述多功能复合体的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 123 所示。

在一些优选的实施方案中，所述多功能复合体包含与 SEQ ID NO. 125 所示的氨基酸序列有 80%或以上同一性的氨基酸序列，优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一性的氨基酸序列，更优选具有 98%或 99%以上同一性的氨基酸序列；所述多功能复合体的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 125 所示。

在一些优选的实施方案中，所述多功能复合体包含与 SEQ ID NO. 12 所示的氨基酸序列有 80%或以上同一性的氨基酸序列，优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一性的氨基酸序列，更优选具有 98%或 99%以上同一性的氨基酸序列；所述多功能复合体的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 126 所示。

在一些优选的实施方案中，所述多功能复合体包含与 SEQ ID NO. 127 所示的氨基酸序列有 80%或以上同一性的氨基酸序列，优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一性的氨基酸序列，更优选具有 98%

的氨基酸序列, 优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 以上同一性的氨基酸序列, 更优选具有 98% 或 99% 以上同一性的氨基酸序列; 所述多功能复合体的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 128 所示。

5 在一些优选的实施方案中, 所述多功能复合体包含与 SEQ ID NO. 129 所示的氨基酸序列有 80% 或以上同一性的氨基酸序列, 优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 以上同一性的氨基酸序列, 更优选具有 98% 或 99% 以上同一性的氨基酸序列; 所述多功能复合体的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 129 所示。

10 在一些优选的实施方案中, 所述多功能复合体包含与 SEQ ID NO. 130 所示的氨基酸序列有 80% 或以上同一性的氨基酸序列, 优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 以上同一性的氨基酸序列, 更优选具有 98% 或 99% 以上同一性的氨基酸序列; 所述多功能复合体的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 130 所示。

15 在一些优选的实施方案中, 所述多功能复合体包含与 SEQ ID NO. 131 所示的氨基酸序列有 80% 或以上同一性的氨基酸序列, 优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 以上同一性的氨基酸序列, 更优选具有 98% 或 99% 以上同一性的氨基酸序列; 所述多功能复合体的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 131 所示。

在一方面, 本公开提供了一种编码所述多功能复合体的核酸分子。

15 在一些优选的实施方案中, 所述核酸分子是 DNA 或 RNA。

在一些优选的实施方案中, 所述 RNA 是 mRNA。

20 在一些优选的实施方案中, 所述核酸分子包含与 SEQ ID NO. 118 所示的核苷酸序列有 80% 或以上同一性的核苷酸序列, 优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 以上同一性的核苷酸序列, 更优选具有 98% 或 99% 以上同一性的氨基酸序列; 所述核酸分子的核苷酸序列 SEQ ID NO. 118 所示。

25 在一些优选的实施方案中, 所述核酸分子包含与 SEQ ID NO. 122 所示的核苷酸序列有 80% 或以上同一性的核苷酸序列, 优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 以上同一性的核苷酸序列, 更优选具有 98% 或 99% 以上同一性的氨基酸序列; 所述核酸分子的核苷酸序列 SEQ ID NO. 122 所示。

30 在一些优选的实施方案中, 所述核酸分子包含与 SEQ ID NO. 124 所示的核苷酸序列有 80% 或以上同一性的核苷酸序列, 优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 以上同一性的核苷酸序列, 更优选具有 98% 或 99% 以上同一性的氨基酸序列; 所述核酸分子的核苷酸序列 SEQ ID NO. 124 所示。

在一方面, 本公开提供了一种含有所述核酸的表达载体。

35 在一些优选的实施方案中, 所述载体选自质粒、粘粒、病毒载体、RNA 载体或线性或圆形 DNA 或 RNA 分子。

40 在一些优选的实施方案中, 所述病毒载体选自逆转录病毒、腺病毒、细小病毒(例如, 腺伴随病毒)、冠状病毒、负链 RNA 病毒诸如正粘病毒(例如, 流感病毒)、弹状病毒(例如, 狂犬病和水疱性口炎病毒)、副粘病毒(例如, 麻疹和仙台)、正链 RNA 病毒诸如小 RNA 病毒和甲病毒和双链 DNA 病毒, 所述双链 DNA 病毒包括腺病毒、疱疹病毒(例如, 单纯疱疹病毒 1 和 2 型、爱泼斯坦-巴尔病毒、巨细胞病毒)和痘病毒(例如, 牛痘病毒、鸡痘病毒和金丝雀痘病毒)、诺沃克病毒、披膜病毒、黄病毒、呼肠孤病毒、乳多泡病毒、嗜肝 DNA 病毒、杆状病毒和肝炎病毒。

45 在一些优选的实施方案中, 所述逆转录病毒选自禽造血白细胞组织增生-肉瘤、哺乳动物 C-型、B-型病毒、D-型病毒、HTLV-BLV 集合、慢病毒、泡沫病毒。

50 在一些优选的实施方案中, 所述慢病毒载体选自 HIV-1、HIV-2、SIV、FIV、BIV、EIAV、CAEV 或绵羊脱髓鞘性脑白质炎慢病毒。

55 在一些优选的实施方案中, 所述 NK 激活受体组件、CNK 信号转接组件和/或 UT 组件可在同一载体同一启动子, 或不同启动子下调控表达, 或多种载体中进行表达。

60 在一些优选的实施方案中, 所述载体为慢病毒载体, 所述编码 NK 激活受体组件、CNK 信号转接组件和/或 UT 组件的基因之间包含可切割肽编码基因; 优选地, 所述可切割肽为 2A 接头; 所述 2A 接头选自 T2A、P2A、E2A 和 F2A。

65 在一些优选的实施方案中, 所述载体还包含启动子; 优选地, 所述启动子为 EF1 α 启动子或 CMV 启动子。

70 在一方面, 本公开提供了一种免疫细胞, 其包含所述的核酸或所述的表达载体。

75 在一些优选的实施方案中, 免疫细胞选自 T 细胞, NKT 细胞, NK 细胞, B 细胞, 单核细胞, 巨噬细胞等

80 在一方面, 本公开提供了一种制造免疫细胞的方法, 其包括用选自下述的方法将所述的核酸或所述的表达载体引入细胞: 电穿孔、声穿孔、基因枪(例如用 Au-颗粒的基因枪)、脂质转染、聚合物转染、纳米颗粒或多聚复合体。

85 在一方面, 本公开提供了一种药物组合物, 其包含的多功能复合体、所述的核酸、所述的表达载体、所述的免疫细胞和/或所述方法制造的免疫细胞, 以及药学上可接受的载体。

90 在一方面, 本公开提供了一种的多功能复合体、所述的核酸、所述的表达载体、所述的免疫细胞、所述方法制造的免疫细胞和/或所述的药物组合物在制备治疗疾病的药物中的用途。

95 在一方面, 本公开提供了一种治疗疾病的方法, 其包括向受试者施用的多功能复合体、所述的核酸、所述的表达载体、所述的免疫细胞和/或所述的药物组合物。

100 在一些优选的实施方案中, 所述疾病包括各类实体肿瘤和血液肿瘤, 病毒感染性疾病, 自身免疫性疾病。

在一些优选的实施方案中，神经系统肿瘤包括弥漫性胶质瘤，弥漫性星形细胞瘤和间变性星形细胞瘤，胶质母细胞瘤，少突胶质细胞瘤，少突星形细胞瘤，儿童弥漫性胶质瘤，其他星形细胞瘤，室管膜瘤，神经元和混合性神经元-神经胶质肿瘤，髓母细胞瘤，其他胚胎性肿瘤，神经鞘瘤，脑膜瘤，孤立性纤维性肿瘤和血管周细胞瘤等。

在一些优选的实施方案中，头颈部肿瘤包括鼻腔及鼻窦恶性肿瘤，鼻咽癌，口腔癌，喉癌，涎腺肿瘤，颅内肿瘤，甲状腺癌，舌癌等。

在一些优选的实施方案中，胸部肿瘤包括肺癌，食管癌，贲门癌，乳腺癌，纵膈肿瘤等。

在一些优选的实施方案中，消化系统肿瘤包括胃癌，大肠癌及乙状结肠和直肠癌，肝癌，胰腺癌与壶腹周围癌，胆道癌，小肠恶性肿瘤等。

在一些优选的实施方案中，泌尿生殖系统肿瘤包括肾癌，前列腺癌，膀胱癌，睾丸恶性肿瘤，阴茎癌，子宫颈癌，子宫内膜癌，卵巢癌等。

在一些优选的实施方案中，软组织和皮肤肿瘤包括恶性纤维组织细胞瘤，横纹肌肉瘤，滑膜肉瘤，皮肤恶性黑色素瘤等。

在一些优选的实施方案中，骨肿瘤包括骨肉瘤，尤文氏肉瘤等。

在一些优选的实施方案中，所述结肠癌是结肠腺瘤。

在一些优选的实施方案中，所述乳腺癌是三阴乳腺癌细胞。

在一些优选的实施方案中，所述肝癌是肝细胞癌。

在一些优选的实施方案中，所述疾病是血液肿瘤选自白血病、淋巴瘤（HL）、多发性骨髓瘤（MM）、骨髓增生异常综合征（MDS）等

在一些优选的实施方案中，所述白血病是 B 细胞急性淋巴性白血病，T 细胞急性淋巴性白血病，急性髓系白血病等。

在一些优选的实施方案中，病毒感染性疾病包括：呼吸道病毒性疾病，胃肠道病毒性疾病，肝脏病毒性疾病，皮肤和黏膜病毒性疾病，眼病毒性疾病，中枢神经系统病毒性疾病，淋巴细胞性病毒性疾病，虫传病毒性疾病，慢病毒感染疾病等。

在一些优选的实施方案中，呼吸道病毒性疾病包括鼻病毒、腺病毒、呼吸道合胞病毒、副流感病毒和冠状病毒等的感染；流行性感冒；流行性腮腺炎等。

在一些优选的实施方案中，胃肠道病毒性疾病包括脊髓灰质炎；库克萨基病毒感染；ECHO 病毒感染；病毒性胃肠炎：包括轮状病毒性胃肠炎、诺瓦克病毒性胃肠炎、腺病毒性胃肠炎、星状病毒性胃肠炎、冠状病毒性胃肠炎和杯状病毒性胃肠炎等。

在一些优选的实施方案中，肝脏病毒性疾病包括甲型病毒性肝炎、乙型病毒性肝炎、丙型病毒性肝炎、丁型病毒性肝炎、戊型病毒性肝炎、EB 病毒性肝炎和巨细胞病毒性肝炎等。

在一些优选的实施方案中，皮肤和黏膜病毒性疾病包括麻疹、风疹、幼儿急疹、水痘及带状疱疹、天花、单纯疱疹病毒感染、狂犬病和口蹄疫等。

在一些优选的实施方案中，眼病毒性疾病包括流行性角膜结膜炎、滤泡性结膜炎和疱疹性角膜结膜炎等。

在一些优选的实施方案中，中枢神经系统病毒性疾病包括流行性乙型脑炎、西方马脑炎、东方马脑炎、圣路易脑炎、委内瑞拉马脑炎、墨累山谷脑炎、加利福尼亚脑炎、森林脑炎和淋巴细胞脉络丛脑膜炎等。

在一些优选的实施方案中，淋巴细胞性病毒性疾病包括传染性单核细胞增多症、巨细胞病毒感染和获得性免疫缺陷综合征等。

在一些优选的实施方案中，虫传病毒性疾病包括病毒性出血热：包括流行性出血热、黄热病、克里米亚-刚果出血热、裂谷热、阿根廷出血热、玻利维亚出血热、拉萨热、鄂木斯克出血热、马尔堡病和埃波拉出血热等；登革热和登革出血热；西尼罗热；科罗拉多蜱传热；白蛉热等

优选地，慢病毒感染疾病包括亚急性硬化性全脑炎、库鲁病、进行性多灶性白质脑病和亚急性海绵样脑病（皮质纹状体脊髓变性）等。

在一些优选的实施方案中，自身免疫性疾病包括器官特异性自身免疫病和系统性自身免疫病

优选地，器官特异性自身免疫病包括慢性淋巴细胞性甲状腺炎、甲状腺功能亢进、胰岛素依赖型糖尿病、重症肌无力、溃疡性结肠炎、恶性贫血伴慢性萎缩性胃炎、肺出血肾炎综合征、寻常天疱疮、类天疱疮、原发性胆汁性肝硬化、多发性脑脊髓硬化症、急性特发性多神经炎等。

在一些优选的实施方案中，系统性自身免疫病包括系统性红斑狼疮、类风湿关节炎、系统性血管炎、硬皮病、天疱疮、皮炎、混合性结缔组织病、自身免疫性溶血性贫血、甲状腺自身免疫病、溃疡性结肠炎等。

在一方面，本公开提供了一种刺激受试者中的免疫应答的方法，所述方法包括给予受试者有效量的多功能复合体、所述的核酸、所述的表达载体、所述的免疫细胞、所述方法制造的免疫细胞和/或所述的药物组合物。

本公开还提供了细胞、细胞群以及包含所述细胞和群的组合物（包括药物和治疗组合物），例如通过所提供的方法产生的细胞和群，以及方法，例如用于施用所述细胞和组合物至受试者如患者的治疗方法。

还提供了包括用于施用的细胞的组合物，包括药物组合物和制剂，例如包括用于以给定剂量或其分数施用的

术语“药物制剂”指形式为允许其中所含活性成分的生物活性有效，并且不包含对将要施用该制剂的受试者有不可接受的毒性的另外组分的制备物。

“药学上可接受的载体”指药物制剂中除活性成分之外的成分，其对受试者无毒。药学上可接受的载体包括但不限于缓冲剂、赋形剂、稳定剂或防腐剂。

在一些方面，载体的选择部分地由特定细胞和/或施用方法来确定。因此，存在多种合适的制剂。例如，药物组合物可包含防腐剂。合适的防腐剂可包括例如对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯、苯甲酸钠和苯扎氯铵。在一些方面，使用两种或更多种防腐剂的混合物。防腐剂或其混合物通常以组合物总重量的约 0.0001 重量%至约 2 重量%的量存在。药学上可接受的载体通常在使用剂量和浓度下对受体无毒，并包括但不限于：缓冲剂，例如磷酸盐、柠檬酸盐和其他有机酸；抗氧化剂，包括抗坏血酸和蛋氨酸；防腐剂（例如十八烷基二甲基苄基氯化铵；氯化六甲双铵（hexamethonium chloride）；苯扎氯铵；苄索氯铵；苯酚、丁醇或苄醇；对羟基苯甲酸烷基酯，例如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯；邻苯二酚；间苯二酚；环己醇；3-戊醇和间甲酚）；低分子量（少于约 10 个残基）多肽；蛋白质，例如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白；亲水性聚合物，例如聚乙烯吡咯烷酮；氨基酸，例如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸；单糖、二糖和其他碳水化合物，包括葡萄糖、甘露糖或糊精；螯合剂，如 EDTA；糖，例如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨糖醇；盐形成抗衡离子，例如钠；金属络合物（例如锌蛋白络合物）；和/或非离子表面活性剂，例如聚乙二醇（PEG）。

在一些方面，缓冲剂包括在组合物中。合适的缓冲剂包括例如柠檬酸、柠檬酸钠、磷酸、磷酸钾和各种其他酸和盐。在一些方面，使用两种或更多种缓冲剂的混合物。缓冲剂或其混合物通常以组合物总重量的约 0.001 重量%至约 4 重量%的量存在。制备可施用的药物组合物的方法是已知的。

制剂可以包括水溶液。制剂或组合物还可包含多于一种可用于正在用细胞治疗的特定适应症、疾病或病症的活性成分，优选具有与细胞互补的活性的那些，其中各自的活性不会彼此不利地影响。这样的活性成分合适地以对于预期目的有效的量组合存在。因此，在一些实施方式中，药物组合物还包含其他药物活性剂或药物，例如化学治疗剂例如天冬酰胺酶、白消安、卡铂、顺铂、柔红霉素、阿霉素、氟尿嘧啶、吉西他滨、羟基脲、甲氨蝶呤、紫杉醇、利妥昔单抗、长春碱和/或长春新碱。

在一些实施方式中，药物组合物包含有效治疗或预防疾病或病症的量的细胞，例如治疗有效量或预防有效量。在一些实施方式中，通过定期评估所治疗的受试者来监测治疗或预防功效。可以通过单次推注施用细胞、多次推注施用细胞，或连续输注施用细胞来递送期望剂量。

细胞和组合物可以使用标准施用技术、制剂和/或装置来施用。细胞的施用可以是自体的或异源的。例如免疫应答细胞或祖细胞可以从一个受试者获得，并施用于相同受试者或不同的、相容的受试者。外周血衍生的免疫应答细胞或其后代（例如体内、离体或体外衍生的）可以通过局部注射施用，包括导管施用、全身注射、局部注射、静脉注射或肠胃外施用。当施用治疗组合物（例如包含遗传修饰的免疫应答细胞的药物组合物）时，通常将其配制为单位剂量可注射形式（溶液、悬浮液、乳剂）。

制剂包括用于口服、静脉内、腹膜内、皮下、肺、透皮、肌内、鼻内、颊、舌下或栓剂施用的那些。在一些实施方式中，细胞群是肠胃外施用的。如在本文中所使用的术语“肠胃外”包括静脉内、肌内、皮下、直肠、阴道和腹膜内施用。在一些实施方式中，细胞通过静脉内、腹膜内或皮下注射施用使用外周全身递送而施用于受试者。

在一些实施方式中，组合物作为无菌液体制备物提供，例如等渗水溶液、悬浮液、乳剂、分散液或粘性组合物，其在某些方面可以缓冲至选定的 pH。液体制备物通常比凝胶、其他粘性组合物和固体组合物更容易制备。另外，液体组合物在某种程度上更方便施用，尤其是通过注射。另一方面，粘性组合物可以在适当的粘度范围内配制以提供与特定组织更长的接触时间。液体或粘性组合物可包含载体，其可以是溶剂或分散介质，包含例如水、盐水、磷酸盐缓冲盐水、多元醇（例如甘油、丙二醇、液体聚乙二醇）及其合适的混合物。

无菌可注射溶液可以通过将细胞引入溶剂中来制备，例如与合适的载体、稀释剂或赋形剂如无菌水、生理盐水、葡萄糖、右旋糖等混合。组合物可以包含辅助物质，例如润湿剂、分散剂或乳化剂（例如甲基纤维素）、pH 缓冲剂、胶凝或增粘添加剂、防腐剂、矫味剂和/或颜色，这取决于施用途径和期望制备物。在某些方面，可以参考标准文本以制备合适的制备物。

可以添加增强组合物的稳定性和无菌性的各种添加剂，包括抗微生物防腐剂、抗氧化剂、螯合剂和缓冲剂。微生物作用的预防可以通过各种抗菌和抗真菌剂来确保，例如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚和山梨酸。可注射药物形式的延长吸收可通过使用延迟吸收的试剂例如单硬脂酸铝和明胶来实现。

用于体内施用的制剂通常是无菌的。无菌性可以通过例如经过无菌滤膜过滤而容易地实现。

还提供了施用细胞、群体和组合物以治疗或预防疾病，病症和紊乱（包括癌症）的方法，以及这样的细胞、群体和组合物治疗或预防疾病，病症和紊乱（包括癌症）的用途。在一些实施方式中，将细胞、群体和组合物施用于患有特定疾病或病症的待治疗受试者或患者，例如通过过继细胞疗法（例如过继 T 细胞疗法）。在一些实施方式中，将通过提供的方法制备的细胞和组合物（例如工程化组合物和繁育和/或其他加工步骤后的生产末端产物）施用于受试者，例如患有疾病或病症或处于疾病或病症风险的受试者。在一些方面，方法由此治疗例如疾病或病症的一种或多种症状，例如通过减轻表达被工程化 T 细胞识别的抗原的癌症中的肿瘤负担。

Rosenberg (2011) Nat Rev Clin Oncol. 8(10):577-85)中描述。参见例如 Themeli 等 (2013) Nat Biotechnol. 31(10): 928-933; Tsukahara 等 (2013) Biochem Biophys Res Commun 438(1): 84-9; Davila 等 (2013) PLoS ONE 8(4): e61338。

如在本文中所使用的“受试者”是哺乳动物，例如人或其他动物，并且通常是人。在一些实施方式中，向其施用细胞、细胞群或组合物的受试者例如患者是哺乳动物，通常是灵长类动物例如人。在一些实施方式中，灵长类动物是猴子或猿。受试者可以是男性或女性，并且可以是任何合适的年龄，包括婴儿、少年、青少年、成人和老年受试者。在一些实施方式中，受试者是非灵长类哺乳动物，例如啮齿动物。

如在本文中所使用的“治疗”（及其语法变化，例如“治疗”或“治疗”）指完全或部分改善或减轻疾病或病症或紊乱，或与之相关的症状、不良作用或结果或表型。期望的治疗效果包括但不限于预防疾病的发生或复发、症状的减轻、疾病的任何直接或间接病理后果的减轻、预防转移、降低疾病进展速度、缓解或减轻疾病状态以及缓解或改善预后。这些术语并不暗示完全治愈疾病或完全消除任何症状或对所有症状或后果的影响。

如在本文中所使用的“延缓疾病的发展”是指推迟、阻碍、减缓、阻滞、稳定、抑制和/或延迟疾病（例如癌症）的发展。该延缓可以具有不同的时间长度，这取决于疾病的历史和/或被治疗的个体。对本领域技术人员显而易见的是，足够或明显的延迟实际上可以包括预防，因为个体不发生该疾病。例如，晚期癌症例如转移的发展可被延迟。

如在本文中所使用的“预防”包括针对可易患疾病但尚未被诊断患有该疾病的受试者中该疾病的发生或复发提供预防。在一些实施方式中，提供的细胞和组合物用于延迟疾病的发展或减慢疾病的进展。

如在本文中所使用的“抑制”功能或活性是指当与相同条件（除感兴趣的条件或参数）相比时，或者与另外的条件相比时，降低功能或活性。例如，抑制肿瘤生长的细胞与在该细胞不存在下的肿瘤的生长速率相比降低肿瘤的生长速率。

在施用的上下文中，试剂（例如嵌合抗原受体、多核苷酸、载体、药物制剂、细胞或组合物）的“有效量”指在必要的剂量/量和时间段下，有效达到期望结果例如治疗或预防结果的量。

试剂（例如药物制剂或细胞）的“治疗有效量”指在必要的剂量和时间段下，有效达到期望治疗效果（例如用于治疗疾病、病症、或紊乱，和/或治疗的药代动力学或药效学作用）的量。治疗有效量可以根据例如疾病状态、受试者的年龄、性别和体重以及所施用的细胞群等因素而变化。在一些实施方式中，提供的方法包括以有效量例如治疗有效量施用细胞和/或组合物。

“预防有效量”指在必要的剂量和时间段下，有效达到期望预防结果的量。通常但不是必须的，因为在疾病之前或早期在受试者中使用预防剂量，所以预防有效量将小于治疗有效量。在较低肿瘤负荷的情况下，在某些方面中预防有效量将高于治疗有效量。

在某些实施方式中，将细胞或细胞的个体群体或亚型以约一百万至约一千亿个细胞的范围施用于受试者，例如 100 万至约 500 亿个细胞（例如约 500 万个细胞、约 2500 万个细胞、约 5 亿个细胞、约 10 亿个细胞、约 50 亿个细胞、约 200 亿个细胞、约 300 亿个细胞、约 400 亿个细胞、或任意上述两个值定义的范围），例如约 1000 万到约 1000 亿个细胞（例如约 2000 万个细胞、约 3000 万个细胞、约 4000 万个细胞、约 6000 万个细胞、约 7000 万个细胞、约 8000 万个细胞、约 9000 万个细胞、约 100 亿个细胞、约 250 亿个细胞、约 500 亿个细胞、约 750 亿个细胞、约 900 亿个细胞，或任意上述两个值定义的范围），和在某些情况下，约 1 亿个细胞至约 500 亿个细胞（例如，约 1.2 亿个细胞、约 2.5 亿个细胞、约 3.5 亿个细胞、约 4.5 亿个细胞、约 6.5 亿个细胞、约 8 亿个细胞、约 9 亿个细胞、约 30 亿个细胞、约 300 亿个细胞、约 450 亿个细胞）或这些范围之间的任何值。

在一些实施方式中，总细胞的剂量和/或细胞的个体亚群的剂量在处于或大约 10^4 个细胞/千克 (kg) 体重至处于或大约 10^9 个细胞/千克 (kg) 体重之间的范围内，例如在 10^5 和 10^6 个细胞/kg 体重之间，例如，至少或至少大约或处于或大约 1×10^5 个细胞/kg、 1.5×10^5 个细胞/kg、 2×10^5 个细胞/kg 或 1×10^6 个细胞/kg 体重。例如，在一些实施方式中，细胞以在处于或大约 10^4 和处于或约 10^9 个 T 细胞/千克 (kg) 体重之间或其一定误差范围内施用，例如在 10^5 和 10^6 个 T 细胞/kg 体重之间，例如至少或至少大约或处于或大约 1×10^5 个 T 细胞/kg、 1.5×10^5 个 T 细胞/kg、 2×10^5 个 T 细胞/kg、或 1×10^6 个 T 细胞/kg 体重。

细胞可以通过任何合适的方式来施用，例如通过推注，通过注射，例如静脉内或皮下注射、眼内注射、眼周注射、视网膜下注射、玻璃体内注射、经中隔注射、巩膜下注射、脉络膜内注射、前房内注射、会阴下注射、结膜下注射、眼球筋膜囊下 (sub-Tenon) 注射、球后注射、球周注射，或后近巩膜 (posterior juxtасcleral) 递送。在一些实施方式中，它们通过肠胃外、肺内和鼻内施用，并且如果局部治疗是期望的，则通过病灶内施用。肠胃外输注包括肌内、静脉内、动脉内、腹膜内或皮下给药。在一些实施方式中，给定剂量通过单次推注施用细胞来施用。在一些实施方式中，其通过多次推注施用细胞来施用，例如，在不超过 3 天的期间，或通过连续输注施用细胞来施用。

在一些实施方式中，提供了重复剂量方法，其中给予第一剂量的细胞，然后给予一个或多个第二连续剂量。当以过继治疗方法施用于受试者时，通常设计细胞的多剂量的时机和大小以增加表达抗原的 T 细胞（例如表达 CAR 的 T 细胞）的能效和/或活性和/或功能。在一些实施方式中，重复给药减少了当抑制性免疫分子例如 PD-1 和/或 PD-L1 在表达抗原的例如表达 CAR 的 T 细胞上被上调时可发生的下调或抑制活性。方法包括施用第一剂量，通常随后是一个或多个连续剂量，并且在不同剂量之间具有特定的时间范围。

物或输注提供的给定量或数量的细胞数量作为分次剂量的施用。因此，在某些情况下，第一或连续剂量是在单个时间点给予或启动的指定数量细胞的单次或连续施用。然而，在某些情况下，第一或连续剂量在不超过三天的时间段内以多次注射或输注施用，例如三天或两天、每天一次，或在一天时间内多次输注。

在下面对本公开的实施例的详细描述中，参考了附图。在附图中相似的附图标记指示相似的元素，并且在附图中以说明的方式示出了可以实践本公开的特定实施方式。对这些实施方式进行了足够详细的描述，以使本领域技术人员能够实施本公开。在其他情况下，未详细示出公知的过程、结构和技术，以免混淆对本说明书的理解。因此，以下详细描述不应被理解为限制性的，并且本公开的技术方案仅由所附权利要求书限定。

实施例

实施例 1: CNK-UT 多功能复合体的设计

本实施例设计了四种结构的 CNK-UT 多功能复合体 (multi-functional complex)。其中，第一种结构是基本 CNK-UT 多功能复合体，其它三种结构是在第一种结构的基础上再进一步增加其它组件 (module) 而形成的具有更多功能的 CNK-UT 多功能复合体。

1.1 基本 CNK-UT 多功能复合体

在一些实施方式中，使用基本 CNK-UT 多功能复合体，其示意图如图 1A 所示，其包含三种组件：(1) NK 激活受体组件；(2) CNK 信号转接组件；和 (3) UT 组件。任选地，所述 NK 激活受体组件、所述 CNK 信号转接组件和/或所述 UT 组件之间包含铰链或接头。

其中：

(1) NK 激活受体组件，其至少包含 NK 细胞激活受体或其功能变体，所述 NK 细胞激活受体包含：(a) NK 细胞激活受体胞外结构域 (ED) 或其功能变体，(b) NK 细胞激活受体跨膜结构域 (TMD) 或其功能变体，以及 (c) NK 细胞激活受体胞内结构域 (ICD) 或其功能变体；任选地，所述 NK 细胞激活受体胞外结构域或其功能变体、所述 NK 细胞激活受体跨膜结构域或其功能变体和/或所述 NK 细胞激活受体胞内结构域或其功能变体之间包含铰链或接头；

所述 NK 细胞激活受体选自 NKG2D、NKG2C、NKG2E、NKG2F、NKG2H、CD94、KIR2DL4、KIR2DS1、KIR2DS2、KIR2DS4、KIR3DS1，天然细胞毒性受体 (Natural Cytotoxicity Receptors, NCR)、TRAIL、信号淋巴激活分子 (signaling lymphocytic activation molecule, SLAM) 家族分子 2B4 (又名 CD244)、DNAX 附件分子 1 (DNAM-1, 又名 CD226)、CD16a、2B4、NTB-A、CRACC (CS1) 以及 NKp80；其中，所述天然细胞毒性受体包括 NKp46 (又名 NCR1 或 CD335)、NKp44 (又名 NCR2 或 CD336) 和 NKp30 (又名 NCR3 或 CD337)

在一些优选的实施方式中，CNK 多功能复合体所包含选自 SEQ ID NO.1~24 所示的氨基酸序列。

(2) CNK 信号转接组件，其至少包含 (i) NK 细胞信号转换器 (adaptor) 或其功能变体，所述 NK 细胞信号转换器包含：(a) NK 细胞信号转换器胞外结构域 (ED) 或其功能变体，(b) NK 细胞信号转换器跨膜结构域 (TMD) 或其功能变体，以及 (c) NK 细胞信号转换器胞内结构域 (ICD) 或其功能变体；任选地，所述 NK 细胞信号转换器胞外结构域或其功能变体、所述 NK 细胞信号转换器跨膜结构域或其功能变体和/或所述 NK 细胞信号转换器胞内结构域或其功能变体之间包含铰链或接头

所述 CNK 信号转接组件中的所述 NK 细胞信号转换器为 DAP10 或 DAP12。

在一些优选的实施方式中，所述 CNK 细胞信号转换器功能变体选自 DAP10 或 DAP12 的突变体，或 DAP10 和 DAP12 的融合蛋白，或野生型 DAP10 或 DAP12 与突变型 DAP10 或 DAP12 的融合蛋白。

所述 CNK 细胞信号转换器功能变体选自 DAP10 突变体或 DAP12 的突变体，或 DAP10 和 DAP12 的融合蛋白，或野生型 DAP10 或 DAP12 与突变型 DAP10 或 DAP12 的融合蛋白。

在一些优选的实施方式中，所述 CNK 信号转接组件还包含 (ii) 免疫受体活化信号传导结构域 (ITAM) 和/或 (iii) T 细胞共刺激信号传导结构域。

在一些优选的实施方式中，所述 NK 细胞信号转换器或其功能变体、所述免疫受体活化信号传导结构域 (ITAM) 和/或所述 T 细胞共刺激信号传导结构域之间包含铰链或接头；优选地，所述 NK 细胞信号转换器或其功能变体与所述免疫受体活化信号传导结构域 (ITAM) 域融合。

在一些优选的实施方式中，所述免疫受体活化信号传导结构域 (ITAM) 来自免疫受体的胞内激活信号传导结构域；优选地，所免疫受体选自 TCR ζ 、CD2、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD3 ζ 、CD5、CD22、Fc γ R、CD66d、Fc α R1、Fc γ R1、Fc γ R2、Fc γ R3、Dectin-1、CLEC-1、CD72、CD79A、CD79B；优选地，所述免疫受体活化信号传导结构域 (ITAM) 与 NK 细胞信号转换器或其功能变体融合；优选地，所述免疫受体是 CD3 ζ ；

在一些优选的实施方式中，所述 T 细胞共刺激信号传导结构域来自共刺激分子的胞内信号结构域。

在一些优选的实施方式中，CNK 信号转接组件包含选自 SEQ ID NO.25~45 所示的氨基酸序列。

(3) UT 组件，其至少包含 (i) 靶向降解 TCR、MHC 和/或 NK 细胞靶点的重组蛋白分子或其功能变体，所述靶向降解 TCR、MHC 和/或 NK 细胞靶点的重组蛋白分子包含：(a) 靶向 TCR、MHC 和/或 NK 细胞靶点的结合蛋白分子结构域或其功能变体，(b) 病毒内质网 (ER) 驻留糖蛋白的跨膜结构域或其功能变体，以及 (c) 病毒内质网驻留糖蛋白的胞质结构域或其功能变体；所述病毒内质网驻留糖蛋白的跨膜结构域或其功能变体和病毒内质

构域或其功能变体之间包含铰链或接头。

在所述 UT 组件的靶向降解 TCR 的重组蛋白分子中, 所述靶向 TCR 的结合蛋白分子结构域或其功能变体来自 TCR 抗体或其功能片段或其组合。

在一些优选的实施方案中, 所述抗体选自 TCR α 抗体、TCR β 抗体、TCR $\alpha\beta$ 抗体、TCR γ 抗体、TCR δ 抗体、TCR $\gamma\delta$ 抗体、TCR V δ 2 抗体、TCR C β 1 抗体; 所述抗体的功能片段选自 Fd、Fv、Fab、Fab', F(ab')₂、Fv(scFv)、单链抗体 (scFv) 或纳米抗体 (nanobody)、双链抗体、三链抗体和四链抗体; 优选地, 所述 TCR 抗体是 TCR 单链抗体。在一些优选的实施方案中, 所述靶向 TCR 的结合蛋白分子为 TCR $\alpha\beta$ 抗体。在一些优选的实施方案中, 所述 TCR 单链抗体的氨基酸序列包含与 SEQ ID NO. 116 所示的氨基酸序列具有 80% 或以上同一性的氨基酸序列, 优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 以上同一性的氨基酸序列, 更优选具有 98% 或 99% 以上同一性的氨基酸序列; 所述 TCR 单链抗体的全长序列的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 116 所示。

在一些优选的实施方案中, 所述 UT 组件中的 ERAD 降解结构域来自 HCMV 糖蛋白 US2、US3、US11 或 US10、腺病毒 E3-19K 或 HHV-7 US21。

在一些优选的实施方案中, 所述 UT 组件中的 ERAD 降解结构域包含选自 SEQ ID NO. 46~63 所示氨基酸序列。

可以通过基因合成技术合成表达所述基本 CNK-UT 多功能复合体的多种组件的基因元件片段。采用多顺反子表达方案, 利用自剪切多肽 2A (self-cleaving 2A peptide, 2A: T2A、p2A、E2A、F2A) 等元件连接不同组件的基因元件片段, 获得基本 CNK-UT 多功能复合体基因片段; 通过分子克隆技术将合成的基本 CNK-UT 多功能复合体基因片段克隆到慢病毒载体, 转染 T 细胞, 实现多种不同元件的同时表达, 从而实现 T 细胞对 NK 靶点的特异性识别和杀伤, 同时也借助 UT 元件有效抑制和降解 TCR。或者, 可以将不同的功能元件放在同一个慢病毒载体的不同启动子下, 转染 T 细胞, 实现多种 CNK-UT 元件的同时表达; 或者, 将不同的功能元件放在两种慢病毒载体上, 同时转染 T 细胞, 也可以实现多种 CNK-UT 元件的同时表达。

1.2 增加靶向 MHC 结合蛋白分子结构域的 CNK-UT 多功能复合体

在一些实施方式中, 使用同时降解或抑制 TCR 和 MHC I 和/或 MHC II 的 CNK-UT 多功能复合体, 其示意图如图 1B 所示, 其也包含三种组件: (1) NK 激活受体组件; (2) CNK 信号转接组件; 和 (3) UT 组件: 包含靶向降解 TCR 的重组蛋白分子结构域或其功能变体和靶向 MHC I 和/或 MHC II 的结合蛋白分子结构域或其功能变体, 其与基本 CNK-UT 多功能复合体相比, 不同之处在于 (3) UT 组件增加了靶向 MHC I 的结合蛋白分子结构域或其功能变体。任选地, 所述 NK 激活受体组件、CNK 信号转接组件、UT 组件之间通过铰链或接头连接。

在一些实施方案中, 所述靶向 MHC I 和/或 MHC II 的结合蛋白分子结构域或其功能变体为靶向 HLA 的结合蛋白分子结构域或其功能变体。

在一些实施方案中, 所述靶向 MHC I 的结合蛋白分子结构域可以来自抑制 MHC I 分子的病毒内质网蛋白。在一些实施方案中, 所述抑制 MHC I 分子的病毒内质网糖蛋白选自人巨细胞病毒 (human cytomegalovirus, HCMV) US6、单纯疱疹病毒 (herpes simplex virus, HSV) ICP47、牛痘病毒 (cowpox virus, CPXV) CPXV12、牛疱疹病毒 (bovine herpesvirus, BHV) UL49.5、或爱泼斯坦巴尔病毒 (Epstein Barr virus, EBV) BNFL2a 等。上述病毒内质网蛋白通过与抗原处理相关转运体 (transporter associated with antigen processing, TAP) 结合, 从而阻止 TAP 介导的多肽转运到内质网, 并抑制 MHC 分子的组装, 实现对 MHC I 的表达抑制。在一些优选的实施方案中, 所述靶向 MHC I 和/或 MHC II 的结合蛋白分子结构域或其功能变体包含 TAP 结合结构域。在一些优选的实施方案中, 所述 TAP 结合结构域包含选自 SEQ ID NO. 64~73 所示的氨基酸序列。

在一些实施方案中, 所述靶向 MHC I 的结合蛋白分子结构域还可以来自降解 MHC I 分子的病毒糖蛋白。在一些实施方案中, 所述病毒糖蛋白选自 HCMV 糖蛋白 US2、US3、US11、US10 或腺病毒 E19 等。在一些优选的实施方案中, 所述靶向 MHC I 和/或 MHC II 的结合蛋白分子结构域或其功能变体包含 MHC 结合结构域。在一些优选的实施方案中, 所述 MHC 结合结构域包含选自 SEQ ID NO. 74~82 所示的氨基酸序列。

在一些实施方案中, 所述靶向 MHC I 的结合蛋白分子结构域还可以来自定向抑制或降解 MICA、MICB、ULBP1-6 等 NK 靶点蛋白的病毒蛋白。在一些实施方案中, 所述病毒蛋白选自 HCMV UL16、UL141、UL142 或腺病毒 E3-19K9 等。在一些优选的实施方案中, 所述病毒蛋白的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 83~91 所示的氨基酸序列。

在一些实施方案中, 所述靶向 MHC I 的结合蛋白分子结构域还可以来自把 MHC I 分子从高尔基体转运到溶酶体进行降解的病毒蛋白。在一些实施方案中, 所述病毒蛋白选自 HIV Nef、HIV Vpu、HHV-7 U21、HHV-8 KK3、HHV-8 KK5、MHV-68 MK3 和 HTLV-1 p12 等。在一些优选的实施方案中, 所述病毒蛋白包含选自 SEQ ID NO. 92~97 所示的氨基酸序列。

在一些实施方案中, 所述靶向 MHC I 和/或 MHC II 的结合蛋白分子结构域或其功能变体还包含介导 MHC-多肽分子从高尔基体返回内质网并促进其降解的病毒蛋白; 优选地, 所述病毒蛋白包含 MHC 结合结构和 KDEL receptor 结合结构域。在一些实施方案中, 所述病毒蛋白是 Cowpox Virus 蛋白 CPXV203。在一些优选的实施方案中, 所述病毒蛋白包含选自 SEQ ID NO. 98~103 所示的氨基酸序列。

采用与获得基本 CNK-UT 多功能复合体基因片段相同的方式, 获得增加了靶向 MHC I 结合蛋白分子结构域的

件有效抑制和降解 TCR 和 MHC I 的表达。

1.3 增加靶向 MHC I 的结合蛋白分子结构域和复合型转接器的 CNK-UT 多功能复合体

在一些实施方式中, 使用同时降解 TCR 和 MHC I 并实现 CNK-T 细胞对肿瘤抗原特异性的识别和激活的多功能复合体, 其示意图如图 1C 所示, 其包含四种组件: (1) NK 激活受体组件; (2) CNK 信号转接组件; (3) UT 组件; 和 (4) 复合型转接器 (Chimeric adaptor) 组件, 其与增加靶向 MHC I 结合蛋白分子结构域的 CNK-UT 多功能复合体相比, 不同之处在于增加了 (4) 复合型转接器组件。任选地, 所述 NK 激活受体组件、CNK 信号转接组件、UT 组件和/或复合型转接器组件之间通过铰链或接头连接。

所述 (4) 复合型转接器包含: (i) 靶向肿瘤的胞外识别结构域; (ii) 跨膜结构域; 和 (iii) 胞内信号传导结构域; 任选地, 所述靶向肿瘤的胞外识别结构域、跨膜结构域和/或胞内信号结构域之间包含铰链或接头;

在一些实施方式中, 所述复合型转接器组件的靶向肿瘤的胞外识别结构域选自肿瘤抗原特异结合结构域、肿瘤微环境靶抗原结合结构域和/或靶向肿瘤微环境的趋化受体;

在一些实施方式中, 所述靶向肿瘤的胞外识别结构域选自能靶向识别肿瘤相关抗原的抗体或其功能片段、TCR 或其组合; 所述抗体的功能片段选自 Fd、Fv、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv(scFv)、单链抗体 (scFv) 或纳米抗体 (nanobody)、双链抗体、三链抗体和四链抗体;

在一些实施方式中, 所述复合型转接器组件的跨膜结构域选自 NK 细胞激活受体跨膜结构域、DAP10 跨膜结构域、DAP12 跨膜结构域、CD8 跨膜结构域、CD28 跨膜结构域、CD4 跨膜结构域、4-1BB 跨膜结构域、OX40 跨膜结构域、ICOS 跨膜结构域、CTLA-4 跨膜结构域、PD-1 跨膜结构域、LAG-3 跨膜结构域、2B4 跨膜结构域和 BTLA 跨膜结构域以及其组合; 优选地, 所述 NK 细胞激活受体选自 NKG2D、NKG2C、NKG2E、NKG2F、NKG2H、CD94、KIR2DL4、KIR2DS1、KIR2DS2、KIR2DS4、KIR3DS1, 天然细胞毒性受体、TRAIL、DNAM-1、CD16a、2B4、NTB-A、CRACC 以及 NKp80; 优选地, 所述天然细胞毒性受体选自 NKp46、NKp44 和 NKp30;

在一些实施方式中, 所述复合型转接器组件的胞内信号传导结构域包括 NK 细胞激活受体的胞内信号结构域和/或共刺激信号传导结构域。

在一些实施方式中, 所述 NK 细胞激活受体选自 NKG2D、NKG2C、NKG2E、NKG2F、NKG2H、CD94、KIR2DL4、KIR2DS1、KIR2DS2、KIR2DS4、KIR3DS1, 天然细胞毒性受体、TRAIL、DNAM-1、CD16a、2B4、NTB-A、CRACC 以及 NKp80;

在一些实施方式中, 所述胞内信号结构域还包括共刺激信号传导结构域; 优选地, 所述共刺激信号传导结构域选自 T 细胞共刺激信号传导结构域; 包括, 但不限于衍生自 MHC I 类分子、TNF 受体蛋白、免疫球蛋白样蛋白、细胞因子受体、整合蛋白、淋巴细胞活化信号分子 (SLAM 蛋白)、活化 NK 细胞受体、BTLA、Toll 配体受体、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、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 和与 CD83 特异性结合的配体、CARD11、FcRa、FcRp、FcRy、Fyn、HVEM、ICOS、Lck、LAG3、LAT、LRP、NOTCH1、Wnt、OX40、ROR2、Ryk、SLAMF1、Slp76、pTa、TCRa、TCRp、TRIM、ZAP70、PTCH2 等胞内信号结构域; 更优选地, 所述共刺激信号传导结构域选自 NKG2D 胞内信号结构域, DAP10 胞内信号结构域, DAP12 胞内信号结构域, NCR 胞内信号结构域, CD28 胞内信号结构域、4-1BB 胞内信号结构域、OX40 胞内信号结构域、ICOS 胞内信号结构域。

采用与获得基本 CNK-UT 多功能复合体基因片段相同的方式, 获得增加靶向 MHC I 的结合蛋白分子结构域和复合型转接器的 CNK-UT 多功能复合体基因片段; 通过分子克隆技术将合成的 CNK-UT 多功能复合体基因片段克隆到慢病毒载体, 转染 T 细胞, 实现四种不同元件的同时表达, 从而实现 T 细胞对 NK 靶点的特异性识别和杀伤, 也借助 UT 元件有效抑制和降解 TCR 和 MHC I 的表达; 并通过复合型的转接器实现 CNK-T 细胞对肿瘤抗原特异性的识别和激活。

1.4 增加靶向 MHC I 的结合蛋白分子结构域和 CAR 或 TCR 等靶向杀伤肿瘤细胞的受体的 CNK-UT 多功能复合体

在一些实施方式中, 使用同时降解 TCR 和 MHC I 并实现对肿瘤细胞的特异性识别和杀伤效应的多功能复合体, 其示意图如图 1D 所示, 其包含四种组件: (1) NK 激活受体组件; (2) CNK 信号转接组件; (3) UT 组件; 和 (4) 靶向杀伤肿瘤细胞受体组件, 其与增加靶向 MHC I 结合蛋白分子结构域的 CNK-UT 多功能复合体相比, 不同之处在于增加了 (4) 靶向杀伤肿瘤细胞受体组件。任选地, 所述 NK 激活受体组件、CNK 信号转接组件、

胞内共刺激信号传导结构域；(iv) T 细胞活化信号传导结构域 (ITAM)；任选地，所述靶向肿瘤抗原的胞外识别结构域、跨膜结构域、胞内共刺激信号传导结构域和/或 T 细胞活化信号传导结构域 (ITAM) 之间包含铰链或接头。

所述靶向杀伤肿瘤细胞受体组件的跨膜结构域选自 CD8 跨膜结构域、T 细胞受体的 α 和/或 β 链跨膜结构域、CD28 跨膜结构域、CD3 ϵ 跨膜结构域、CD45 跨膜结构域、CD4 跨膜结构域、CD5 跨膜结构域、CD8 跨膜结构域、CD9 跨膜结构域、CD16 跨膜结构域、CD22 跨膜结构域、CD33 跨膜结构域、CD37 跨膜结构域、CD64 跨膜结构域、CD80 跨膜结构域、CD86 跨膜结构域、CD134 跨膜结构域、CD137 跨膜结构域、CD154 跨膜结构域、GITR 跨膜结构域以及其组合

所述 T 细胞活化信号传导结构域衍生自 CD3 ζ 、共同 FcR γ (FCER1G)、Fc γ R1a、FcR β 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD5、CD22、CD79a、CD79b、CD278("ICOS")、Fc ϵ R1 CD66d、DAP10 和 DAP12 等胞内信号结构域

在一些优选的实施方式中，所述 (4) 靶向杀伤肿瘤细胞受体组件为 CAR 或 TCR 靶向杀伤肿瘤细胞的受体。

采用与获得基本 CNK-UT 多功能复合体基因片段相同的方式，获得增加靶向 MHC I 的结合蛋白分子结构域和 CAR 或 TCR 等靶向杀伤肿瘤细胞的受体的 CNK-UT 多功能复合体基因片段；通过分子克隆技术将合成的 CNK-UT 多功能复合体基因片段克隆到慢病毒载体，转染 T 细胞，实现四种不同元件的同时表达，从而实现 T 细胞对 NK 靶点的特异性识别和杀伤，也借助 UT 元件有效抑制和降解 TCR 和 MHC I 的表达；并通过 CAR 或 TCR 的结构实现对肿瘤细胞的特异性识别和杀伤效应，协同 CNK 元件，更高效的对肿瘤细胞进行清除。

实施例 2：表达 CNK-UT 多功能复合体的 CNK-UT 元件的设计

本实施例设计了四种表达 CNK-UT 多功能复合体的 CNK-UT 元件。

2.1 CNK-UT 元件设计结构 1

在一些实施方式中，如图 2A 所示，利用单一慢病毒 EF1 α 启动子表达载体，利用自剪切多肽 2A 等元件来连接 CNK-UT 元件其中一种组合：DAP10-DAP12 ICD-T2A-NKG2D-p2A-anti-TCR-AdE3 ERAD，实现在单个载体上表达多个功能元件。

2.2 CNK-UT 元件设计结构 2

在一些实施方式中，如图 2B 所示，利用单一慢病毒 EF1 α 启动子表达载体，利用自剪切多肽 2A 等元件来连接 CNK-UT 元件其中一种组合：DAP10-DAP12 ICD-T2A-NKG2D-p2A-anti-TCR-US2 ERAD，实现在单个载体上表达多个功能元件。

2.3 CNK-UT 元件设计结构 3

在一些实施方式中，如图 2C 所示，利用单一慢病毒表达载体，采用双启动子和多顺反子表达方案，利用 EF1 α 和 CMV 启动子，分别调控 DAP10-CD3 ζ -T2A-NKG2D-p2A-anti-TAA scFv-DAP10 和 anti-TCR-AdE3 ERAD-E2A-AdE3 多基因的表达式，实现在单个载体上表达多个功能元件。

2.4 CNK-UT 元件设计结构 4

在一些实施方式中，如图 2D 所示，利用两种不同慢病毒表达载体，分别调控 anti-TAA scFv-CD28/4-1BB-CD3 ζ -T2A-DAP10-CD3 ζ -T2A-NKG2D 和 anti-TCR-AdE3 ERAD-T2A-AdE3 的表达式，制备出不同慢病毒后共转染 T 细胞后，实现同一 T 细胞上表达多个功能元件。

实施例 3：靶向 NKG2DL 的特异性嵌合抗原受体的表达质粒的制备

全基因合成 CNK-UT 的核苷酸序列（其核苷酸序列如 SEQ ID NO. 118 所示，其编码蛋白如 SEQ ID NO. 117 所示，其中嵌合抗原受体中的功能片段按以下顺序连接 DAP10-CD3 ζ -T2A-NKG2D-p2A-anti-TCR scFv-AdE3），通过分子克隆的方式连接到慢病毒载体 pCDH-CMV-MCS-EF1 α -Puro（购自优宝生物）或 pLVX-EF1 α -AcGFP1-C1 Vector（Takara），构建 CNK-UT 慢病毒目标载体，并通过测序确定正确后，用质粒转化 DH5 α 感受态细胞（Thermo Fisher），挑取单克隆菌落，大规模培养后，利用质粒抽提试剂盒 PureLinkTM HiPure Plasmid Maxiprep Kit（Thermo Fisher）进行质粒生产和纯化，获得 CNK-UT 慢病毒质粒。

实施例 4：CNK-UT 的病毒制备

将实施例 3 获得的 CNK-UT 慢病毒质粒，以及包装质粒 psPAX2 和 pMD2.G（购自 Addgene，货号：12259&12260），按照 1.64 μ mol: 1.3 μ mol: 0.72 μ mol 的比例用聚乙烯亚胺转染试剂（408727，Sigma）按 DNA: μ g PEI=1:3 的比例进行转染，共转染 293T 细胞（为 ATCC 产品，产品编号为 CRL3216TM）；具体的包装质粒的制备方法参见 PureLinkTM HiPure Plasmid Maxiprep Kit（K210006，Thermo）说明书；具体的转染操作过程参见 Sigma 转染说明书。转染后 16 小时更换为完全培养基（购买自 Life Technologies 公司，产品货号：11995-065），培养 24 小时、48 小时和 72 小时后，分别收集慢病毒上清液，合并，于 -80 $^{\circ}$ C，3000rpm 离心 10~15 分钟后经 0.45 μ m 滤膜过滤，最后于 4 $^{\circ}$ C，25000rpm 超离心 2~3 小时，浓缩病毒，收集慢病毒浓缩液，将收集的慢病毒浓缩液转入 -80 $^{\circ}$ C 保存。

用 CD3 分选磁珠, MS 分离柱和 MiniMACS™分离装置 (Miltenyi Biotec) 进行 CD3⁺ T 细胞的阳性分选和洗脱, 分离出的 CD3⁺ T 细胞再通过偶联抗-CD3 抗体和抗-CD28 抗体的磁珠 (Human T-Activator CD3/CD28, Invitrogen, 货号: 11161D) 进行刺激培养, 具体步骤如下: 将外周血单核细胞稀释至浓度为 1×10^6 个单个细胞/ml, 铺在 24 孔板中, 再以 1:1 的比例将磁珠加入细胞并混匀, 重悬于培养液 (OpTmizer™ T-Cell Expansion SFM, A1048503, Life Technologies), 并加入 IL2 50U/ml 和 IL15 5ng/ml, 在 37°C、5%CO₂ 培养箱中培养 1 天后进行装载有 CNK-UT 元件的实施例 4 制备的慢病毒转染。具体步骤如下: 取实施例 4 制备的慢病毒浓缩液, 按照 MOI=3-5 的值将病毒液加入细胞, 并加入 Polybrene 10μg/ml, 放入平角离心机后, 低速 (500g-1000g/min) 离心 30~60 分钟, 然后放入培养箱中 37°C 培养, 感染后 48 小时后获得表达 CNK-UT 的细胞 (CNK-UT 细胞), 可进行流式检测细胞表型, 继续培养 8 天后可进行下一步的表型检测和细胞功能实验。

实施例 6: CNK-UT 细胞的表型检测

图 3 是一种 CNK-UT (DAP10-CD3ζ-T2A-NKG2D-p2A-anti-TCR scFv-AdE3) 细胞基本表型的流式细胞检测结果。在制备例 2 中培养 10 天的细胞, 分别取 5×10^5 未转染的 T 细胞和转染 CNK-UT 病毒载体的 T 细胞, 经过抗体 CD8-Pacific Blue、CD4-APC、NKG2D-PE-Cy7、TCR-αβ-APC-Cy7 (所有抗体均购自 Biolegend) 染色, 再通过使用流式细胞仪 (BD FACSCanto II) 进行细胞表型鉴定。结果显示, 未转染的 T 细胞, CD8 表达 NKG2D 且表达 TCR-αβ, CD4 不表达 NKG2D, 高表达 TCR-αβ; 而经过转染改造的 CNK-UT, CD8 和 CD4 T 细胞都高表达 NKG2D, 不表达 TCR-αβ。

实施例 7: CNK-UT 细胞的广谱肿瘤杀伤功能检测

本实施例研究实施例 5 制备的 CNK-UT 细胞的广谱肿瘤杀伤功能。其中, 人结肠腺瘤细胞系 HT29 购自 Procell (CL-0118); 三阴乳腺癌细胞 MDA-MB453 购自 Procell (CL-0152); 急性髓系白血病细胞系 THP1 购自 Procell (CL-0233); 肝细胞癌 (HCC) HepG2 购自 Procell (CL-0103); 肝细胞癌 (HCC) PLC 购自 Procell (CL-0415)。

7.1 CNK-UT 细胞对人结肠腺瘤细胞系 HT29 的识别和特异性杀伤

本实验中使用的 CNK-UT 细胞是实施例 5 制备的细胞。

图 4 示出了 CNK-UT 细胞对人结肠腺瘤细胞系 HT29 的识别和特异性杀伤。其中:

A: 人结肠腺瘤细胞系 HT29 不同 NK 靶点蛋白的表达情况

人结肠腺瘤细胞系 HT29 0.5×10^6 细胞经过胰酶消化下来, 分别染 MICA-APC、MICB-APC、ULBP1-APC、ULBP2-APC、ULBP3-APC, 并用 IgG 同型 (IgG isotype) 抗体作为对照 (购自 R&D Systems), 再通过使用流式细胞仪 (BD FACSCanto II) 进行细胞表型鉴定。结果显示: HT29 细胞高表达 ULBP2, 弱表达 MICA、MICB、ULBP1 和 ULBP3。

B: CNK-UT 细胞具有对 HT29 高效的杀伤和激活功能

T 细胞和肿瘤细胞的共培养实验, 取 24 孔板, 计数人结肠腺瘤细胞系 HT29 0.5×10^6 细胞/孔进行铺板, 待肿瘤细胞生长密度达 80% 以上, 按效靶比 1:5, 分别加入未转染 T 细胞和 CNK-UT 细胞 (DAP10-CD3ζ-T2A-NKG2D-p2A-anti-TCR scFv-AdE3), 24h 后, 所有细胞消化收获后, 进行 CD45-PerCP-Cy5.5、CD8-Pacific Blue、CD4-APC、NKG2D-PE-Cy7、CD25-APC-Cy7 (购自 Biolegend) 的染色, 而后进行流式细胞仪技术进行检测。分析结果时, 通过 CD45 区别 CD45(-) 肿瘤细胞和 CD45(+) T 细胞, 并进一步分析 CD8, CD4 T 细胞表面的 NKG2D 和激活标志物 CD25 的表达。实验数据表明, 59.0% 的 HT-29 细胞上调 MICA 的表达, 40.1% 的细胞上调 MICB 的表达, 56.1% 的细胞上调 ULBP1 的表达, 84.4% 的细胞上调 ULBP2 的表达, 23.7% 的细胞上调 ULBP3 的表达 (图 4A), CNK-UT 细胞对 HT29 细胞具有良好的杀伤功能, 对照组的共培养系统中 69.5% 的细胞是肿瘤细胞, 而 T 细胞不表达 CD25; 而 CNK-UT 细胞的共培养体系中, 从 FSC/SSC 图中可发现, 绝大多数肿瘤细胞已经被清除, T 细胞的比例显著增加占 84.1%, 而且 36.345% 的 CD8+T 细胞上调 CD25 表达, 19.08% 的 CD4+ T 细胞上调 CD25 的表达 (图 4B)。

7.2 CNK-UT 细胞对 MDA-MB453 的识别和特异性杀伤

本实验中使用的 CNK-UT 细胞是实施例 5 制备的细胞。

图 5 示出了 CNK-UT 细胞对 MDA-MB453 的识别和特异性杀伤。

A: 三阴乳腺癌细胞系 MDA-MB453 不同 NK 靶点蛋白的表达情况

MDA-MB453 0.5×10^6 细胞经过胰酶消化下来, 分别染 MICA-APC、MICB-APC、ULBP1-APC、ULBP2-APC、ULBP3-APC, IgG 同型抗体作为对照 (购自 R&D Systems), 再通过流式细胞仪 (BD FACSCanto II) 进行细胞表型鉴定。结果显示: MDA-MB453 细胞高表达 MICA、ULBP2, 弱表达 MICB、ULBP1 和 ULBP3。

B: CNK-UT 细胞对 MDA-MB453 显示高效的杀伤和激活功能

T 细胞和肿瘤细胞的共培养实验, 取 24 孔板, 计数乳腺癌细胞系 MDA-MB453 0.5×10^6 细胞/孔进行铺板, 待肿瘤细胞生长密度达 80% 以上, 按效靶比 1:5, 分别加入未转染 T 细胞和 CNK-UT 细胞 (DAP10-CD3ζ-T2A-NKG2D-p2A-anti-TCR scFv-AdE3), 24h 后, 所有细胞消化收获后, 进行 CD45-PerCP-Cy5.5、CD8-Pacific Blue、

ULBP1 的表达, 95.0%的细胞上调 ULBP2 的表达, 6.23%的细胞上调 ULBP3 的表达 (图 5A); CNK-UT 细胞对 MDA-MB453 细胞具有良好的杀伤功能, 对照组的共培养系统中 48.9%的细胞是肿瘤细胞, 而 T 细胞不表达 CD25; 而 CNK-UT 细胞的共培养体系中, 只剩下 6.74%是肿瘤细胞, 而且 14.8%的 CD8+T 细胞上调 CD25 表达, 28.1%的 CD4+ T 细胞上调 CD25 的表达 (图 5B)。实验结果表明, CNK-UT 细胞对 MDA-MB453 细胞具有良好的杀伤功能, 并实现特异性的激活。

7.3 CNK-UT 细胞对 THP1 的识别和特异性杀伤

本实验中使用的 CNK-UT 细胞是实施例 5 制备的细胞。

图 6 示出了 CNK-UT 细胞对 THP1 的识别和特异性杀伤

A: 急性髓系白血病细胞 THP1 不同 NK 靶点的表达情况

0.5×10⁶ THP1 细胞经离心下来, 分别染 MICA-APC、MICB-APC、ULBP1-APC、ULBP2-APC、ULBP3-APC, IgG 同型抗体作为对照 (购自 R&D Systems), 再通过流式细胞仪 (BD FACSCanto II) 进行细胞表型鉴定。结果显示: THP1 细胞高表达 ULBP1、ULBP2、ULBP3, 弱表达 MICA、MICB。

B: CNK-UT 细胞对 THP1 显示高效的杀伤和激活功能

T 细胞和肿瘤细胞的共培养实验, 取 24 孔板, 计数 AML 细胞系 THP1 0.5×10⁶ 细胞/孔进行铺板, 按效靶比 1:5, 分别加入未转染 T 细胞和 CNK-UT 细胞 (DAP10-CD3ζ-T2A-NKG2D-p2A-anti-TCR scFv-AdE3), 24h 后, 所有细胞离心收获后, 进行 CD45-PerCP-Cy5.5、CD8-Pacific Blue、CD4-APC、CD137-PE-Cy7、CD25-APC-Cy7 (购自 Biolegend) 的染色, 而后进行流式细胞仪技术进行检测。实验数据表明, THP1 细胞 27.9%上调 MICB 的表达, 99.0%的细胞上调 ULBP1 的表达, 95.8%的细胞上调 ULBP2 的表达, 99.1%的细胞上调 ULBP3 的表达 (图 6A); CNK-UT 细胞对 THP1 细胞具有良好的杀伤功能, 对照组的共培养系统中 92.6%细胞是肿瘤细胞, 而 T 细胞不上调 CD25; 而 CNK-UT 细胞的共培养体系中, 只剩下 12.3%的肿瘤细胞, 而且 49.1%CD8+ T 细胞上调 CD25 表达, 33.59%CD8+ T 细胞上调 CD137 的表达; 33.9%CD4+T 细胞上调 CD25 的表达, 11.28%CD4+细胞上调 CD137 的表达。实验结果证实, CNK-UT 细胞对 THP1 细胞具有良好的杀伤功能, 清除共培养体系中的 THP1, 并实现特异性的激活, 上调 T 细胞激活标志物 CD25 和 CD137 的表达。

7.4 CNK-UT 可协同常规 CAR-T 技术增强对肿瘤细胞的识别和特异性杀伤

本实验中使用的 CNK-UT 细胞是实施例 5 制备的细胞。

图 7 示出了 CNK-UT 细胞能升级常规 CAR-T 技术, 实现更强大的靶向杀伤和激活能力。

A: 肝细胞癌 (HCC) HepG2 的 GPC3、PD-L1 和不同 NK 靶点的表达情况

0.5×10⁶ HepG2 细胞经过胰酶消化下来, 分别染 GPC3-APC、PD-L1-APC、MICA-APC、MICB-APC、ULBP1-APC、ULBP2-APC、ULBP3-APC, IgG 同型抗体作为对照 (购自 R&D Systems), 再通过流式细胞仪 (BD FACSCanto II) 进行细胞表型鉴定。结果显示: HepG2 细胞高表达 GPC3, 弱表达 PD-L1、MICA、MICB、ULBP1 和 ULBP2。

B: CAR/CNK-UT 细胞比常规 CAR-T 细胞显示对 HepG2 细胞更高效的杀伤和激活功能

制备 GPC3 CAR-T 细胞: 参考实施例 3-实施例 5, 全基因合成 anti-GPC3 41BB-CD3ζ 核苷酸序列 (SEQ ID NO. 120, 其编码蛋白的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 119 所示), 通过分子克隆的方式连接到慢病毒载体 pCDH-CMV-MCS-EF1α-Puro, 制备质粒和慢病毒后, 转染 T 细胞, 获得常规 GPC3 CAR-T 细胞。

制备 GPC3 CAR/CNK-UT 细胞: 参考实施例 3-实施例 5, 全基因合成 anti-GPC3 41BB-CD3ζ-T2A-DAP10-CD3ζ-T2A-NKG2D-p2A-anti-TCR scFv-AdE3 核苷酸序列 (SEQ ID NO. 122, 其编码蛋白的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 121 所示), 通过分子克隆的方式连接到慢病毒载体 pCDH-CMV-MCS-EF1α-Puro, 制备质粒和慢病毒后, 转染 T 细胞并进行扩增培养, 获得 GPC3 CAR/CNK-UT 细胞。

T 细胞和肿瘤细胞的共培养实验, 取 24 孔板, 计数 0.5×10⁶ 细胞/孔进行铺板, 待肿瘤细胞生长密度达 80%以上, 按效靶比 1:5, 分别加入常规 GPC3 CAR-T (anti-GPC3-41BB-CD3ζ) 细胞, CNK-UT 细胞 (DAP10-CD3ζ-T2A-NKG2D-p2A-anti-TCR scFv-AdE3) 和 GPC3 CAR/CNK-UT 细胞 (anti-GPC3 41BB-CD3ζ-T2A-DAP10-CD3ζ-T2A-NKG2D-p2A-anti-TCR scFv-AdE3), 24h 后, 所有细胞消化收获后, 进行 CD45-PerCP-Cy5.5、CD8-Pacific Blue、CD4-APC、NKG2D-PE、CD137-PE-Cy7 (购自 Biolegend) 的染色, 所有细胞消化后进行流式细胞仪技术进行检测, 通过 CD45 区别肿瘤细胞和 T 细胞, 再分析 CD8 和 CD4 细胞表面激活标志物 CD137 的表达。实验数据表明, HepG2 细胞 95.0%高表达 GPC3, 69.1%细胞上调 PD-L1 表达, 18.2%的细胞表达 MICA, 25.6%细胞上调 MICB, 16.0%细胞上调 ULBP1, 5.23%的细胞上调 ULBP2 的表达, 在 E:T=1:5 共培养 24h 后, 对照组 T 细胞共培养系统中 39.1%细胞是肿瘤细胞, CD4+、CD8+ T 细胞不上调 CD25; GPC3 CAR-T 共培养体系中, 只剩下 11.1%的肿瘤细胞, 20.1% CD8+T 细胞上调 CD137 表达; 10.3% CD4+ T 细胞上调 CD137 的表达; 在 CNK-UT 共培养系统中, 只剩下 8.01%的肿瘤细胞, 57.9% CD8+T 细胞上调 CD137 表达; 33.1% CD4+ T 细胞上调 CD137 的表达; GPC3 CAR/CNK-UT 共培养系统中, 只剩下 4.86%的肿瘤细胞, 50.3% CD8+T 细胞上调 CD137 表达; 35.42% CD4+ T 细胞上调 CD137 的表达。因此, CNK-UT 细胞对比常规 CAR-T 细胞对 HepG2 细胞具有良好的杀伤功能, 并实现特异性的激活, 上调 CD137 的表达; 集成 GPC3 41BB-Z CAR 和 CNK-UT 元件的 GPC3 CAR/CNK-UT 细胞具有更加高效的肿瘤杀伤和激活功能。

图 8 示出了 CNK-UT 细胞能升级常规 CAR-T 技术, 实现对高表达 PD-L1 肿瘤细胞的靶向杀伤和激活能力。

A: 肝细胞癌 (HCC) PLC 的 GPC3、PD-L1 和不同 NK 靶点的表达情况

0.5×10⁶ PLC 细胞经过胰酶消化下来, 分别染 GPC3-APC、PD-L1-APC、MICA-APC、MICB-APC、ULBP1-APC、ULBP2-APC、ULBP3-APC, IgG 同型抗体作为对照 (购自 R&D Systems), 再通过流式细胞仪 (BD FACSCanto II) 进行细胞表型鉴定。结果显示: PLC 细胞高表达 PD-L1 和 ULBP1, 弱表达 GPC3、MICA、MICB 和 ULBP2。

B: CNK-UT 细胞比常规 CAR-T 细胞显示对 HepG2 细胞更高效的杀伤和激活功能

T 细胞和肿瘤细胞的共培养实验, 效靶比 1:5, 未转染 T 细胞, 常规 GPC3 CAR-T 细胞, CNK-UT 细胞和 GPC3 CAR/CNK-UT 细胞分别加入 PLC 细胞中, 共培养 24h 后, 所有细胞消化后进行流式细胞仪技术进行检测, 通过 CD45 区别肿瘤细胞和 T 细胞, 再分析 CD8/CD4 细胞表面激活标志物 CD25 和 CD137 的表达。实验数据表明, PLC 细胞 35.9% 高表达 GPC3, 97.8% 细胞上调 PD-L1 表达, 56.9% 的细胞表达 MICA, 40.9% 细胞上调 MICB, 68.7% 细胞上调 ULBP1, 25.7% 的细胞上调 ULBP2 的表达; 在 E:T=1:5 共培养 24h 后, 对照组 T 细胞共培养系统中 30.3% 细胞是肿瘤细胞, 未转染的 CD4⁺, CD8⁺ T 细胞都不上调 CD137 的表达; 而 GPC3 CAR-T 共培养体系中, 高达 47.0% 都是肿瘤细胞, 只有 6.89% CD8⁺ T 细胞上调 CD137 表达; CD4⁺ T 细胞基本不上调 CD137 的表达; 在 CNK-UT 共培养系统中, 只剩下 12.2% 的肿瘤细胞, 72.0% CD8⁺ T 细胞上调 CD137 表达; 42.2% CD4⁺ T 细胞上调 CD137 的表达; GPC3 CAR/CNK-UT 共培养系统中, 只剩下 8.94% 的肿瘤细胞, 73.9% CD8⁺ T 细胞上调 CD137 表达; 36.2% CD4⁺ T 细胞上调 CD137 的表达。实验结果显示, 由于 PLC 高表达 PD-L1, 弱表达 GPC3, 所以常规 GPC3 CAR-T 对 PLC 的杀伤功能很弱, 但 CNK-UT 细胞对 PLC 细胞具有良好的杀伤功能, 并实现特异性的激活, 上调 CD137 的表达; 集成 GPC3 CAR 和 CNK-UT 元件的 GPC3 CAR/CNK-UT 细胞具有更加高效的肿瘤杀伤和激活功能。

实施例 8: CNK-UT 细胞的肿瘤模型功能检测

本实施例采用免疫缺陷小鼠 (NSG 小鼠) (购自江苏集萃药康生物科技股份有限公司, 货号 T001475) 荷瘤模型进行体内药效学研究。

8.1 CNK-UT 细胞对肝癌细胞系 HepG2 动物模型的治疗效果

实验动物分为以下三组:

阴性对照组: 给予对照 T 细胞, 同种供者来源 T 细胞, 经磁珠刺激扩增好的未转染 T 细胞;

同型对照组: 给予常规 GPC3 CAR-T 细胞: 制备 GPC3 CAR-T 细胞: 参考实施例 3-实施例 5, 全基因合成 anti-GPC3 41BB-CD3 ζ 核苷酸序列, 通过分子克隆的方式连接到慢病毒载体 pCDH-CMV-MCS-EF1 α -Puro, 制备质粒和慢病毒后, 转染 T 细胞, 获得常规 GPC3 CAR-T 细胞。

CNK-UT 组: 给予 GPC3 CAR/CNK-UT 细胞

制备 GPC3 CAR/CNK-UT 细胞: 参考实施例 3-实施例 5, 全基因合成 anti-GPC3 41BB-CD3 ζ -T2A-DAP10-CD3 ζ -T2A-NKG2D-p2A-anti-TCR scFv-AdE3 核苷酸序列, 通过分子克隆的方式连接到慢病毒载体 pCDH-CMV-MCS-EF1 α -Puro, 制备质粒和慢病毒后, 转染 T 细胞并进行扩增培养, 获得 GPC3 CAR/CNK-UT 细胞。

将实验动物分组后, 分别给予对照 T 细胞、常规 GPC3 CAR-T 细胞和 GPC3 CAR/CNK-UT, 之后称量动物体重。15 只 NSG 小鼠经右侧腋下接种 HepG2 细胞 3×10⁶/只, 造模当天记为第 0 天。7 天后观察见小鼠造模成功, 将小鼠分为 3 组, 分别给予普通入原代 T 细胞 (对照 T 细胞)、常规 GPC3-CAR-T 细胞、GPC3 CAR/CNK-UT 细胞, 并观察各种细胞对小鼠体内肿瘤荧光的清除作用。三种细胞均以尾静脉注射的方式给药, 剂量为 2×10⁶/只, 连续 3 次 (第 7, 9, 11 天), 给药日期记为第 7 天, 之后每 7 天观察一次荧光情况。

图 9 示出了 GPC3 CAR/CNK-UT 细胞比 GPC3 CAR-T 细胞在小鼠体内具有更高效的肿瘤清除能力。

采用肝癌细胞系 HepG2-Ffluc 建模后给予 2×10⁶ 未转染 T 细胞 (左)、GPC3 CAR-T (中) 与 GPC3 CAR/CNK-UT (右), 并每周进行 IVIS 动物荧光成像系统监测肿瘤生长情况。实验结果显示: 对照 T 细胞组荧光持续增强, GPC3 CAR-T 荧光缓慢增强, 而 CNK-T001 组肿瘤荧光不断减弱直至消失, 证实了 GPC3 CAR/CNK-UT 细胞在小鼠模型中比常规 CART 细胞有更强的抗肿瘤作用。

图 10 示出了 GPC3 CAR/CNK-UT 细胞比 GPC3 CAR-T 具有高效的肿瘤清除能力。

将图 10 中的荧光成像进行定量后绘制肿瘤荧光曲线, 可见对照 T 细胞 (蓝色)、GPC3 CAR-T (红色) 均无法完全抑制肿瘤生长, 而 (绿色) 可以显著抑制肿瘤生长, 肿瘤荧光不断减弱直至消失, 证实了 GPC3 CAR/CNK-UT 细胞在小鼠模型中的抗肿瘤作用。

以上实验结果显示, 阴性对照组小鼠肿瘤逐渐增大, 在 28-42 天之间出现第一只小鼠死亡, 42 天之后相继全部死亡; 给予同型对照药 GPC3 CAR/CAR-T 细胞的同型对照组在第 14 天可见抑制肿瘤生长, 但无法完全消除肿瘤, 在第 21 天观察到肿瘤增大, 并在 28 天后与阴性对照组几乎没有差别, 全组小鼠在 42 天至 56 天之间相继死亡, 这说明单靶点 GPC3 CAR-T 仅能部分抑制肿瘤, 但不能完全清除, 更不能预防复发; 在第 14 天, 给予 GPC3 CAR/CNK-UT 细胞的 CNK-UT 组明显降低小鼠体内的肿瘤荧光信号, 至 21 天时信号完全消失, 直到观察截止时间 (第 56 天), 小鼠全部存活, 且未见肿瘤复发。说明 GPC3 CAR/CNK-UT 细胞在体内具有良好抗肿瘤活性, 其

相比有少量升高,而回输 GPC3-CAR-T 的同型对照组和对照 T 细胞的阴性对照组动物,体重随实验时间延长逐渐降低。

综合以上实验结果可知,以上结果提示,实验动物经不同方法治疗后,注射对照 T 细胞和 GPC3 CAR-T 细胞的小鼠肿瘤仍然生长,而 GPC3 CAR/CNK-UT 细胞比 GPC3 CAR-T 细胞的具有更强的杀伤力,能够在输注后的 21 天清除肿瘤细胞,且无复发。并且, GPC3 CAR/CNK-UT 回输无细胞毒性,动物的生存期延长,动物生活状况有所改善,体重增加。

8.2 CNK-UT 细胞对三阴乳腺癌细胞 MDA-MB453 的靶向杀伤和激活能力

图 11 示出了 GPC3 CAR/CNK-UT 能特异性的识别和杀伤三阴乳腺癌细胞 MDA-MB453。

T 细胞和肿瘤细胞的共培养实验,效靶比 1:5,未转染 T 细胞、常规 GPC3 CAR-T 细胞、CNK-UT 细胞和 GPC3 CAR/CNK-UT 细胞分别加入 MDA-MB453 细胞中,共培养 24h 后,所有细胞消化后进行流式细胞仪技术进行检测,通过 CD45 区别肿瘤细胞和 T 细胞,再分析 CD8 和 CD4 细胞 NK 元件 NKG2D 和表面激活标志物 CD25 的表达。

MDA-MB453 是三阴乳腺癌细胞系,细胞不表达 GPC3,因此 GPC3 CAR-T 无法对 MDA-MB453 进行清除(共培养 24h 后,体系中还存在大量 CD45 阴性的肿瘤细胞),而 CNK-UT 产品却可以高效的杀伤和清除肿瘤细胞,检测 CD45(+) T 细胞中,CD8(+)、CD4(+) T 细胞都高表达 CNK 元件 NKG2D,并上调 T 细胞的激活标志物 CD25。

8.3 CNK-UT 细胞对急性髓系白血病细胞系 THP1 的靶向杀伤和激活能力

图 12 示出了 GPC3 CAR/CNK-UT 能特异性的识别和杀伤急性髓系白血病细胞系 THP1。

T 细胞和肿瘤细胞的共培养实验,效靶比 1:5,未转染 T 细胞, GPC3 CAR-T, CNK-UT 和 GPC3 CAR/CNK-UT 分别加入 THP1 细胞中,24h 后,所有细胞消化后进行流式细胞仪技术进行检测,通过 CD3 区别肿瘤细胞和 T 细胞,再分析 CD3(-) 肿瘤细胞表面标志物 CD123、CLL1 的表达;和 CD3(+) 细胞表面激活标志物 CD25、CD137 的表达。

结果显示 THP1 是白血病细胞系,细胞不表达 GPC3,因此 GPC3 CAR-T 无法对 THP1 进行清除(共培养 24h 后,体系中还存在大量 CD3(-)、CD123(+)、CLL1(+))的肿瘤细胞,而 GPC3 CAR/CNK-UT 产品却可以高效的杀伤和清除肿瘤细胞,检测 CD3(+) T 细胞中上调 T 细胞的激活标志物 CD25 和 CD137,说明 GPC3 CAR/CNK-UT 能特异性的识别 THP1 细胞,并激活和杀伤清除肿瘤细胞。

实施例 9: NCR 元件升级的 CNK-UT 细胞对不同肿瘤的杀伤和清除能力

本实施例研究基于实施例 5 制备的 CNK-UT 细胞在通过 NCR 元件升级后对不同肿瘤的杀伤和清除能力。其中,肾细胞癌(Renal Cell Carcinoma, RCC)肿瘤细胞系 786-O 购自普诺赛(CELL-0010);肾细胞癌(Renal Cell Carcinoma, RCC)肿瘤细胞系 ACHN 购自普诺赛(CELL-0021);上皮腺瘤(Lung epithelial carcinoma)肿瘤细胞系 A549 购自普诺赛(CELL-0016);急性髓系白血病(Acute myeloid leukemia)肿瘤细胞系 UL60 购自普诺赛(CELL-0110)。

9.1 CNK-UT 细胞对 RCC 肿瘤细胞系 786-O 的识别和特异性杀伤

制备 NCR2 CAR/CNK-UT 细胞:参考实施例 3-实施例 5,全基因合成 NCR2-CD28-CD3 ζ 的核苷酸序列(SEQ ID NO. 124,其编码蛋白的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 123 所示);全基因合成 DAPI0-CD3 ζ -T2A-NKG2D-p2A-anti-TCR scFv-AdE3 的核苷酸序列,通过分子克隆的方式连接到慢病毒载体 pCDH-CMV-MCS-EF1 α -Puro,制备质粒和慢病毒后,转染 T 细胞并进行扩增培养,获得 NCR2 CAR/CNK-UT 细胞。

图 13 示出了 CNK-UT 细胞对肾细胞癌 786-O 细胞的识别,特异性杀伤和激活能力。

T 细胞和肿瘤细胞的共培养实验,取 24 孔板,计数 RCC 肿瘤细胞系 786-O 0.5×10^6 细胞/孔进行铺板,分别按效靶比 1:1 和 2:1,加入未转染 T 细胞和 NCR2 CAR/CNK-UT 细胞(NCR2-CD28-CD3 ζ ; DAPI0-CD3 ζ -T2A-NKG2D-p2A-anti-TCR scFv-AdE3),24h 后,所有细胞离心收获后,进行 7-AAD,CD45-APC-Cy5.5、CD8-APC、NKG2D-PE-Cy7、NKp44-PE、CD137-Pacific Blue(购自 Biolegend)的染色,而后进行流式细胞仪技术进行检测。实验数据表明;NCR2 CAR/CNK-UT 细胞对 786-O 细胞具有良好的杀伤功能,在 E:T=1:1 的培养体系中,经过 48h 共培养,对照组肿瘤细胞占 59.9%,同时对照 T 细胞不表达 Nkp44,不上调激活标志物 CD137;而 NCR2 CAR/CNK-UT 细胞的共培养体系中,只剩下 2.29% 的肿瘤细胞,同时 12.8% CD8+ T 细胞上调 CD137 表达;在 E:T=2:1 的培养体系中,经过 48h 共培养,对照组肿瘤细胞占 32.9%,同时对照 T 细胞不表达 Nkp44,不上调激活标志物 CD137;而 NCR2 CAR/CNK-UT 细胞的共培养体系中,只剩下 0.83% 的肿瘤细胞,而且 13.3% CD8+ T 细胞上调 CD137 表达。可见,NCR 元件升级可以进一步增加 CNK-UT 细胞对不同肿瘤的杀伤和清除能力。

9.2 CNK-UT 细胞对肾细胞癌(Renal Cell Carcinoma, RCC)肿瘤细胞系 ACHN 的识别和特异性杀伤

图 14 示出了 CNK-UT 细胞对肾细胞癌 ACHN 细胞的识别,特异性杀伤和激活能力。

T 细胞和肿瘤细胞的共培养实验,取 24 孔板,计数 RCC 细胞系 ACHN 0.5×10^6 细胞/孔进行铺板,分别按效靶比 1:1 和 2:1,加入未转染 T 细胞和 NCR2 CAR/CNK-UT 细胞(NCR2-CD28-CD3 ζ ; DAPI0-CD3 ζ -T2A-NKG2D-p2A-anti-TCR scFv-AdE3),24h 后,所有细胞离心收获后,进行 7-AAD,CD45-APC-Cy5.5、CD8-APC、NKG2D-

共培养, 对照组肿瘤细胞占 48.1%, 同时对照 T 细胞不表达 Nkp44, 不上调激活标志物 CD137; 而 NCR2 CAR/CNK-UT 细胞的共培养体系中, 只剩下 17.9% 的肿瘤细胞, 同时 32.1% CD8+ T 细胞上调 CD137 表达; 在 E:T=2:1 的培养体系中, 经过 48h 共培养, 对照组肿瘤细胞占 30.8%, 同时对照 T 细胞不表达 Nkp44, 不上调激活标志物 CD137; 而 NCR2 CAR/CNK-UT 细胞的共培养体系中, 只剩下 6.57% 的肿瘤细胞, 而且 30.4% CD8+ T 细胞上调 CD137 表达。

9.3 CNK-UT 细胞对肺上皮腺瘤 (Lung epithelial carcinoma) 肿瘤细胞系 A549 的识别和特异性杀伤

图 15 示出了 CNK-UT 细胞对肺上皮腺瘤 A549 细胞的识别, 特异性杀伤和激活能力。

T 细胞和肿瘤细胞的共培养实验, 取 24 孔板, 计数肺癌细胞系 A549 0.5×10^6 细胞/孔进行铺板, 分别按效靶比 1:1 和 2:1, 加入未转染 T 细胞和 NCR2 CAR/CNK-UT 细胞 (NCR2-CD28-CD3 ζ ; DAPI10-CD3 ζ -T2A-NKG2D-p2A-anti-TCR scFv-AdE3), 24h 后, 所有细胞离心收获后, 进行 7-AAD, CD45-APC-Cy5.5、CD8-APC、NKG2D-PE-Cy7、Nkp44-PE、CD137-Pacific Blue (购自 Biolegend) 的染色, 而后进行流式细胞仪技术进行检测。实验数据表明; NCR2 CAR/CNK-UT 细胞对 A549 肿瘤细胞具有良好的杀伤功能, 在 E:T=1:1 的培养体系中, 经过 48h 共培养, 对照组肿瘤细胞占 49.4%, 同时对照 T 细胞不表达 Nkp44, 不上调激活标志物 CD137; 而 NCR2 CAR/CNK-UT 细胞的共培养体系中, 只剩下 35.4% 的肿瘤细胞, 同时 27.4% CD8+ T 细胞上调 CD137 表达; 在 E:T=2:1 的培养体系中, 经过 48h 共培养, 对照组肿瘤细胞占 43.7%, 同时对照 T 细胞不表达 Nkp44, 不上调激活标志物 CD137; 而 NCR2 CAR/CNK-UT 细胞的共培养体系中, 只剩下 5.27% 的肿瘤细胞, 同时 34.1% CD8+ T 细胞上调 CD137 表达。

9.4 CNK-UT 细胞对急性髓系白血病 (Acute myeloid leukemia) 肿瘤细胞系 UL60 的识别和特异性杀伤

图 16 示出了 CNK-UT 细胞对 AML 细胞系 UL60 的识别, 特异性杀伤和激活能力。

T 细胞和肿瘤细胞的共培养实验, 取 24 孔板, 计数肺癌细胞系 UL60 0.5×10^6 细胞/孔进行铺板, 分别按效靶比 1:1 和 2:1, 加入未转染 T 细胞和 NCR2 CAR/CNK-UT 细胞 (NCR2-CD28-CD3 ζ ; DAPI10-CD3 ζ -T2A-NKG2D-p2A-anti-TCR scFv-AdE3), 24h 后, 所有细胞离心收获后, 进行 7-AAD, CD45-APC-Cy5.5、CD8-APC、NKG2D-PE-Cy7、Nkp44-PE、CD137-Pacific Blue (购自 Biolegend) 的染色, 而后进行流式细胞仪技术进行检测。实验数据表明; NCR2 CAR/CNK-UT 细胞对 UL60 肿瘤细胞具有良好的杀伤功能, 在 E:T=1:1 的培养体系中, 经过 48h 共培养, 对照组 CD3(-) 肿瘤细胞占 57.3%, 对照 T 细胞不表达 Nkp44, 不上调激活标志物 CD137; 而 NCR2 CAR/CNK-UT 细胞的共培养体系中, 只剩下 7.41% 的肿瘤细胞, 同时 10.6% CD8+ T 细胞上调 CD137 表达; 在 E:T=2:1 的培养体系中, 经过 48h 共培养, 对照组肿瘤细胞占 30.1%, 同时对照 T 细胞不表达 Nkp44, 不上调激活标志物 CD137; 而 NCR2 CAR/CNK-UT 细胞的共培养体系中, 只剩下 3.7% 的肿瘤细胞, 同时 8.11% CD8+ T 细胞上调 CD137 表达。

实施例 10: 优化设计 UT 元件提高 CNK-UT 细胞对肿瘤细胞系 U937 的识别和特异性杀伤

制备 CNK-UT(UL16)细胞和 CNK-UT(UL16/E3-19K)细胞: 参考实施例 3-实施例 5, 全基因合成 DAPI10-CD3 ζ -T2A-NKG2D 的核苷酸序列 (其编码蛋白的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 125 所示); 全基因合成 anti-TCR scFv-AdE3-p2A-UL16 的核苷酸序列 (其编码蛋白的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 126 所示); 全基因合成 anti-TCR scFv-AdE3-p2A-UL16-p2A-E3-19K 的核苷酸序列 (其编码蛋白的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 127 所示), 通过分子克隆的方式连接到慢病毒载体 pCDH-CMV-MCS-EF1 α -Puro, 制备质粒和慢病毒后, 转染 T 细胞并进行扩增培养, 获得 CNK-UT(UL16)细胞和 CNK-UT(UL16/E3-19K)细胞。

图 17 示出了 CNK-UT 细胞对 AML 细胞系 U937 (购自 U937, 货号 CL-0239) 的识别, 特异性杀伤和激活能力。

T 细胞和肿瘤细胞的共培养实验, 取 24 孔板, 计数肺癌细胞系 U937-GFP 0.5×10^6 细胞/孔进行铺板, 分别按效靶比 1:1, 加入未转染 T 细胞, CNK-UT(UL16)细胞(DAPI10-CD3 ζ -T2A-NKG2D; anti-TCR scFv-AdE3-p2A-UL16)和 CNK-UT(UL16/E3-19K)细胞(DAPI10-CD3 ζ -T2A-NKG2D; anti-TCR scFv-AdE3-p2A-UL16-p2A-E3-19K), 24h 后, 所有细胞离心收获后, 进行 7-AAD, CD33-APC-Cy5.5、CD8-Pacific Blue、NKG2D-APC、CD137-PE-Cy7 (购自 Biolegend) 的染色, 而后进行流式细胞仪技术进行检测。实验数据表明; CNK-UT(UL16/E3-19K)设计比 CNK-UT(UL16) 细胞对 U937 肿瘤细胞有更高效的杀伤功能, 在 E:T=1:1 的培养体系中, 经过 48h 共培养, 对照组 CD33(+) 肿瘤细胞占 69.8%, 对照 T 细胞不上调激活标志物 CD137; 而 CNK-UT(UL16)细胞的共培养体系中, 只剩下 4.69% 的 CD33+, GFP+ 肿瘤细胞, 同时 23.07% T 细胞上调 CD137 表达; 而 CNK-UT(UL16/E3-19K)细胞的共培养体系中, 只剩下 0.079% 的肿瘤细胞, 同时 54.7% T 细胞上调 CD137 表达。

实施例 11: 优化设计 NK 元件提高 CNK-UT 细胞对肿瘤细胞系

11.1 优化设计 NK 元件提高 CNK-UT 细胞对肿瘤细胞系 U937 的识别和特异性杀伤

制备 NCR1 CAR-T 细胞、NCR2 CNK-UT 细胞和 NCR1/2 CNK-UT 细胞: 参考实施例 3-实施例 5, 全基因合成 NCR1-CD28-CD3 ζ 的核苷酸序列 (其编码蛋白的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 128 所示); 全基因合成 DAPI10-CD3 ζ -T2A-NKG2D-p2A-anti-TCR scFv-AdE3 的核苷酸序列 (其编码蛋白的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 117 所示); 全基因

克隆的方式连接到慢病毒载体 pCDH-CMV-MCS-EF1 α -Puro, 制备质粒和慢病毒后, 转染 T 细胞并进行扩增培养, 获得 NCR1 CAR-T 细胞、NCR2 CNK-UT 细胞和 NCR1/2 CNK-UT 细胞。

5 图 18 示出了 CNK-UT 细胞对 AML 细胞系 U937 的识别, 特异性杀伤和激活能力。

T 细胞和肿瘤细胞的共培养实验, 取 24 孔板, 计数肺癌细胞系 U937-GFP 0.5×10^6 细胞/孔进行铺板, 分别按效靶比 1:1 和 2:1, 加入未转染 T 细胞, NCR1 CAR-T 细胞(NCR1-CD28-CD3 ζ), NCR2 CNK-UT 细胞 (DAP10-CD3 ζ -T2A-NKG2D-p2A-anti-TCR scFv-AdE3; NCR2-CD28-CD3 ζ) 和 NCR1/2 CNK-UT 细胞 (DAP10-CD3 ζ -T2A-NKG2D-p2A-anti-TCR scFv-AdE3; NCR2-CD28-CD3 ζ -p2A-NCR1-CD28-CD3 ζ), 48h 后在荧光显微镜下观察并拍照, 实验数据表明; 增加 NK 识别元件, 可显著提高 CNK-UT 细胞对 U937 肿瘤细胞的杀伤功能。

11.2 优化设计 NK 元件提高 CNK-UT 细胞对肿瘤细胞系 U937 的识别和特异性杀伤

图 19 示出了 CNK-UT 细胞对胰腺癌细胞系 PANC-1 (购自普诺赛, 货号 CL-0184) 的识别, 特异性杀伤和激活能力。

15 制备 NCR1 CAR-T 细胞、NCR2 CNK-UT 细胞和 NCR1/2 CNK-UT 细胞: 参考实施例 3-实施例 5, 全基因合成 NCR1-CD28-CD3 ζ -p2A-tEGFR 的核苷酸序列 (其编码蛋白的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 130 所示); 全基因合成 DAP10-CD3 ζ -T2A-NKG2D-p2A-anti-TCR scFv-AdE3 的核苷酸序列 (其编码蛋白的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 117 所示); 全基因合成 NCR2-CD28-CD3 ζ -p2A-tEGFR 的核苷酸序列 (其编码蛋白的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 131 所示); 全基因合成 NCR2-CD28-CD3 ζ -p2A-NCR1-CD28-CD3 ζ 的核苷酸序列 (其编码蛋白的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 129 所示), 通过分子克隆的方式连接到慢病毒载体 pCDH-CMV-MCS-EF1 α -Puro, 制备质粒和慢病毒后, 转染 T 细胞并进行扩增培养, 获得 NCR1 CAR-T 细胞、NCR2 CNK-UT 细胞和 NCR1/2 CNK-UT 细胞。

20 T 细胞和肿瘤细胞的共培养实验, 取 24 孔板, 计数胰腺癌细胞系 PANC-1-GFP 0.5×10^6 细胞/孔进行铺板, 分别按效靶比 1:1, 加入未转染 T 细胞, NCR1 CAR-T 细胞(NCR1-CD28-CD3 ζ -p2A-tEGFR), NCR2 CNK-UT 细胞 (DAP10-CD3 ζ -T2A-NKG2D-p2A-anti-TCR scFv-AdE3; NCR2-CD28-CD3 ζ -p2A-tEGFR) 和 NCR1/2 CNK-UT (DAP10-CD3 ζ -T2A-NKG2D-p2A-anti-TCR scFv-AdE3; NCR2-CD28-CD3 ζ -p2A-NCR1-CD28-CD3 ζ), 共培养 48h, 所有细胞离心收获后, 进行 7-AAD, CD33-APC-Cy5.5、CD8-Pacific Blue、NKG2D-APC、NKp44-PE or EGFR-PE, CD137-PE-Cy7 (购自 Biolegend) 的染色, 而后进行流式细胞仪技术进行检测。实验数据表明; 联合 NCR1, NCR2 CAR 设计的 CNK-UT 比 NCR2 CAR/CNK-UT 对胰腺癌 PANC-1 肿瘤细胞有更高效率的杀伤功能和激活能力。在 E:T=1:1 的培养体系中, 经过 48h 共培养, 对照组 GFP(+), CD45(-)肿瘤细胞占 65.7%, 流式计数为 6653, 对照 T 细胞不上调激活标志物 CD137; NCR1 CAR-T 细胞的共培养体系中, GFP(+), CD45(-)肿瘤细胞只占 28.3%, 流式计数为 2567, 同时 16.65 % T 细胞上调 CD137 表达; 而 NCR2 CNK-UT 细胞的共培养体系中, 只剩下 15.6% 的肿瘤细胞, 流式计数为 1368, 同时 20.89% T 细胞上调 CD137 表达。而 NCR1/2 CNK-UT 细胞的共培养体系中, 只剩下 7.71% 的肿瘤细胞, 流式计数为 662, 同时 21.9% T 细胞上调 CD137 表达。

权利要求书

1. 一种多功能复合体 (multi-functional complex)，其包含以下组件：

(1) NK 激活受体组件，其至少包含 NK 细胞激活受体或其功能变体，所述 NK 细胞激活受体包含：(a) NK 细胞激活受体胞外结构域 (ED) 或其功能变体，(b) NK 细胞激活受体跨膜结构域 (TMD) 或其功能变体，以及 (c) NK 细胞激活受体胞内结构域 (ICD) 或其功能变体；任选地，所述 NK 细胞激活受体胞外结构域或其功能变体、所述 NK 细胞激活受体跨膜结构域或其功能变体和/或所述 NK 细胞激活受体胞内结构域或其功能变体之间包含铰链或接头；

(2) CNK 信号转接组件，其至少包含 (i) NK 细胞信号转换器 (adaptor) 或其功能变体，所述 NK 细胞信号转换器包含：(a) NK 细胞信号转换器胞外结构域 (ED) 或其功能变体，(b) NK 细胞信号转换器跨膜结构域 (TMD) 或其功能变体，以及 (c) NK 细胞信号转换器胞内结构域 (ICD) 或其功能变体；任选地，所述 NK 细胞信号转换器胞外结构域或其功能变体、所述 NK 细胞信号转换器跨膜结构域或其功能变体和/或所述 NK 细胞信号转换器胞内结构域或其功能变体之间包含铰链或接头；和

(3) UT 组件，其至少包含 (i) 靶向降解 TCR、MHC 和/或 NK 细胞靶点的重组蛋白分子或其功能变体，所述靶向降解 TCR、MHC 和/或 NK 细胞靶点的重组蛋白分子包含：(a) 靶向 TCR、MHC 和/或 NK 细胞靶点的结合蛋白分子结构域或其功能变体，(b) 病毒内质网 (ER) 驻留糖蛋白的跨膜结构域或其功能变体，以及 (c) 病毒内质网驻留糖蛋白的胞质结构域或其功能变体；所述病毒内质网驻留糖蛋白的跨膜结构域或其功能变体和病毒内质网驻留糖蛋白的胞质结构域或其功能变体形成 ERAD 降解结构域；任选地，所述靶向 TCR 的结合蛋白分子结构域或其功能变体、所述病毒内质网驻留糖蛋白的跨膜结构域或其功能变体和/或所述病毒内质网驻留糖蛋白的胞质结构域或其功能变体之间包含铰链或接头；

任选地，所述 NK 激活受体组件、所述 CNK 信号转接组件和/或所述 UT 组件之间包含铰链或接头。

2. 根据权利要求 1 所述的多功能复合体，其中，所述 NK 激活受体组件中的所述 NK 细胞激活受体选自 NKG2D、NKG2C、NKG2E、NKG2F、NKG2H、CD94、KIR2DL4、KIR2DS1、KIR2DS2、KIR2DS4、KIR3DS1，天然细胞毒性受体、TRAIL、DNAM-1、CD16a、2B4、NTB-A、CRACC 以及 NKp80；优选地，所述天然细胞毒性受体选自 NKp46、NKp44 和 NKp30；

优选地，所述 NK 细胞激活受体是哺乳动物来源的 NK 细胞激活受体；优选地，所述哺乳动物选自人、灵长类动物、鼠、马、牛、绵羊、山羊、猫、猪、狗、美洲驼、羊驼、大象、松鼠、豚鼠；

优选地，所述 NK 细胞激活受体是包含不同来源 NK 细胞激活受体结构域的重组 NK 细胞激活受体；

优选地，所述 NK 细胞激活受体是人源的 NK 细胞激活受体；优选地，所述 NK 细胞激活受体是包含不同的人源 NK 细胞激活受体结构域的重组 NK 细胞激活受体；

优选地，所述 NK 细胞激活受体是鼠源的 NK 细胞激活受体；优选地，所述 NK 细胞激活受体是包含不同的鼠源 NK 细胞激活受体结构域的重组 NK 细胞激活受体；

优选地，所述 NK 细胞激活受体是包含人源和鼠源 NK 细胞激活受体结构域的重组 NK 细胞激活受体；

优选地，所述 NK 细胞激活受体的胞外结构域为人或鼠的 NK 细胞激活受体的胞外结构域；

优选地，所述 NK 细胞激活受体的跨膜结构域为人或鼠的 NK 细胞激活受体的跨膜结构域；

优选地，所述 NK 细胞激活受体的胞内结构域为人或鼠的 NK 细胞激活受体的胞内结构域；

优选地，所述 NK 细胞激活受体功能变体选自 NK 细胞激活受体的突变体，野生型融合蛋白，或野生型与突变型的融合蛋白；

优选地，人 NKG2D 的胞外域包含与 SEQ ID NO. 1 所示氨基酸序列具有 80% 或以上同一性的氨基酸序列，优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 以上同一性的氨基酸序列，更优选具有 98% 或 99% 以上同一性的氨基酸序列；人 NKG2D 的胞外域的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 1 所示；

优选地，人 NKG2D 的全长序列包含与 SEQ ID NO. 2 所示氨基酸序列具有 80% 或以上同一性的氨基酸序列，优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 以上同一性的氨基酸序列，更优选具有 98% 或 99% 以上同一性的氨基酸序列；人 NKG2D 的全长序列的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 2 所示；

优选地，小鼠 NKG2D 的胞外域包含与 SEQ ID NO. 3 所示氨基酸序列具有 80% 或以上同一性的氨基酸序列，优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 以上同一性的氨基酸序列，更优选具有 98% 或 99% 以上同一性的氨基酸序列；小鼠 NKG2D 的胞外域的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 3 所示；

优选地，小鼠 NKG2D 的全长序列包含与 SEQ ID NO. 4 所示氨基酸序列具有 80% 或以上同一性的氨基酸序列，优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 以上同一性的氨基酸序列，更优选具有 98% 或 99% 以上同一性的氨基酸序列；小鼠 NKG2D 的全长序列的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 4 所示；

优选地，人鼠重组 NKG2D 的全长序列包含与 SEQ ID NO. 5 所示氨基酸序列具有 80% 或以上同一性的氨基酸序列，优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 以上同一性的氨基酸序列，更优选具有 98% 或 99% 以上同一性的氨基酸序列；人鼠重组 NKG2D 的全长序列的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 5 所示；

优选地，人 NKG2C 的全长序列包含与 SEQ ID NO. 6 所示氨基酸序列具有 80% 或以上同一性的氨基酸序列，优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 以上同一性的氨基酸序列，更优选具有 98% 或 99% 以上同一

3. 权利要求 1 或 2 所述的多功能复合物, 其中, 所述 CNK 信号转接组件中的所述 NK 细胞信号转换器为

DAPI10 或 DAPI12;

优选地, 所述 NK 细胞信号转换器是哺乳动物来源的 NK 细胞信号转换器; 优选地, 所述哺乳动物选自人、灵长类动物、鼠、马、牛、绵羊、山羊、猫、猪、狗、美洲驼、羊驼、大象、松鼠、豚鼠;

优选地, 所述 NK 细胞信号转换器是包含不同来源 NK 细胞信号转换器结构域的重组 NK 细胞信号转换器;

优选地, 所述 NK 细胞信号转换器是人源的 NK 细胞信号转换器; 优选地, 所述 NK 细胞信号转换器是包含不同的人源 NK 细胞信号转换器结构域的重组 NK 细胞信号转换器;

优选地, 所述 NK 细胞信号转换器是鼠源的 NK 细胞信号转换器; 优选地, 所述 NK 细胞信号转换器是包含不同的鼠源 NK 细胞信号转换器结构域的重组 NK 细胞信号转换器;

优选地, 所述 NK 细胞信号转换器是包含人源和鼠源 NK 细胞信号转换器结构域的重组 NK 细胞信号转换器;

优选地, 所述 NK 细胞信号转换器的胞外结构域为人或鼠的 NK 细胞信号转换器的胞外结构域;

优选地, 所述 NK 细胞信号转换器的跨膜结构域为人或鼠的 NK 细胞信号转换器的跨膜结构域;

优选地, 所述 NK 细胞信号转换器的胞内结构域为人或鼠的 NK 细胞信号转换器的胞内结构域;

所述 CNK 细胞信号转换器功能变体选自 DAPI10 突变体或 DAPI12 的突变体, 或 DAPI10 和 DAPI12 的融合蛋白, 或野生型 DAPI10 或 DAPI12 与突变型 DAPI10 或 DAPI12 的融合蛋白;

优选地, 所述 CNK 信号转接组件还包含 (ii) 免疫受体活化信号传导结构域 (ITAM) 和/或 (iii) T 细胞共刺激信号传导结构域;

优选地, 所述 NK 细胞信号转换器或其功能变体、所述免疫受体活化信号传导结构域 (ITAM) 和/或所述 T 细胞共刺激信号传导结构域之间包含铰链或接头; 优选地, 所述 NK 细胞信号转换器或其功能变体与所述免疫受体活化信号传导结构域 (ITAM) 域融合;

优选地, 所述免疫受体活化信号传导结构域 (ITAM) 来自免疫受体的胞内激活信号传导结构域; 优选地, 所述免疫受体选自 TCR ζ 、CD2、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD3 ζ 、CD5、CD22、Fc γ R γ 、CD66d、Fc α RI、Fc γ RI、Fc γ RII、Fc γ RIII、Dectin-1、CLEC-1、CD72、CD79A、CD79B; 优选地, 所述免疫受体活化信号传导结构域 (ITAM) 与 NK 细胞信号转换器或其功能变体融合; 优选地, 所述免疫受体是 CD3 ζ ;

优选地, 所述 T 细胞共刺激信号传导结构域来自共刺激分子的胞内信号结构域; 优选地, 所述共刺激分子选自 MHC I 类分子、TNF 受体蛋白、免疫球蛋白样蛋白质、细胞因子受体、整联蛋白、淋巴细胞活化信号分子 (SLAM 蛋白)、活化 NK 细胞受体、BTLA、Toll 配体受体、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、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、DAPI10、DAPI12、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、与 CD83 特异性结合的配体、CARD11、FcRa、FcRp、FcRy、Fyn、HVEM、ICOS、Lck、LAG3、LAT、LRP、NOTCH1、Wnt、OX40、ROR2、Ryk、SLAMF1、Slp76、pTa、TCRa、TCRp、TRIM、ZAP70、PTCH2;

优选地, 人 DAPI10 的全长序列包含与 SEQ ID NO. 25 所示氨基酸序列具有 80%或以上同一性的氨基酸序列, 优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或以上同一性的氨基酸序列, 更优选具有 98%或 99%或以上同一性的氨基酸序列; 人 DAPI10 的全长序列的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 25 所示;

优选地, 人 DAPI10 的全长序列包含与 SEQ ID NO. 26 所示氨基酸序列具有 80%或以上同一性的氨基酸序列, 优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或以上同一性的氨基酸序列, 更优选具有 98%或 99%或以上同一性的氨基酸序列; 人 DAPI10 的全长序列的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 26 所示;

优选地, 人 DAPI10 的跨膜结构域包含与 SEQ ID NO. 27 所示氨基酸序列具有 80%或以上同一性的氨基酸序列, 优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或以上同一性的氨基酸序列, 更优选具有 98%或 99%或以上同一性的氨基酸序列; 人 DAPI10 的跨膜结构域的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 27 所示;

优选地, 人 DAPI12 的全长序列包含与 SEQ ID NO. 28 所示氨基酸序列具有 80%或以上同一性的氨基酸序列, 优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或以上同一性的氨基酸序列, 更优选具有 98%或 99%或以上同一性的氨基酸序列; 人 DAPI12 的全长序列的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 28 所示;

优选地, 人 DAPI12 的跨膜结构域包含与 SEQ ID NO. 29 所示氨基酸序列具有 80%或以上同一性的氨基酸序列, 优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或以上同一性的氨基酸序列, 更优选具有 98%或 99%或以上同一性的氨基酸序列; 人 DAPI12 的跨膜结构域的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 29 所示;

优选地, 人 DAPI10 和人 DAPI12 的跨膜结构域融合蛋白包含与 SEQ ID NO. 30 所示氨基酸序列具有 80%或以上同一性的氨基酸序列, 优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或以上同一性的氨基酸序列, 更优选具有 98%或 99%或以上同一性的氨基酸序列; 人 DAPI10 和人 DAPI12 的跨膜结构域的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 30 所示;

优选地,人 DAPI0-DAP12 融合蛋白序列包含与 SEQ ID NO. 31 所示氨基酸序列具有 80%或以上同一性的氨基酸序列,优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一性的氨基酸序列,更优选具有 98%或 99%以上同一性的氨基酸序列;人 DAPI0-DAP12 融合蛋白序列的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 31 所示;

优选地,人 CD3zeta 胞内信号传导结构域序列包含与 SEQ ID NO. 32 所示氨基酸序列具有 80%或以上同一性的氨基酸序列,优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一性的氨基酸序列,更优选具有 98%或 99%以上同一性的氨基酸序列;人 CD3zeta 胞内信号传导结构域序列的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 32 所示;

优选地,人 DAPI0-CD3zeta 序列包含与 SEQ ID NO. 33 所示氨基酸序列具有 80%或以上同一性的氨基酸序列,优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一性的氨基酸序列,更优选具有 98%或 99%以上同一性的氨基酸序列;人 DAPI0-CD3zeta 序列的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 33 所示;

优选地,人 DAPI2-CD3zeta 序列包含与 SEQ ID NO. 34 所示氨基酸序列具有 80%或以上同一性的氨基酸序列,优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一性的氨基酸序列,更优选具有 98%或 99%以上同一性的氨基酸序列;人 DAPI2-CD3zeta 序列的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 34 所示;

优选地,人 DAPI0-DAP12-CD3zeta 序列包含与 SEQ ID NO. 35 所示氨基酸序列具有 80%或以上同一性的氨基酸序列,优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一性的氨基酸序列,更优选具有 98%或 99%以上同一性的氨基酸序列;人 DAPI0-DAP12-CD3zeta 序列的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 35 所示;

优选地,人 41BB 胞内信号传导结构域序列包含与 SEQ ID NO. 36 所示氨基酸序列具有 80%或以上同一性的氨基酸序列,优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一性的氨基酸序列,更优选具有 98%或 99%以上同一性的氨基酸序列;人 41BB 胞内信号传导结构域序列的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 36 所示;

优选地,人 DAPI0-41BB 序列包含与 SEQ ID NO. 37 所示氨基酸序列具有 80%或以上同一性的氨基酸序列,优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一性的氨基酸序列,更优选具有 98%或 99%以上同一性的氨基酸序列;人 DAPI0-41BB 序列的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 37 所示;

优选地,人 DAPI0-41BB-CD3zeta 序列包含与 SEQ ID NO. 38 所示氨基酸序列具有 80%或以上同一性的氨基酸序列,优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一性的氨基酸序列,更优选具有 98%或 99%以上同一性的氨基酸序列;人 DAPI0-41BB-CD3zeta 序列的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 38 所示;

优选地,人 CD28 胞内信号传导结构域序列包含与 SEQ ID NO. 39 所示氨基酸序列具有 80%或以上同一性的氨基酸序列,优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一性的氨基酸序列,更优选具有 98%或 99%以上同一性的氨基酸序列;人 CD28 胞内信号传导结构域序列的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 39 所示;

优选地,人 DAPI0-CD28 序列包含与 SEQ ID NO. 40 所示氨基酸序列具有 80%或以上同一性的氨基酸序列,优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一性的氨基酸序列,更优选具有 98%或 99%以上同一性的氨基酸序列;人 DAPI0-CD28 序列的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 40 所示;

优选地,人 DAPI0-CD28-CD3zeta 序列包含与 SEQ ID NO. 41 所示氨基酸序列具有 80%或以上同一性的氨基酸序列,优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一性的氨基酸序列,更优选具有 98%或 99%以上同一性的氨基酸序列;人 DAPI0-CD28-CD3zeta 序列的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 41 所示;

优选地,人 DAPI2-41BB 序列包含与 SEQ ID NO. 42 所示氨基酸序列具有 80%或以上同一性的氨基酸序列,优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一性的氨基酸序列,更优选具有 98%或 99%以上同一性的氨基酸序列;人 DAPI2-41BB 序列的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 42 所示;

优选地,人 DAPI2-41BB-CD3zeta 序列包含与 SEQ ID NO. 43 所示氨基酸序列具有 80%或以上同一性的氨基酸序列,优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一性的氨基酸序列,更优选具有 98%或 99%以上同一性的氨基酸序列;人 DAPI2-41BB-CD3zeta 序列的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 43 所示;

优选地,人 DAPI2-CD28 序列包含与 SEQ ID NO. 44 所示氨基酸序列具有 80%或以上同一性的氨基酸序列,优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一性的氨基酸序列,更优选具有 98%或 99%以上同一性的氨基酸序列;人 DAPI2-CD28 序列的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 44 所示;

优选地,人 DAPI2-CD28-CD3zeta 序列包含与 SEQ ID NO. 45 所示氨基酸序列具有 80%或以上同一性的氨基酸序列,优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一性的氨基酸序列,更优选具有 98%或 99%以上同一性的氨基酸序列;人 DAPI2-CD28-CD3zeta 序列的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 45 所示。

4. 根据权利要求 1-3 任一项所述的多功能复合体,其中,在所述 UT 组件的靶向降解 TCR 的重组蛋白分子中,所述靶向 TCR 的结合蛋白分子结构域或其功能变体来自 TCR 抗体或其功能片段或其组合;

优选地,所述抗体选自 TCR α 抗体、TCR β 抗体、TCR $\alpha\beta$ 抗体、TCR γ 抗体、TCR δ 抗体、TCR $\gamma\delta$ 抗体、TCR V δ 2 抗体、TCR C β 1 抗体;所述抗体的功能片段选自 Fd、Fv、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv(scFv)、单链抗体(scFv)或纳米抗体(nanobody)、双链抗体、三链抗体和四链抗体;优选地,所述 TCR 抗体是 TCR 单链抗体;优选地,所述 TCR 单链抗体的氨基酸序列包含与 SEQ ID NO. 116 所示氨基酸序列具有 80%或以上同一性的氨基酸序列,优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一性的氨基酸序列,更优选具有 98%或 99%以上同一性的氨基酸序列;所述 TCR 单链抗体的全长序列的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 116 所示;

优选地,所述 UT 组件中的 ERAD 降解结构域来自 HCMV 糖蛋白 US2、US3、US11 或 US10、腺病毒 E3-19K 或 HHV-7 US21;

优选地,所述 HCMV 糖蛋白 US2 的全长序列包含与 SEQ ID NO. 46 所示氨基酸序列具有 80%或以上同一性的

优选地, 所述 HHV-7 US21 的全长序列包含与 SEQ ID NO. 61 所示氨基酸序列具有 80%或以上同一性的氨基酸序列, 优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一性的氨基酸序列, 更优选具有 98%或 99%

以上同一性的氨基酸序列；所述 HHV-7 US21 的全长序列的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 61 所示；

优选地，所述 HHV-7 US21 的 MHC 结合结构域包含与 SEQ ID NO. 62 所示氨基酸序列具有 80%或以上同一性的氨基酸序列，优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一性的氨基酸序列，更优选具有 98%或 99%以上同一性的氨基酸序列；所述 HHV-7 US21 的 MHC 结合结构域的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 62 所示；

优选地，所述 HHV-7 US21 的 ERAD 降解结构域包含与 SEQ ID NO. 63 所示氨基酸序列具有 80%或以上同一性的氨基酸序列，优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一性的氨基酸序列，更优选具有 98%或 99%以上同一性的氨基酸序列；所述 HHV-7 US21 的 ERAD 降解结构域的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 63 所示。

5. 根据权利要求 1-4 任一项所述的多功能复合体，其中，所述 UT 组件还包含 (ii) 靶向 MHC I 和/或 MHC II 的结合蛋白分子结构域或其功能变体；

优选地，所述靶向 MHC I 和/或 MHC II 的结合蛋白分子结构域或其功能变体为靶向 HLA 的结合蛋白分子结构域或其功能变体；

优选地，所述靶向 MHC I 和/或 MHC II 的结合蛋白分子结构域或其功能变体来自抑制 MHC 分子表达或促进其降解的病毒内质网蛋白；优选地，所述病毒内质网糖蛋白选自 HCMV US6、HSV ICP47、CPXV012、HPV E6/E7、EBV BNFL2a 或 BHV UL49.5；优选地，所述靶向 MHC I 和/或 MHC II 的结合蛋白分子结构域或其功能变体包含 TAP 结合结构域；

优选地，所述 HCMV US6 的全长序列包含与 SEQ ID NO. 64 所示氨基酸序列具有 80%或以上同一性的氨基酸序列，优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一性的氨基酸序列，更优选具有 98%或 99%以上同一性的氨基酸序列；所述 HCMV US6 的全长序列的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 64 所示；

优选地，所述 HHV-7 US6 的 TAP 结合结构域包含与 SEQ ID NO. 65 所示氨基酸序列具有 80%或以上同一性的氨基酸序列，优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一性的氨基酸序列，更优选具有 98%或 99%以上同一性的氨基酸序列；所述 HHV-7 US6 的 TAP 结合结构域的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 65 所示；

优选地，所述 HSV ICP47 的全长序列包含与 SEQ ID NO. 66 所示氨基酸序列具有 80%或以上同一性的氨基酸序列，优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一性的氨基酸序列，更优选具有 98%或 99%以上同一性的氨基酸序列；所述 HSV ICP47 的全长序列的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 66 所示；

优选地，所述 HSV ICP47 的 TAP 结合结构域包含与 SEQ ID NO. 67 所示氨基酸序列具有 80%或以上同一性的氨基酸序列，优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一性的氨基酸序列，更优选具有 98%或 99%以上同一性的氨基酸序列；所述 HSV ICP47 的 TAP 结合结构域的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 67 所示；

优选地，所述 CPXV012 的全长序列包含与 SEQ ID NO. 68 所示氨基酸序列具有 80%或以上同一性的氨基酸序列，优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一性的氨基酸序列，更优选具有 98%或 99%以上同一性的氨基酸序列；所述 CPXV012 的全长序列的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 68 所示；

优选地，所述 CPXV012 的 TAP 结合结构域包含与 SEQ ID NO. 69 所示氨基酸序列具有 80%或以上同一性的氨基酸序列，优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一性的氨基酸序列，更优选具有 98%或 99%以上同一性的氨基酸序列；所述 CPXV012 的 TAP 结合结构域的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 69 所示；

优选地，所述 EBV BNFL2a 的全长序列包含与 SEQ ID NO. 70 所示氨基酸序列具有 80%或以上同一性的氨基酸序列，优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一性的氨基酸序列，更优选具有 98%或 99%以上同一性的氨基酸序列；所述 EBV BNFL2a 的全长序列的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 70 所示；

优选地，所述 EBV BNFL2a 的 TAP 结合结构域包含与 SEQ ID NO. 71 所示氨基酸序列具有 80%或以上同一性的氨基酸序列，优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一性的氨基酸序列，更优选具有 98%或 99%以上同一性的氨基酸序列；所述 EBV BNFL2a 的 TAP 结合结构域的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 71 所示；

优选地，所述 BHV UL49.5 的全长序列包含与 SEQ ID NO. 72 所示氨基酸序列具有 80%或以上同一性的氨基酸序列，优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一性的氨基酸序列，更优选具有 98%或 99%以上同一性的氨基酸序列；所述 BHV UL49.5 的全长序列的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 72 所示；

优选地，所述 BHV UL49.5 的 TAP 结合结构域包含与 SEQ ID NO. 73 所示氨基酸序列具有 80%或以上同一性的氨基酸序列，优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一性的氨基酸序列，更优选具有 98%或 99%以上同一性的氨基酸序列；所述 BHV UL49.5 的 TAP 结合结构域的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 73 所示；

优选地，所述靶向 MHC I 和/或 MHC II 的结合蛋白分子结构域或其功能变体来自降解 MHC 和/或 MHC II 分子的病毒糖蛋白；优选地，病毒糖蛋白选自 HCMV 糖蛋白 US2、US3、US11 或 US10、腺病毒 E3-19K 或 HHV-7 US21；

优选地，所述 US2 的全长序列包含与 SEQ ID NO. 74 所示氨基酸序列具有 80%或以上同一性的氨基酸序列，优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一性的氨基酸序列，更优选具有 98%或 99%以上同一性的氨基酸序列；所述 US2 的全长序列的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 74 所示；

优选地，所述 US2 的 HLA 结合结构域包含与 SEQ ID NO. 75 所示氨基酸序列具有 80%或以上同一性的氨基酸序列，优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一性的氨基酸序列，更优选具有 98%或 99%以上同一性的氨基酸序列；所述 US2 的 HLA 结合结构域的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 75 所示；

优选地，所述 US2 的 ERAD 降解结构域包含与 SEQ ID NO. 76 所示氨基酸序列具有 80%或以上同一性的氨基

酸序列, 优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 以上同一性的氨基酸序列, 更优选具有 98% 或 99% 以上同一性的氨基酸序列; 所述 US2 的 ERAD 降解结构域的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 76 所示;

优选地, 所述 US3 的全长序列包含与 SEQ ID NO. 77 所示氨基酸序列具有 80% 或以上同一性的氨基酸序列, 优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 以上同一性的氨基酸序列, 更优选具有 98% 或 99% 以上同一性的氨基酸序列; 所述 US3 的全长序列的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 77 所示;

优选地, 所述 US3 的 HLA 结合结构域包含与 SEQ ID NO. 78 所示氨基酸序列具有 80% 或以上同一性的氨基酸序列, 优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 以上同一性的氨基酸序列, 更优选具有 98% 或 99% 以上同一性的氨基酸序列; 所述 US3 的 HLA 结合结构域的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 78 所示;

优选地, 所述 US3 的 ERAD 降解结构域包含与 SEQ ID NO. 79 所示氨基酸序列具有 80% 或以上同一性的氨基酸序列, 优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 以上同一性的氨基酸序列, 更优选具有 98% 或 99% 以上同一性的氨基酸序列; 所述 US3 的 ERAD 降解结构域的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 79 所示;

优选地, 所述 US11 的全长序列包含与 SEQ ID NO. 80 所示氨基酸序列具有 80% 或以上同一性的氨基酸序列, 优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 以上同一性的氨基酸序列, 更优选具有 98% 或 99% 以上同一性的氨基酸序列; 所述 US11 的全长序列的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 80 所示;

优选地, 所述 US11 的 HLA 结合结构域包含与 SEQ ID NO. 81 所示氨基酸序列具有 80% 或以上同一性的氨基酸序列, 优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 以上同一性的氨基酸序列, 更优选具有 98% 或 99% 以上同一性的氨基酸序列; 所述 US11 的 HLA 结合结构域的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 81 所示;

优选地, 所述 US11 的 ERAD 降解结构域包含与 SEQ ID NO. 82 所示氨基酸序列具有 80% 或以上同一性的氨基酸序列, 优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 以上同一性的氨基酸序列, 更优选具有 98% 或 99% 以上同一性的氨基酸序列; 所述 US11 的 ERAD 降解结构域的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 82 所示;

优选地, 所述靶向 MHC I 和/或 MHC II 的结合蛋白分子结构域或其功能变体还包含定向抑制或降解 MICA、MICB、ULBP1、ULBP2、ULBP3、ULBP4、ULBP5 或 ULBP6 的 NK 靶点蛋白的病毒蛋白; 优选地, 所述病毒蛋白选自 HCMV UL16、UL141、UL142 或腺病毒 E3-19K;

优选地, 所述 HCMV UL16 的全长序列包含与 SEQ ID NO. 83 所示氨基酸序列具有 80% 或以上同一性的氨基酸序列, 优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 以上同一性的氨基酸序列, 更优选具有 98% 或 99% 以上同一性的氨基酸序列; 所述 HCMV UL16 的全长序列的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 83 所示;

优选地, 所述 HCMV UL16 的 NK 靶点蛋白结合结构域包含与 SEQ ID NO. 84 所示氨基酸序列具有 80% 或以上同一性的氨基酸序列, 优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 以上同一性的氨基酸序列, 更优选具有 98% 或 99% 以上同一性的氨基酸序列; 所述 HCMV UL16 的 NK 靶点蛋白结合结构域的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 84 所示;

优选地, 所述 HCMV UL16 的 ERAD 降解结构域包含与 SEQ ID NO. 85 所示氨基酸序列具有 80% 或以上同一性的氨基酸序列, 优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 以上同一性的氨基酸序列, 更优选具有 98% 或 99% 以上同一性的氨基酸序列; 所述 HCMV UL16 的 ERAD 降解结构域的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 85 所示;

优选地, 所述 HCMV UL141 的全长序列包含与 SEQ ID NO. 86 所示氨基酸序列具有 80% 或以上同一性的氨基酸序列, 优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 以上同一性的氨基酸序列, 更优选具有 98% 或 99% 以上同一性的氨基酸序列; 所述 HCMV UL141 的全长序列的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 86 所示;

优选地, 所述 HCMV UL141 的 NK 靶点蛋白结合结构域包含与 SEQ ID NO. 87 所示氨基酸序列具有 80% 或以上同一性的氨基酸序列, 优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 以上同一性的氨基酸序列, 更优选具有 98% 或 99% 以上同一性的氨基酸序列; 所述 HCMV UL141 的 NK 靶点蛋白结合结构域的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 87 所示;

优选地, 所述 HCMV UL141 的 ERAD 降解结构域包含与 SEQ ID NO. 88 所示氨基酸序列具有 80% 或以上同一性的氨基酸序列, 优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 以上同一性的氨基酸序列, 更优选具有 98% 或 99% 以上同一性的氨基酸序列; 所述 HCMV UL141 的 ERAD 降解结构域的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 88 所示;

优选地, 所述 HCMV UL142 的全长序列包含与 SEQ ID NO. 89 所示氨基酸序列具有 80% 或以上同一性的氨基酸序列, 优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 以上同一性的氨基酸序列, 更优选具有 98% 或 99% 以上同一性的氨基酸序列; 所述 HCMV UL142 的全长序列的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 89 所示;

优选地, 所述 HCMV UL142 的 MICA、ULBP3 结合结构域包含与 SEQ ID NO. 90 所示氨基酸序列具有 80% 或以上同一性的氨基酸序列, 优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 以上同一性的氨基酸序列, 更优选具有 98% 或 99% 以上同一性的氨基酸序列; 所述 HCMV UL142 的 MICA、ULBP3 结合结构域的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 90 所示;

优选地, 所述 HCMV UL142 的高尔基驻留结构域包含与 SEQ ID NO. 91 所示氨基酸序列具有 80% 或以上同一性的氨基酸序列, 优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 以上同一性的氨基酸序列, 更优选具有 98% 或 99% 以上同一性的氨基酸序列; 所述 HCMV UL142 的高尔基驻留结构域的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 91 所示;

优选地,所述靶向 MHC I 和/或 MHC II 的结合蛋白分子结构域或其功能变体还包含把 MHC I 分子从高尔基体转运到溶酶体进行降解的病毒蛋白;优选地,所述病毒蛋白选自 HIV Nef、HIV Vpu、HHV-7 U21、HHV-8 KK3、HHV-8 KK5、MHV-68 MK3 和 HTLV-1 p12;

优选地,所述 HIV Nef 包含与 SEQ ID NO. 92 所示氨基酸序列具有 80%或以上同一性的氨基酸序列,优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一性的氨基酸序列,更优选具有 98%或 99%以上同一性的氨基酸序列;所述 HIV Nef 的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 92 所示;

优选地,所述 HIV Vpu 包含与 SEQ ID NO. 93 所示氨基酸序列具有 80%或以上同一性的氨基酸序列,优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一性的氨基酸序列,更优选具有 98%或 99%以上同一性的氨基酸序列;所述 HIV Vpu 的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 93 所示;

优选地,所述 HHV-8 KK3 包含与 SEQ ID NO. 94 所示氨基酸序列具有 80%或以上同一性的氨基酸序列,优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一性的氨基酸序列,更优选具有 98%或 99%以上同一性的氨基酸序列;所述 HHV-8 KK3 的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 94 所示;

优选地,所述 HHV-8 KK5 包含与 SEQ ID NO. 95 所示氨基酸序列具有 80%或以上同一性的氨基酸序列,优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一性的氨基酸序列,更优选具有 98%或 99%以上同一性的氨基酸序列;所述 HHV-8 KK5 的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 95 所示;

优选地,所述 MHV-68 MK3 包含与 SEQ ID NO. 96 所示氨基酸序列具有 80%或以上同一性的氨基酸序列,优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一性的氨基酸序列,更优选具有 98%或 99%以上同一性的氨基酸序列;所述 MHV-68 MK3 的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 96 所示;

优选地,所述 HTLV-1 p12 包含与 SEQ ID NO. 97 所示氨基酸序列具有 80%或以上同一性的氨基酸序列,优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一性的氨基酸序列,更优选具有 98%或 99%以上同一性的氨基酸序列;所述 HTLV-1 p12 的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 97 所示;

优选地,所述靶向 MHC I 和/或 MHC II 的结合蛋白分子结构域或其功能变体还包含介导 MHC-多肽分子从高尔基体返回内质网并促进其降解的病毒蛋白;优选地,所述病毒蛋白包含 MHC 结合结构和 KDEL receptor 结合结构域;优选地,所述病毒蛋白是 Cowpox Virus 蛋白 CPXV203

所述 UT 组件还包含病毒功能蛋白的 MHC 结合结构和 KDEL receptor 结合结构域,介导 MHC-多肽分子从高尔基体返回内质网,并促进其降解,如牛痘病毒蛋白 CPXV203;

优选地,所述牛痘病毒蛋白 CPXV203 的全长序列包含与 SEQ ID NO. 98 所示氨基酸序列具有 80%或以上同一性的氨基酸序列,优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一性的氨基酸序列,更优选具有 98%或 99%以上同一性的氨基酸序列;所述牛痘病毒蛋白 CPXV203 的全长序列的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 98 所示;

优选地,所述牛痘病毒蛋白 CPXV203 的 MHC 结合结构域包含与 SEQ ID NO. 99 所示氨基酸序列具有 80%或以上同一性的氨基酸序列,优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一性的氨基酸序列,更优选具有 98%或 99%以上同一性的氨基酸序列;所述牛痘病毒蛋白 CPXV203 的 MHC 结合结构域的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 99 所示;

优选地,所述牛痘病毒蛋白 CPXV203 的 KDEL 受体结合结构域包含与 SEQ ID NO. 100 所示氨基酸序列具有 80%或以上同一性的氨基酸序列,优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一性的氨基酸序列,更优选具有 98%或 99%以上同一性的氨基酸序列;所述牛痘病毒蛋白 CPXV203 的 KDEL 受体结合结构域的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 100 所示;

优选地,所述牛痘病毒蛋白 CPXV203 的全长序列包含与 SEQ ID NO. 101 所示氨基酸序列具有 80%或以上同一性的氨基酸序列,优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一性的氨基酸序列,更优选具有 98%或 99%以上同一性的氨基酸序列;所述牛痘病毒蛋白 CPXV203 的全长序列的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 101 所示;

优选地,所述牛痘病毒蛋白 CPXV203 的 MHC 结合结构域包含与 SEQ ID NO. 102 所示氨基酸序列具有 80%或以上同一性的氨基酸序列,优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一性的氨基酸序列,更优选具有 98%或 99%以上同一性的氨基酸序列;所述牛痘病毒蛋白 CPXV203 的 MHC 结合结构域的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 102 所示;

优选地,所述牛痘病毒蛋白 CPXV203 的 KDEL 受体结合结构域包含与 SEQ ID NO. 103 所示氨基酸序列具有 80%或以上同一性的氨基酸序列,优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一性的氨基酸序列,更优选具有 98%或 99%以上同一性的氨基酸序列;所述牛痘病毒蛋白 CPXV203 的 KDEL 受体结合结构域的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 103 所示。

6. 根据权利要求 1-5 任一项所述的多功能复合体,其中,所述多功能复合体还包含组件(4)复合型转接器(Chimeric adaptor)组件和/或靶向杀伤肿瘤细胞受体组件;

所述(4)复合型转接器包含:(i)靶向肿瘤的胞外识别结构域;(ii)跨膜结构域;和(iii)胞内信号传导结构域;任选地,所述靶向肿瘤的胞外识别结构域、跨膜结构域和/或胞内信号结构域之间包含铰链或接头;

优选地,所述复合型转接器组件的靶向肿瘤的胞外识别结构域选自肿瘤抗原特异结合结构域、肿瘤微环境靶抗原结合结构域和/或靶向肿瘤微环境的趋化受体;

优选地,所述靶向肿瘤的胞外识别结构域选自能靶向识别肿瘤相关抗原的抗体或其功能片段、TCR 或其组合;所述抗体的功能片段选自 Fd、Fv、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv(scFv)、单链抗体(scFv)或纳米抗体(nanobody)、双链抗体、三链抗体和四链抗体;

优选地,所述复合型转接器组件的跨膜结构域选自 NK 细胞激活受体跨膜结构域、DAP10 跨膜结构域、DAP12 跨膜结构域、CD8 跨膜结构域、CD28 跨膜结构域、CD4 跨膜结构域、4-1BB 跨膜结构域、OX40 跨膜结构域、ICOS 跨膜结构域、CTLA-4 跨膜结构域、PD-1 跨膜结构域、LAG-3 跨膜结构域、2B4 跨膜结构域和 BTLA 跨膜结构域以及其组合;优选地,所述 NK 细胞激活受体选自 NKG2D、NKG2C、NKG2E、NKG2F、NKG2H、CD94、KIR2DL4、KIR2DS1、KIR2DS2、KIR2DS4、KIR3DS1,天然细胞毒性受体、TRAIL、DNAM-1、CD16a、2B4、NTB-A、CRACC 以及 NKp80;优选地,所述天然细胞毒性受体选自 NKp46、NKp44 和 NKp30;

优选地,所述复合型转接器组件的胞内信号传导结构域包括 NK 细胞激活受体的胞内信号结构域和/或共刺激信号传导结构域;

优选地,所述 NK 细胞激活受体选自 NKG2D、NKG2C、NKG2E、NKG2F、NKG2H、CD94、KIR2DL4、KIR2DS1、KIR2DS2、KIR2DS4、KIR3DS1,天然细胞毒性受体、TRAIL、DNAM-1、CD16a、2B4、NTB-A、CRACC 以及 NKp80;

优选地,所述胞内信号结构域还包括共刺激信号传导结构域;优选地,所述共刺激信号传导结构域选自 T 细胞共刺激信号传导结构域;包括,但不限于衍生自 MHC I 类分子、TNF 受体蛋白、免疫球蛋白样蛋白质、细胞因子受体、整合蛋白、淋巴细胞活化信号分子(SLAM 蛋白)、活化 NK 细胞受体、BTLA、Toll 配体受体、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、CD100(SEMA4D)、CD69、SLAMF6(NTB-A、Ly108)、SLAM(SLAMF1、CD150、IPO-3)、BLAME(SLAMF8)、SELPLG(CD162)、LTBR、LAT、GADS、SLP-76、PAG/Cbp、CD19a 和与 CD83 特异性结合的配体、CARD11、FcRa、FcR β 、FcR γ 、Fyn、HVEM、ICOS、Lck、LAG3、LAT、LRP、NOTCH1、Wnt、OX40、ROR2、Ryk、SLAMF1、Slp76、pTa、TCRa、TCRp、TRIM、ZAP70、PTCH2 等胞内信号结构域;更优选地,所述共刺激信号传导结构域选自 NKG2D 胞内信号结构域、DAP10 胞内信号结构域、DAP12 胞内信号结构域、NCR 胞内信号结构域、CD28 胞内信号结构域、4-1BB 胞内信号结构域、OX40 胞内信号结构域、ICOS 胞内信号结构域;

所述靶向杀伤肿瘤细胞受体组件包含(i)靶向肿瘤抗原的胞外识别结构域;(ii)跨膜结构域;和(iii)胞内共刺激信号传导结构域;(iv)T 细胞活化信号传导结构域(ITAM);任选地,所述靶向肿瘤抗原的胞外识别结构域、跨膜结构域、胞内共刺激信号传导结构域和/或 T 细胞活化信号传导结构域(ITAM)之间包含铰链或接头;

所述靶向杀伤肿瘤细胞受体组件的跨膜结构域选自 CD8 跨膜结构域、T 细胞受体的 α 和/或 β 链跨膜结构域、CD28 跨膜结构域、CD3 ϵ 跨膜结构域、CD45 跨膜结构域、CD4 跨膜结构域、CD5 跨膜结构域、CD8 跨膜结构域、CD9 跨膜结构域、CD16 跨膜结构域、CD22 跨膜结构域、CD33 跨膜结构域、CD37 跨膜结构域、CD64 跨膜结构域、CD80 跨膜结构域、CD86 跨膜结构域、CD134 跨膜结构域、CD137 跨膜结构域、CD154 跨膜结构域、GITR 跨膜结构域以及其组合

所述 T 细胞活化信号传导结构域衍生自 CD3 ζ 、共同 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 和 DAP12 等胞内信号结构域;

优选地,所述接头是柔性接头;优选地,所述柔性接头包含所示的氨基酸序列(Gly(x)Ser(y))_n,其中 n 是 1 到 10 的整数,并且 x 和 y 独立地是 0 到 10 的整数,前提是 x 和 y 不都是 0;更优选地,所述接头是 SEQ ID NO. 104 所示的氨基酸序列(Gly4Ser)₂或 SEQ ID NO. 105 所示的氨基酸序列(Gly3Ser)₂;

优选地,所述接头是铰链;优选地,所述铰链是 IgG1 铰链或 IgG4 铰链;

优选地,所述 IgG1 铰链包含与 SEQ ID NO. 106 所示氨基酸序列具有 80%或以上同一性的氨基酸序列,优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一性的氨基酸序列,更优选具有 98%或 99%以上同一性的氨基酸序列;所述 IgG1 铰链的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 106 所示;

优选地,所述 IgG4 铰链包含与 SEQ ID NO. 107 所示氨基酸序列具有 80%或以上同一性的氨基酸序列,优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一性的氨基酸序列,更优选具有 98%或 99%以上同一性的氨基酸序列;所述 IgG4 铰链的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 107 所示;

优选地,所述 NK 激活受体组件、CNK 信号转接组件和/或 UT 组件之间包含可切割肽;所述可切割肽为 T2A 肽、GSG-T2A 肽、E2A 肽、GSG-E2A 肽、F2A 肽、GSG-F2A 肽、P2A 肽或 GSG-P2A 肽;

优选地,所述 T2A 包含与 SEQ ID NO. 108 所示氨基酸序列具有 80%或以上同一性的氨基酸序列,优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一性的氨基酸序列,更优选具有 98%或 99%以上同一性的氨基酸序列;所述 T2A 的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 108 所示;

8. 含有权利要求 7 所述核酸的表达载体:

优选地,所述载体选自质粒、粘粒、病毒载体、RNA载体或线性或圆形DNA或RNA分子

优选地,所述病毒载体选自逆转录病毒、腺病毒、细小病毒(例如,腺伴随病毒)、冠状病毒、负链RNA病毒诸如正粘病毒(例如,流感病毒)、弹状病毒(例如,狂犬病和水疱性口炎病毒)、副粘病毒(例如,麻疹和仙台)、正链RNA病毒诸如小RNA病毒和甲病毒和双链DNA病毒,所述双链DNA病毒包括腺病毒、疱疹病毒(例如,单纯疱疹病毒1和2型、爱泼斯坦-巴尔病毒、巨细胞病毒)和痘病毒(例如,牛痘病毒、鸡痘病毒和金丝雀痘病毒)、诺沃克病毒、披膜病毒、黄病毒、呼肠孤病毒、乳多泡病毒、嗜肝DNA病毒、杆状病毒和肝炎病毒;

优选地,所述逆转录病毒选自禽造血白细胞组织增生-肉瘤、哺乳动物C-型、B-型病毒、D-型病毒、HTLV-BLV集合、慢病毒、泡沫病毒;

优选地,所述慢病毒载体选自HIV-1、HIV-2、SIV、FIV、BIV、EIAV、CAEV或绵羊脱髓鞘性脑白质炎慢病毒;

优选地,所述NK激活受体组件、CNK信号转接组件和/或UT组件可在同一载体同一启动子,或不同启动子下调控表达,或多种载体中进行表达;

优选地,所述载体为慢病毒载体,所述编码NK激活受体组件、CNK信号转接组件和/或UT组件的基因之间包含可切割肽编码基因;优选地,所述可切割肽为2A接头;所述2A接头选自T2A、P2A、E2A和F2A;

优选地,所述载体还包含启动子;优选地,所述启动子为EF1 α 启动子或CMV启动子。

9. 免疫细胞,其包含权利要求8所述的核酸或权利要求8所述的表达载体。

优选地,免疫细胞选自T细胞,NKT细胞,NK细胞,B细胞,单核细胞,巨噬细胞等;

10. 制造免疫细胞的方法,其包括用选自下述的方法将权利要求8所述的核酸或权利要求8所述的表达载体引入细胞:电穿孔、声穿孔、基因枪(例如用Au-颗粒的基因枪)、脂质转染、聚合物转染、纳米颗粒或多聚复合物。

11. 一种药物组合物,其包含权利要求1-6任一项的多功能复合体、权利要求7所述的核酸、权利要求8所述的表达载体、权利要求9所述的免疫细胞和/或权利要求10所述方法制造的免疫细胞,以及药学上可接受的载体。

12. 权利要求1-6任一项的多功能复合体、权利要求7所述的核酸、权利要求8所述的表达载体、权利要求9所述的免疫细胞、权利要求10所述方法制造的免疫细胞和/或权利要求11所述的药物组合物在制备治疗疾病的药物中的用途。

13. 一种治疗疾病的方法,其包括向受试者施用权利要求1-6任一项的多功能复合体、权利要求7所述的核酸、权利要求8所述的表达载体、权利要求9所述的免疫细胞和/或权利要求10所述的药物组合物;

优选地,所述疾病包括各类实体肿瘤和血液肿瘤、病毒感染性疾病、自身免疫性疾病;

优选地,所述实体肿瘤选自神经系统肿瘤、头颈部肿瘤、胸部肿瘤、消化系统肿瘤、泌尿生殖系统肿瘤、软组织和皮肤肿瘤、骨肿瘤等;

优选地,神经系统肿瘤包括弥漫性胶质瘤、弥漫性星形细胞瘤和间变性星形细胞瘤、胶质母细胞瘤、少突胶质细胞瘤、少突星形细胞瘤、儿童弥漫性胶质瘤、其他星形细胞瘤、室管膜瘤、神经元和混合性神经元-神经胶质瘤、髓母细胞瘤、其他胚胎性肿瘤、神经鞘瘤、脑膜瘤、孤立性纤维性肿瘤和血管周细胞瘤等;

优选地,头颈部肿瘤包括鼻腔及鼻窦恶性肿瘤、鼻咽癌、口腔癌、喉癌、涎腺肿瘤、颅内肿瘤、甲状腺癌、舌癌等;

优选地,胸部肿瘤包括肺癌,食管癌,贲门癌,乳腺癌,纵膈肿瘤等;

优选地,消化系统肿瘤包括胃癌,大肠癌及乙状结肠和直肠癌,肝癌,胰腺癌与壶腹周围癌,胆道癌,小肠恶性肿瘤等;

优选地,泌尿生殖系统肿瘤包括肾癌、前列腺癌、膀胱癌、睾丸恶性肿瘤、阴茎癌、子宫颈癌、子宫内膜癌、卵巢癌等;

优选地,软组织和皮肤肿瘤包括恶性纤维组织细胞瘤、横纹肌肉瘤、滑膜肉瘤、皮肤恶性黑色素瘤等;

优选地,骨肿瘤包括骨肉瘤、尤文氏肉瘤等;

优选地,所述结肠癌是结肠腺瘤;

优选地,所述乳腺癌是三阴乳腺癌细胞;

优选地,所述肝癌是肝细胞癌;

优选地,所述疾病是血液肿瘤选自白血病、淋巴瘤(HL)、多发性骨髓瘤(MM)、骨髓增生异常综合征(MDS)等;

优选地,所述白血病是B细胞急性淋巴性白血病、T细胞急性淋巴性白血病、急性髓系白血病等;

优选地,病毒感染性疾病包括:呼吸道病毒性疾病、胃肠道病毒性疾病、肝脏病毒性疾病、皮肤和黏膜病毒性疾病、眼病毒性疾病、中枢神经系统病毒性疾病、淋巴细胞性病毒性疾病、虫传病毒性疾病、慢病毒感染疾病等;

优选地,呼吸道病毒性疾病包括鼻病毒、腺病毒、呼吸道合胞病毒、副流感病毒和冠状病毒等的感染;流行性感;流行性腮腺炎等;

优选地,胃肠道病毒性疾病包括脊髓灰质炎;库克萨基病毒感染;ECHO病毒感染;病毒性胃肠炎:包括轮状病毒性胃肠炎、诺瓦克病毒性胃肠炎、腺病毒性胃肠炎、星状病毒性胃肠炎、冠状病毒性胃肠炎和杯状病毒性胃肠炎等;

优选地,肝脏病毒性疾病包括甲型病毒性肝炎、乙型病毒性肝炎、丙型病毒性肝炎、丁型病毒性肝炎、戊型

病毒性肝炎、EB 病毒性肝炎和巨细胞病毒性肝炎等；

优选地，皮肤和黏膜病毒性疾病包括麻疹、风疹、幼儿急疹、水痘及带状疱疹、天花、单纯疱疹病毒感染、狂犬病和口蹄疫等；

优选地，眼病毒性疾病包括流行性角膜结膜炎、滤泡性结膜炎和疱疹性角膜结膜炎等；

优选地，中枢神经系统病毒性疾病包括流行性乙型脑炎、西方马脑炎、东方马脑炎、圣路易脑炎、委内瑞拉马脑炎、墨累山谷脑炎、加利福尼亚脑炎、森林脑炎和淋巴细胞脉络丛脑膜炎等；

优选地，淋巴细胞性病毒性疾病包括传染性单核细胞增多症、巨细胞病毒感染和获得性免疫缺陷综合征等；

优选地，虫传病毒性疾病包括病毒性出血热：包括流行性出血热、黄热病、克里米亚-刚果出血热、裂谷热、阿根廷出血热、玻利维亚出血热、拉萨热、鄂木斯克出血热、马尔堡病和埃波拉出血热等；登革热和登革出血热；西尼罗热；科罗拉多蜱传热；白蛉热等；

优选地，慢病毒感染疾病包括亚急性硬化性全脑炎、库鲁病、进行性多灶性白质脑病和亚急性海绵样脑病（皮质纹状体脊髓变性）等；

优选地，自身免疫性疾病包括器官特异性自身免疫病和系统性自身免疫病；

优选地，器官特异性自身免疫病包括慢性淋巴细胞性甲状腺炎、甲状腺功能亢进、胰岛素依赖型糖尿病、重症肌无力、溃疡性结肠炎、恶性贫血伴慢性萎缩性胃炎、肺出血肾炎综合征、寻常天疱疮、类天疱疮、原发性胆汁性肝硬化、多发性脑脊髓硬化症、急性特发性多神经炎等；

优选地，系统性自身免疫病包括系统性红斑狼疮、类风湿关节炎、系统性血管炎、硬皮病、天疱疮、皮炎、混合性结缔组织病、自身免疫性溶血性贫血、甲状腺自身免疫病、溃疡性结肠炎等。

14. 一种刺激受试者中的免疫应答的方法，所述方法包括给予受试者有效量的权利要求 1-6 任一项的多功能复合体、权利要求 7 所述的核酸、权利要求 8 所述的表达载体、权利要求 9 所述的免疫细胞、权利要求 10 所述方法制造的免疫细胞和/或权利要求 11 所述的药物组合物。