

一种靶向蛋白降解系统及其应用

5 技术领域

本公开涉及一种靶向蛋白降解系统及其应用，特别是在疾病治疗（包括但不限于癌症、病毒感染性疾病、自身免疫性疾病、神经退行性疾病）中的应用。

背景技术

10 靶向性去除蛋白至少出于以下原因是需要的：1）在基础研究中确定某一蛋白的功能；2）验证治疗性靶点；3）阻止致病性蛋白（例如，肿瘤蛋白或导致神经性退化的蛋白）的作用；4）加强在老化过程中累积起来的蛋白的降解；5）降低细胞治疗的副作用（例如，阻止免疫原性蛋白的表达）。但是，目前已有的靶向性去除蛋白的技术均存在各自固有的技术问题。

15 基因编辑技术（例如，CRISPR 技术）能够在基因层面靶向敲除编码任何靶蛋白的基因，但存在脱靶问题，在识别和切割期望的 DNA 位点方面特异性较低，容易产生染色体不稳定等副作用。

小干扰 RNA（siRNA）能够在 RNA 层面阻止靶蛋白的合成。但是，siRNA 也具有潜在的脱靶效应。例如，siRNA 的正义链能介导同源基因的表达沉默，引起由正义链介导的脱靶效应。此外，小核酸序列上小部分的不匹配也可能导致其它的基因沉默，造成脱靶效应，产生毒副作用。

20 蛋白降解靶向嵌合体技术（PROTAC）能够在蛋白质层面降解靶蛋白，通常作为生物化学试剂加入细胞或给予动物或人体从而诱导细胞内靶蛋白降解。早期的 PROTAC 是基于 E3 连接酶结合的多肽配体分子，但是使用多肽配体分子制备的 PROTAC 的细胞通透性低、不稳定，从而导致降解效率低下。尽管用小分子作为 E3 连接酶配体的 PROTAC 已经表现出显著的有效性，但它们的透膜能力与生物利用度较差。

因此，急需一种新的靶向蛋白降解系统，以克服靶向性去除靶蛋白的各种已有技术中存在的至少一个问题。

25

发明内容

在一方面，本申请提供了一种通过内质网相关降解（ER-associated degradation, ERAD）机制降解靶蛋白的嵌合蛋白构建体（chimeric protein construct），其包含 ERAD 机制蛋白结合结构域和靶向结构域（targeting domain）。在一些实施方案中，本申请提供了一种通用的靶蛋白降解的组件，其可以劫持 ERAD 30 机制以阻止 ER 中的靶蛋白的运输并促进其易位到细胞质中，以通过基于泛素蛋白酶体的 UPS 机制，蛋白酶体对靶蛋白进行泛素化和降解，和/或通过自噬溶酶体的 ALP 机制，溶酶体对靶蛋白进行内容降解。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。本申请通过重新设计病毒元件，靶向各种内源性靶蛋白或外源性靶蛋白，实现靶蛋白在内质网的滞留和定向降解。

35 在另一方面，本申请提供了一种通过 ERAD 机制以及泛素化机制协同降解靶蛋白的嵌合蛋白构建体，其包含 ERAD 机制蛋白结合结构域，靶向结构域以及进一步地蛋白降解通路成员结合结构域。这种设计能大大提高对靶蛋白的降解效率，并且适用于众多 PROTAC 技术无法降解的靶点。

上述两种嵌合蛋白构建体在本申请中也称为 TPD（Targeted Protein Degradation）嵌合蛋白构建体。本申请还提供了编码上述嵌合蛋白构建体的核酸、核酸载体、溶瘤病毒、以及表达上述嵌合蛋白构建体的细胞，40 及其用于治疗疾病的用途。

实施方式 1. 一种嵌合蛋白构建体，其包含内质网相关降解（ER-associated degradation, ERAD）机制蛋白结合结构域和靶向结构域。

实施方式 2. 如实施方式 1 所述的嵌合蛋白构建体，其中所述 ERAD 机制蛋白结合结构域包含病毒内质网滞留蛋白的跨膜结构域或其功能变体和内质网滞留结构域或其功能变体。

45 实施方式 3. 如实施方式 1 或 2 所述的嵌合蛋白构建体，其中所述病毒内质网滞留蛋白为腺病毒 E3-19K。

实施方式 4. 如实施方式 1 或 2 所述的嵌合蛋白构建体，其中所述病毒内质网滞留蛋白不是腺病毒 E3-19K。

50 实施方式 5. 如实施方式 4 所述的嵌合蛋白构建体，其中所述病毒内质网滞留蛋白选自以下的至少一种：HCMV 糖蛋白 US2、US11、US3、US10、US6、HSV ICP47、CPXV12、BHV UL49.5、EBV BNFL2a、HCMV UL16、UL141、UL142、HIV Nef、HIV Vpu、HHV-7 U21、HHV-8 KK3、HHV-8 KK5、MHV-68 MK3、HTLV-1 p12、Cowpox Virus 蛋白 CPXV203。

实施方式 6. 如前述实施方式中任一项所述的嵌合蛋白构建体，其进一步包含蛋白降解通路成员（例如 E3 泛素连接酶、蛋白酶体、溶酶体）结合结构域，可选地，所述蛋白降解通路成员结合结构域与所述 ERAD 机制蛋白结合结构域连接。

55 实施方式 7. 如前述实施方式中任一项所述的嵌合蛋白构建体，其中所述靶向结构域包含特异性靶向靶

蛋白的抗体或其功能片段(例如, Fd、Fv、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv(scFv)、单链抗体(scFv)、纳米抗体(nanobody)、双链抗体、三链抗体和四链抗体)。

实施方式 8. 如实施方式 7 所述的嵌合蛋白构建体, 其中所述靶蛋白为致病蛋白, 可选地, 所述致病蛋白是肿瘤相关的蛋白、病毒相关的蛋白、免疫功能相关蛋白(包括免疫抑制性蛋白和免疫激活性蛋白)、自身抗原蛋白、或神经退行性疾病相关的蛋白。

实施方式 9. 如实施方式 8 所述的嵌合蛋白构建体, 其中所述自身抗原蛋白选自下组: 与 I 型糖尿病相关的自身抗原例如, 胰岛细胞抗原(ICA)、胰岛素(IAA)、谷氨酸脱羧酶 65(GAD65)、胰岛瘤抗原-2(IA-2); 与类风湿性关节炎(RA)相关的自身抗原(autoantigen)例如, 瓜氨酸化蛋白/肽抗体, 异核糖核蛋白(heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1)、aldolase、alpha-enolase、calreticulin、热激活蛋白(HSP60)、BiP、PGK1、压力诱导磷酸蛋白(stress-induced phosphoprotein 1)、FUSE-BP1/2; 与系统性红斑狼疮(SLE)相关的自身抗原例如, 脱氧核糖核蛋白、SmD1 和 SmD3、Clq、疮抗凝物(LA)、心磷脂(CL)、β₂糖蛋白 I(β₂GP I)、凝血酶原(PT)和磷脂酰丝氨酸(PS); 与系统性硬化症(Systemic Sclerosis, SSc)/硬皮病(scleroderma, SD)相关自身抗原例如, Scl-70、SSA、Ro52; 与自身免疫性肝病相关的抗原例如, 线粒体抗原、Spl00、PML、gp210、p62; 与重症肌无力相关的自身抗原例如, 乙酰胆碱受体; 与中枢神经系统自身免疫疾病(边缘性脑炎、脑脊髓炎、小脑性共济失调)相关的自身抗原例如, 电压门控性钾离子通道(VGKC)复合物、电压门控性钙离子通道受体、α-氨基-3-羟基-5-甲基异噻唑-4-丙酸(AMPA)受体、γ-氨基丁酸-B(GABAB)受体、甘氨酸受体; 与多发性硬化相关的自身抗原例如, 髓磷脂碱性蛋白(MBP)、髓磷脂少突胶质细胞糖蛋白(MOG); 与多发性肌炎(PM)和皮肌炎(DM)相关的自身抗原例如, Jo-1、Mi-2、PM-Scl、Ro-52; 与麸质敏感性肠病相关的自身抗原例如, 肌内膜抗体(EMA)、组织谷氨酰胺转移酶(tTG); 与抗 NMDAR 抗体脑炎相关的自身抗原例如, N-甲基-D-天冬氨酸受体; 与视神经脊髓炎(NMO)相关的自身抗原例如, 水通道蛋白 4(AQP4); 与生殖相关相关的自身抗原例如, 卵巢抗原, 精子抗原。

实施方式 10. 如实施方式 9 所述的嵌合蛋白构建体, 其中所述肿瘤相关的蛋白由选自以下组成的组的致癌基因编码: BCL-2、c-MYC、Ras、HER2、BCR/ABL、ABL1/BCR、TGFB1、TLX1、P53、WNT1、WNT2、WT1、αv-β3、PKCa、ABL、BCL1、CD24、CDK4、EGFR/ERBB-1、HSTF1、INT1/WNT1、INT2、MDM2、MET、MYB、MYC、MYCN、MYCL1、RAFI、NRAS、REL、AKT2、APC、BCL2-ALPHA、BCL2-BETA、BCL3、BCR、BRCA1、BRCA2、CBL、CCND1、CDKN1A、CDKN1C、CDKN2A、CDKN2B、CRK、CRK-II、CSF1R/FMS、DBL、DDOST、PMS-2、PRAD-1、RAF、RHOM-1、RHOM-2、SIS、TAL2、TANI、TIAM1、TSC2、TRK、TSC1、STK11、PTCH、MEN1、MEN2、P57/KIP2、PTEN、HPC1、ATM、XPA/XPG、BCL6、DEK、AKAP13、CDH1、BLM、EWSR1/FLI1、FES、FGF3、FER、FGR、FLI1/ERGB2、FOS、FPS/FES、FRA1、FRA2、FYN、HCK、HEK、HER3/ERBB-2、ERBB-3、HER4/ERBB-4、HST2、INK4A、INK4B、JUN、JUNB、JUND、KIP2、KIT、KRAS2A、KRAS2B、LCK、LYN、MAS、MAX、MCC、MLH1、MOS、MSH2、MYBA、MYBB、NFI、NF2、P53、PDGFB、PIM1、PTC、RBI、RET、ROS1、SKI、SRC1、TALI、TGFB2、THRA1、THRB、TIAM1、TRK、VAV、VHL、WAF1、WNT2、WT1、YES1、ALK/NPM1、AMII、AXL、FMS、GIP、GLI、GSP、HOX11、HST、IL3、INT2、KS3、K-SAM、LBC、DCC、DPC4/SMAD4、E-CAD、E2F1/RBAP、ELK1、ELK3、EPH、EPA1、E2F1、EPA3、ERG、ETS1、ETS2、LMO-1、LMO-2、L-MYC、LYL1、LYT-10、MDM-2、MLH1、MLL、MLM、N-MYC、OST、PAX-5、PMS-1、FGF4、FGF6、FANCA、FLI1/ERGB2、FOSL1、FOSL2、GLI、HRAS1、HRX/MLLT1、HRX/MLLT2、KRAS2、MADH4、MASI、MCF2、MLLT1/MLL、MLLT2/HRX、MTG8/RUNX1、MYCLK1、MYH11/CBFB、NFKB2、NOTCH1、NPM1/ALK、NRG/REL、NTRK1、PBX1/TCF3、PML/RARA、PRCA1、RUNX1、RUNX1/CBFA2T1、SET、SHP2、TCF3/PBX1、TNFα、Clusterin、Survivin、TOEβ、c-fos、c-SRC、雌激素受体基因(estrogen receptor ER-α)、雄激素受体基因(Androgen receptor, AR)和 INT-1, 可选地, 所述肿瘤相关的蛋白选自下组: Bcl-2 家族成员(如: Bcl-2、Bcl-xL 和 Bcl-w)、VEGF/VEGFR、PDGFRβ、EGFR、EGFR 突变体、IGF-1R、HDACs、HER2、MYC、KRAS、AFP、CEA、CA199、雌激素受体(estrogen receptor ER-α)、雄激素受体(Androgen receptor, AR)、酪氨酸激酶(c-ABL、BCR-ABL、BTK、FAK、PTK6、Wee1、TRK 跨膜受体)、丝/苏氨酸激酶受体(IRAK4、LRRK2、B-Raf、RIPK2、CDK4/6、CDK7、CDK8、CDK8/19、CDK9、TBK1)、蛋白激酶 II(CK2)、表观遗传相关蛋白(BRD2、BRD3、BRD4、BRDT、TRIM24、BRD9、PBRM1、SMARCA2、SMARCA4、EP300、EZH2、WDR5)、肾上腺髓质素(ADM)、DPP3。

实施方式 11. 如实施方式 8 所述的嵌合蛋白构建体, 其中所述致病蛋白是病毒相关蛋白, 其选自: HBV 表面抗原、HBV 衣壳糖蛋白、HBcAg、HBV DNA 聚合酶、HBV 编码 X 蛋白(HBx)、HIV Gag 蛋白、HIV Env 蛋白、HIV gp120、HIV-1 逆转录酶、HIV gp120、HCV NS3-4A 蛋白酶、HCV RNA 聚合酶、HCV 包膜(envelope)蛋白、EBV DNA 聚合酶、EBV EBNA1、冠状病毒 RNA 合成酶、冠状病毒刺突蛋白、冠状病毒包膜蛋白、冠状病毒膜蛋白、冠状病毒核壳蛋白、RNA 依赖性 RNA 聚合酶(RNA-dependent RNA polymerase, RdRp), 如新冠病毒 RNA 依赖性 RNA 聚合酶、疱疹病毒(Herpesviruses) DNA 和 RNA

聚合酶、疱疹病毒衣壳糖蛋白、CMV DNA 聚合酶、CMV 衣壳糖蛋白、RSV 表膜蛋白、RSV 衣壳蛋白、RSV RNA 聚合酶、流感病毒 RNA 聚合酶、流感病毒包膜 (envelope) 蛋白、HPV DNA 聚合酶、和 HPV 衣壳蛋白。

实施方式 12. 如实施方式 7 所述的嵌合蛋白构建体, 其中所述靶蛋白为免疫功能相关蛋白, 其选自: 抗原呈递分子 (例如 MHC I 类分子、MHC II 类分子、MICA/B 分子等)、抗原识别分子 (例如 TCR、CD123、NKG2D 等)、免疫检查点分子 (例如 PD-1、PD-L1、CTLA4、TIM3、TIGIT、LAG3、A2AR、BTLA、IDO1、IDO2、TDO、KIR、NOX2、VISTA、SIGLEC7、PVR 等)、免疫刺激/共刺激分子 (例如 CD3、CD80/86、CD28 等)。

实施方式 13. 如实施方式 7 所述的嵌合蛋白构建体, 其中所述靶蛋白为神经系统疾病相关的靶蛋白, 其选自: Tau、 β -淀粉样蛋白 (amyloid- β (A β))、 α 突触核蛋白、亨廷顿蛋白突变体 (mutant huntingtin, mHTT)、 α -synuclein、TAR RNA 结合蛋白 (TARDBP) 和 FUS RNA 结合蛋白 (FUS)。

实施方式 14. 如实施方式 2、4 或 5 所述的嵌合蛋白构建体, 其中所述靶向结构域不是特异性结合 TCR。

实施方式 15. 如实施方式 14 所述的嵌合蛋白构建体, 其中所述靶向结构域特异性结合 MHC I、MHC II、MICA、MICB、ULBP1、ULBP2、ULBP3、ULBP4、ULBP5 和/或 ULBP6; 优选地, MHC I 是 HLA I; 优选地, MHC II 是 HLA II。

实施方式 16. 如实施方式 4 所述的嵌合蛋白构建体, 其中所述靶向结构域特异性结合 TCR。

实施方式 17. 如实施方式 16 所述的嵌合蛋白构建体, 其中所述病毒内质网驻留蛋白选自以下的至少一种: HCMV 糖蛋白 US2、US11、US3、US10、US6、HSV ICP47、CPXV12、BHV UL49.5、EBV BNFL2a、HCMV UL16、UL141、UL142、HIV Nef、HIV Vpu、HHV-7 U21、HHV-8 KK3、HHV-8 KK5、MHV-68 MK3、HTLV-1 p12、Cowpox Virus 蛋白 CPXV203。

实施方式 18. 如前述任意实施方式所述的嵌合蛋白构建体, 其和至少一个共表达部分连接。

实施方式 19. 如实施方式 18 所述的嵌合蛋白构建体, 其中所述至少一个共表达部分独立地选自: 完整的病毒 ER 驻留糖蛋白 (例如, HCMV US2、US3、US11、US10、腺病毒 E3-K1 9、HCMV US6、HSV ICP47)、嵌合抗原受体 (CAR)、功能性 T 细胞受体 (TCR)、趋化因子受体和 NK 细胞激活受体。

实施方式 20. 如实施方式 19 所述的嵌合蛋白构建体, 其中所述趋化因子受体选自: CCR4、CCR5、CCR6、CCR7、CCR9、CCR2b、CXCR1、CXCR2 和 CXCR4。

实施方式 21. 如实施方式 20 所述的嵌合蛋白构建体, 其中所述 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。

实施方式 22. 如实施方式 21 所述的嵌合蛋白构建体, 其中所述 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。

实施方式 23. 如实施方式 21 或 22 所述的嵌合蛋白构建体, 其中所述 NK 细胞激活受体与 CNK 信号转接组件复合。

实施方式 24. 如实施方式 18-23 中任一项所述的嵌合蛋白构建体, 其中所述至少一个共表达部分通过可断裂的接头连接至所述嵌合蛋白构建体。

实施方式 25. 一种核酸分子, 其编码如实施方式 1-24 中任一项所述的嵌合蛋白构建体。

实施方式 26. 根据实施方式 25 所述的核酸分子, 其为脱氧核糖核酸 (DNA)、核糖核酸 (RNA) (例如, mRNA、环状 RNA、ccRNA)、苏糖核酸 (TNA)、乙二醇核酸 (GNA)、肽核酸 (PNA)、锁核酸 (LNA, 包括具有 β -D-核糖构型的 LNA, 具有 α -L-核糖构型的 α -LNA (LNA 的非对映异构体)、具有 2'-氨基官能化的 2'-氨基-LNA 和具有 2'-氨基官能化的 2'-氨基- α -LNA)、乙烯核酸 (ENA)、环己烯基核酸 (CeNA) 和/或它们的嵌合体和/或组合。

实施方式 27. 一种载体, 其包含如实施方式 25 或 26 所述的核酸分子, 所述核酸分子可操作地连接至至少一个多核苷酸调控元件以表达所述核酸分子编码的嵌合蛋白构建体。

实施方式 28. 如实施方式 27 所述的载体, 其中所述载体选自: 质粒、纳米质粒、粘粒、病毒载体 (例如, 溶瘤病毒载体)、小环、RNA 载体或线性或圆形 DNA (例如, 转座子 DNA) 或 RNA 分子。

实施方式 29. 如实施方式 28 所述的载体, 其中所述载体为病毒载体, 其选自: 逆转录病毒、慢病毒载体、腺病毒、细小病毒 (例如, 腺伴随病毒)、腺相关病毒 (AAV) 载体、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、呼肠弧病毒、乳多泡病毒、嗜肝 DNA 病毒、杆状病毒和肝炎病毒、病毒样颗粒 (VLP)。

实施方式 30. 如实施方式 29 所述的载体, 其中所述病毒载体为逆转录病毒载体。

实施方式 31. 如实施方式 30 所述的载体, 其中所述逆转录病毒载体选自: 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。

实施方式 32. 如实施方式 29 所述的载体, 其中所述病毒载体为慢病毒载体。

5 实施方式 33. 如实施方式 32 所述的载体, 其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。

实施方式 34. 如实施方式 27-33 中任一项所述的载体, 其进一步与其他载体组合, 所述其他载体包含其他核酸分子, 所述其他核酸分子编码至少一个共表达部分。

10 实施方式 35. 一种工程化细胞, 其表达如实施方式 1-25 中任一项所述的嵌合蛋白构建体, 或包含如实施方式 26 所述的核酸分子, 或包含如实施方式 27-33 中任一项所述的载体。

实施方式 36. 如实施方式 35 所述工程化的细胞, 其表达如实施方式 1-18 任一项所述的嵌合蛋白构建体, 以及共表达部分。

实施方式 37. 如实施方式 35 或 36 所述的工程化细胞, 其中所述细胞为免疫细胞, 其选自: T 细胞、自然杀伤(NK)细胞、B 细胞、巨噬细胞、单核细胞、树突细胞、中性粒细胞或 $\gamma\delta$ T 细胞。

15 实施方式 38. 如实施方式 37 所述的工程化细胞, 其中所述 T 细胞选自: CD8+ T 细胞、CD4+ T 细胞、细胞毒性 T 细胞、末端效应 T 细胞、记忆 T 细胞、幼稚 T 细胞、调节性 T 细胞组成的组细胞、自然杀伤 T 细胞、 $\gamma\delta$ T 细胞、细胞因子诱导的杀伤 (CIK) T 细胞和肿瘤浸润淋巴细胞。

实施方式 39. 一种产生如实施方式 35-38 中任一项所述的工程化细胞的方法, 其包括在适合表达如实施方式 25 或 26 所述的核酸分子的条件将如实施方式 27-34 中任一项所述的载体引入起始细胞。

20 实施方式 40. 如实施方式 39 所述的方法, 其中所述起始细胞是干细胞或从干细胞分化的细胞。

实施方式 41. 如实施方式 38 所述的方法, 其中所述干细胞是造血祖细胞 (例如 T 细胞祖细胞、NK 细胞祖细胞、巨噬细胞祖细胞)、造血干细胞 (HSC)、CD34+ 细胞、胚胎细胞系干细胞、间充质干细胞或 iPSC 细胞。

实施方式 42. 如实施方式 37 所述的方法, 其中所述细胞是免疫细胞。

25 实施方式 43. 如实施方式 40 所述的方法, 其中所述免疫细胞是 T 细胞、自然杀伤(NK)细胞、B 细胞、巨噬细胞、单核细胞或树突细胞。

实施方式 44. 如实施方式 41 所述的方法, 其中所述细胞是 T 细胞, 其选自: CD4+T 细胞、CD8+T 细胞、细胞毒性 T 细胞、末端效应 T 细胞、记忆 T 细胞、幼稚 T 细胞、调节性 T 细胞组成的组细胞、自然杀伤 T 细胞、 $\gamma\delta$ T 细胞、细胞因子诱导的杀伤 (CIK) T 细胞和肿瘤浸润淋巴细胞。

30 实施方式 45. 细胞群, 其由如实施方式 39-44 中任一项所述的方法离体产生。

实施方式 46. 一种药物组合物或一种试剂盒, 其包含 (i) 如实施方式 1-24 中任一项所述的嵌合蛋白构建体或如实施方式 25 或 26 所述的核酸分子或如实施方式 27-34 中任一项所述的载体或如实施方式 35-38 中任一项所述的工程化细胞或如实施方式 45 所述的细胞群, 以及 (ii) 药学上可接受的媒介。

35 实施方式 47. 一种降解靶蛋白的方法, 其包括将如实施方式 27-34 中任一项所述的载体递送至表达靶蛋白的细胞内。

实施方式 48. 如实施方式 47 所述的方法, 其中所述细胞选自: 肿瘤细胞、病毒感染细胞、神经性细胞、移植细胞、免疫细胞。

实施方式 49. 如实施方式 47 或 48 所述的方法, 其中所述递送包括通过病毒载体 (例如, 溶瘤病毒) 递送。

40 实施方式 50. 如实施方式 49 所述的方法, 其中所述载体在所述细胞内表达如实施方式 1-24 中任一项所述的嵌合蛋白构建体。

实施方式 51. 如实施方式 50 所述的方法, 其中所述嵌合蛋白构建体能够同时结合靶蛋白和 ERAD 机制蛋白, 从而降解所述靶蛋白。

45 实施方式 52. 一种治疗有需要的受试者的病症或疾病的方法, 包括:

向所述受试者施用治疗有效量的如实施方式 46 所述的药物组合物。

实施方式 53. 如实施方式 52 所述的方法, 其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、自身免疫性疾病和神经类和退行性疾病 (例如, 阿尔茨海默症)、代谢类疾病 (例如糖尿病 (例如, 2 型糖尿病)、脂代谢相关疾病 (例如, 肿瘤脂代谢、非酒精性脂肪肝)、动脉粥样硬化 (Atherosclerosis, AS)、肿瘤糖代谢);

50 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;

55 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；

5 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；

10 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；

15 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；流行性感冒；流行性腮腺炎等；

20 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；

25 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；

30 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；

35 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；

40 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；

优选地，神经类疾病包括神经系统疾病周围神经疾病如三叉神经痛、面瘫、面肌痉挛、前庭神经炎、舌咽神经痛、单神经疾病、臂丛神经痛、多数性单神经病、多发性神经病、急性炎症性脱髓鞘性多发性神经病、慢性炎症性脱髓鞘性多发性神经病；

45 脊髓疾病如脊髓炎、压迫性脊髓病、脊髓亚急性联合变性、脊髓空洞症、脊髓血管病、脊髓蛛网膜炎等；

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；

50 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；

优选地，神经类疾病包括神经系统疾病周围神经疾病如三叉神经痛、面瘫、面肌痉挛、前庭神经炎、舌咽神经痛、单神经疾病、臂丛神经痛、多数性单神经病、多发性神经病、急性炎症性脱髓鞘性多发性神经病、慢性炎症性脱髓鞘性多发性神经病；

45 脊髓疾病如脊髓炎、压迫性脊髓病、脊髓亚急性联合变性、脊髓空洞症、脊髓血管病、脊髓蛛网膜炎等；

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；

50 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；

优选地，神经类疾病包括神经系统疾病周围神经疾病如三叉神经痛、面瘫、面肌痉挛、前庭神经炎、舌咽神经痛、单神经疾病、臂丛神经痛、多数性单神经病、多发性神经病、急性炎症性脱髓鞘性多发性神经病、慢性炎症性脱髓鞘性多发性神经病；

45 脊髓疾病如脊髓炎、压迫性脊髓病、脊髓亚急性联合变性、脊髓空洞症、脊髓血管病、脊髓蛛网膜炎等；

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；

50 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；

优选地，神经类疾病包括神经系统疾病周围神经疾病如三叉神经痛、面瘫、面肌痉挛、前庭神经炎、舌咽神经痛、单神经疾病、臂丛神经痛、多数性单神经病、多发性神经病、急性炎症性脱髓鞘性多发性神经病、慢性炎症性脱髓鞘性多发性神经病；

45 脊髓疾病如脊髓炎、压迫性脊髓病、脊髓亚急性联合变性、脊髓空洞症、脊髓血管病、脊髓蛛网膜炎等；

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；

50 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；

优选地，神经类疾病包括神经系统疾病周围神经疾病如三叉神经痛、面瘫、面肌痉挛、前庭神经炎、舌咽神经痛、单神经疾病、臂丛神经痛、多数性单神经病、多发性神经病、急性炎症性脱髓鞘性多发性神经病、慢性炎症性脱髓鞘性多发性神经病；

45 脊髓疾病如脊髓炎、压迫性脊髓病、脊髓亚急性联合变性、脊髓空洞症、脊髓血管病、脊髓蛛网膜炎等；

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；

神经系统变性疾病如运动神经元病、阿尔茨海默病、路易体痴呆、额颞叶痴呆、多系统萎缩等；

神经系统遗传性疾病如遗传性共济失调、遗传性痉挛性截瘫、腓骨肌萎缩症、神经纤维瘤病、结节性硬化、脑面血管瘤病等；

神经系统发育异常性疾病如先天性脑积水、脑性瘫痪、颅底凹陷症、小脑扁桃体下疝等；

5 神经-肌肉接头和肌肉疾病如重症肌无力、周期性瘫痪、多发性肌炎、进行性肌营养不良症、肌强直性肌病（强直性肌营养不良症、先天性肌强直症）、代谢性肌病（线粒体肌病、脂质沉积性肌病、糖原沉积症）等；

自主神经系统疾病如雷诺氏病、红斑性肢痛症、面偏侧萎缩症、全身自主神经功能不全、自发性多汗症、进行性脂肪营养不良等；

10 神经系统肿瘤如脑胶质瘤、淋巴瘤、脊膜瘤等；

神经系统副肿瘤综合征如副肿瘤性小脑变性、副肿瘤性脑脊髓炎、亚急性坏死性脊髓病、亚急性运动神经-眼病、副肿瘤性感觉神经元病等。

优选地，代谢类疾病包括糖尿病，高脂血症，痛风等。

实施方式 54. 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如实施方式 46 所述的药物组合物。

附图说明

图 1 示出了基于内质网的靶向蛋白降解技术的嵌合蛋白构建体，其中，图 1A 为基本 ER-TPD 嵌合蛋白构建体 TBD-TMD-ERD 的线性示意图和结构示意图；图 1B 示出了 ER-TPD 嵌合蛋白构建体 TBD-TMD-ERD 的工作结构原理。

图 2 示出了具有 E3 泛素连接酶配体结构域的 ER-TPD 嵌合蛋白构建体 TBD-TMD-ERD-E3L，其中，图 2A 为其线性示意图，图 2B 为其结构示意图，图 2C 示出了 ER-TPD 嵌合蛋白构建体 TBD-TMD-ERD-E3L 的工作结构原理。

图 3 示出了具有 E2 泛素结合酶配体结构域的 ER-TPD 嵌合蛋白构建体 TBD-TMD-ERD-E2L，其中，图 3A 为其线性示意图，图 3B 为其结构示意图，图 3C 示出了 ER-TPD 嵌合蛋白构建体 TBD-TMD-ERD-E3L 的工作结构原理。

图 4 示出了具有溶酶体配体结构域的 ER-TPD 嵌合蛋白构建体 TBD-TMD-ERD-LL，其中，图 4A 为其线性示意图，图 4B 为其结构示意图，图 4C 示出了 ER-TPD 嵌合蛋白构建体 TBD-TMD-ERD-LL 的工作结构原理。

图 5 示出了具有 E3 泛素化连接酶配体和溶酶体配体组合的 ER-TPD 嵌合蛋白构建体 TBD-TMD-ERD-E3L-LL，其中，图 5A 为其线性示意图，图 5B 为其结构示意图，图 5C 示出了 ER-TPD 嵌合蛋白构建体 TBD-TMD-ERD-E3L-LL 的工作结构原理。

图 6 示出了靶向 TCR 的 ER-TPD 嵌合核酸构建体 TCR-ER-TPD，其中，图 6A 示出了嵌合核酸构建体 TCR-TPD1；图 6B 示出了嵌合核酸构建体 TCR-TPD2。

图 7 示出了 TCR ER-TPD Jurkat 细胞在 48h (A)、96h (B) 和第 6 天 (C) 时细胞表型检测结果。

图 8 示出了采用单一慢病毒表达载体并以 EF1 α 启动子为启动子所设计的表达载体，其中，图 8A 示出了 CNK 表达载体；图 8B 示出了嵌合蛋白构建体 HLA-ER-TPD；图 8C 示出了嵌合蛋白构建体 CNK-HLA-ER-TPD。

图 9 示出了靶向 HLA-abc 的 ER-TPD 嵌合核酸构建体联合 CNK 表达载体转染 293 细胞的细胞表型 48h 流式结果。

图 10 示出了靶向 CD123 的 ER-TPD 嵌合核酸构建体，其中，图 10A 示出了 CNK 表达载体；图 10B 示出了嵌合蛋白构建体 HLA-TPD。

图 11 示出了靶向 CD123 scFv TPD 嵌合核酸构建体转染急性髓系白血病细胞系 THP1 细胞 48h 表型流式结果。

图 12 示出了靶向 CD123 的 ER-TPD-CD123 CAR-T 细胞的应用，其中，图 12A1 示出了 CD123 CAR，是 12B1 示出了 CD123 在激活的 T 细胞上表达，图 12C1 示出了靶向 CD123 CAR-T 细胞在激活培养和杀伤肿瘤细胞过程中都会产生自杀伤效应；图 12A2 示出了 CD123 CAR-T-T2A-CD123 ER-TPD 嵌合蛋白构建体，图 12B2 示出了表达该嵌合蛋白构建体，可以降解自身表达的 CD123，图 12C2 示出了表达该嵌合蛋白构建体后对肿瘤细胞的杀伤效应。

图 13 示出了靶向自体抗体的 ER-TPD 嵌合蛋白构建体在自身免疫性疾病治疗中的应用，其中，图 13A 示出了在 I 型糖尿病患者浆细胞表达释放胰岛素抗体，该抗体结合胰岛素，并清除外周血中的胰岛素，导致患者胰岛素使用率严重下降；图 13B 示出了通过靶向胰岛素抗体的 ER-TPD 转座子 DNA，利用靶向浆细胞的脂质体，递送到浆细胞内，并实现整合，长期表达 IAA ER-TPD 嵌合蛋白构建体。

图 14 中说明了含有 TCR $\alpha\beta$ 或 HLA 分子结合分子、病毒 ER 驻留蛋白的一个或多个跨膜和胞质结构域的示例性嵌合融合蛋白。其中，图 14A 是 UT 嵌合多结构域的示意图和组成。一种病毒 ER 驻留糖蛋白 (VEP) 的广式结构，由腔域 (LD)、跨膜结构域 (TMD) 和胞质功能域组成；UT 嵌合多结构域由

TCR 或 HLA 结合域、铰链/垫片、VEP 跨膜和细胞质域组成。图 14B 是 UT 嵌合多结构域的示意图和组成。不同病毒 ER 驻留糖蛋白 (VEP) 的广式结构, 由不同的腔内结构域 (LD)、跨膜结构域 (TMD) 和细胞质功能域组成; UT 嵌合多结构域由 TCR 或 HLA 结合域、铰链/垫片组成, 与 VEP 跨膜和细胞质结构域不同。图 14C 是 UT 嵌合多结构的示意图和组成。不同病毒 ER 驻留糖蛋白 (VEP) 的广式结构, 由不同的腔域 (LD)、跨膜结构域 (TMD) 和细胞质功能域组成; UT 嵌合多结构域由 TCR 或 HLA 结合域、铰链/垫片组成, 不同的 VEP 跨膜和嵌合的细胞质域来源于不同的 VEP。

图 15 显示 UT 元件的强制表达可以有效抑制 Jurkat 细胞中 TCR 的表达。构建了具有截短的 EGFR 的慢病毒载体, 该载体编码 anti-TCR scFv 与不同的病毒 ER 驻留蛋白、HCMV US2、US3、US11、腺病毒 E19 TM/CT 结构域融合, 以及同时编码 anti-TCR scFv 与 US2 和腺病毒 E19 TM/CT 融合的慢病毒载体。用这种慢病毒转导 Jurkat 细胞, 用未转导 Jurkat 细胞作为对照。转导后 48 小时, 将细胞送入流式细胞仪, 检测转导细胞 (EGFR+细胞) 中 TCR $\alpha\beta$ 的表达。结果显示, 所有 EGFR (+) 的 Jurkat 都显示出 TCR $\alpha\beta$ 表达的明显下调; 用联合 UT 成分 (US2/E19) 转导的细胞可以有效地阻断 TCR $\alpha\beta$ 的表达。所有测试的 UT 嵌合元件 (US2、US3、US11、E19) 都能阻断 TCR $\alpha\beta$ 的表达。组合 UT 元件 (US2 和 E19) 可以明显提高对 Jurkat 细胞表面 TCR $\alpha\beta$ 表达的抑制作用。

图 16 示出了强制表达 UT 元件可以有效地抑制人类 T 细胞中 TCR 的表达。其中, 图 16A 显示 UT 元件的强制表达可以有效地抑制人 T 细胞中 TCR 的表达。具有包括截短的 EGFR 的表达盒的慢病毒载体是编码与 HCMV US3 TM/CT 结构域融合的 anti-TCR scFv (anti-TCR-US2 TM/CT-T2A-EGFRt)。用这种慢病毒刺激和转导人类 T 细胞, 并以未转导 T 细胞作为对照。转导 5 天后, 将细胞送入流式细胞仪检测转导的 T 细胞 (EGFR+细胞) 中 TCR $\alpha\beta$ 的表达。结果显示, 与非转导的 T 细胞相比, EGFR (+) T 显示出 TCR $\alpha\beta$ 表达的明显下调。这表明含有 anti-TCR-US3 TM/CT 的 US 元件可以有效地抑制人类 T 细胞中 TCR $\alpha\beta$ 的表达。图 16B 显示 UT 元件的强制表达可以有效地抑制人 T 细胞中 TCR 的表达。带有包括截短的 EGFR 的表达盒的慢病毒载体是编码与 HCMV E19 TM/CT 结构域融合的 anti-TCR scFv (anti-TCR-E19 TM/CT-T2A-EGFRt)。用这种慢病毒刺激和转导人类 T 细胞, 并以未转导 T 细胞作为对照。转导 5 天后, 将细胞送入流式细胞仪检测转导的 T 细胞 (EGFR+细胞) 中 TCR $\alpha\beta$ 的表达。结果显示, 与未转导 T 细胞相比, EGFR (+) T 显示出 TCR $\alpha\beta$ 表达的明显下调。增加病毒转导可以进一步提高对 T 细胞表面 TCR $\alpha\beta$ 表达的抑制。这表明含有 anti-TCR-E19 TM/CT 的 US 元件可以有效地在人类 T 细胞中表达 TCR $\alpha\beta$ 。

图 17 显示具有 UT 元件的 CNK-T 细胞下调了 CD8/CD4 细胞上的 TCR 表达。慢病毒载体包含编码嵌合 NK 受体和与 E19 TM/CT 结构域融合的 anti-TCR scFv 的表达盒 (CNK-UT-E19)。用这种慢病毒转导人类 T 细胞。转导后 5 天, 将细胞送入流式细胞仪检测转导细胞 (NKG2D+细胞)、常规嵌合 NK 受体转导的 T 细胞和非转导 T 细胞中的 TCR $\alpha\beta$ 表达。结果表明, 在 CNK 表达盒中引入 UT 元件不会影响嵌合 NK 受体的表达。此外, 它可以显著抑制 TCR 在 CD8+和 CD4+CNK-T 细胞上的表达。

图 18 显示带有 UT 元件的 CNK-T 细胞与普通 CNK-T 细胞一样, 对肿瘤细胞显示出强大的细胞毒性。将非转基因 T 细胞、CNK-T 细胞和 CNK-UT (E19) 细胞与 HepG2 细胞以 E:T 比例=1:5 进行共培养。培养 24 小时后, 收获细胞并进行流式分析, 以检测肿瘤裂解和 T 细胞激活情况。数据表明, CNK-UT 细胞对 HepG2 细胞显示出与普通 CNK-T 细胞相当的强大细胞毒性。经过 24 小时共同培养, CD45 (-) 肿瘤细胞在 CNK-T 和 CNK-UT 的共同培养中都明显减少。此外, CD8 和 CD4 CNK-UT 细胞与 HepG2 细胞共培养后都能上调 CD25 和 CD137。

图 19 示出了四种结构的 CNK-UT 多功能复合体 (multi-functional complex), 其中, 图 19A 为基本 CNK-UT 多功能复合体; 图 19B 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 19C 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 19D 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 20 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 20A 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: DAPI10-DAPI12 ICD-T2A-NKG2D-p2A-anti-TCR-AdE3 ERAD; 如图 20B 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: DAPI10-DAPI12 ICD-T2A-NKG2D-p2A-anti-TCR-US2 ERAD; 如图 20C 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 DAPI10-CD3 ζ -T2A-NKG2D-p2A-ant-TAA scFv-DAPI10 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 20D 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 21 示出了一种 CNK-UT (DAPI10-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 22 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 22A 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 22B 示出了 CNK-UT 细胞具有对 HT29 高效的杀伤和激活功能。

图 23 示出了 CNK-UT 细胞对 MDA-MB453 的识别和特异性杀伤, 其中, 图 23A 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 23B 示出了 CNK-UT 细胞对 THP1 显示高效的杀伤和激活功能。

图 24 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。

5 图 25 示出了 GPC3 CAR/CNK-UT 细胞比 GPC3 CAR-T 具有高效的肿瘤清除能力。

具体实施方式

在更详细地描述本公开之前, 应理解, 本公开不限于所描述的特定实施方案, 因此当然可能会有变化。还应理解, 本文中使用的术语仅出于描述特定实施方案的目的, 而无意为限制性的, 因为本公开的范围将仅由所附权利要求书限制。

10 除非另有定义, 否则本文中使用的所有技术和科学术语具有与本公开所属领域的普通技术人员通常所理解的含义。尽管类似于或等同于本文描述的那些方法和材料的任何方法和材料也可以用于本公开的实践或测试中, 但是现在描述优选的方法和材料。

15 在本说明书中引用的所有出版物和专利均通过引用并入本文, 就如同每个单独的出版物或专利均被具体和单独指示为通过引用并入一般, 并且通过引用并入本文以公开和描述与所引用的出版物相关的方法和/或材料。对任何出版物的引用是针对其在申请日之前的公开内容, 不应解释为承认本公开无权凭借在先公开而早于此类出版物。此外, 提供的出版日期可能与可能需要独立确认的实际出版日期不同。

如对本领域技术人员而言, 在阅读本公开后将显而易见的是, 本文描述和说明的个别实施方案中的每一个具有离散的组件和特征, 其可以在不脱离本公开的范围或精神的情况下, 容易地与其他若干实施方案中的任何一个的特征分离或组合。任何叙述的方法可以按照叙述的事件的顺序或逻辑上可能的任何其他顺序进行。

1. 定义

20 提供以下定义以帮助读者。除非另有定义, 否则本文使用的所有技术术语、符号和其他科学或医学术语或用语旨在具有本领域技术人员通常理解的含义。在某些情况下, 为了清楚和/或易于参考, 本文定义了具有通常理解的含义的术语, 并且在本文中包括此类定义不一定应被解释为表示与本领域通常理解的术语的定义相比具有实质性差异。

25 注意, 在本公开中, 如“包含 (comprises/comprised/comprising)”、“含有 (contains/containing)”等的术语具有美国专利法中赋予的含义; 它们是包容性的或开放式的, 并且不排除额外引用的要素或方法步骤。如“基本上由……组成 (consisting essentially of/consists essentially of)”的术语具有美国专利法赋予的含义; 它们允许包括不会实质上影响要求保护的发明的基本和新颖特征的额外成分或步骤。术语“由……组成 (consists of/consisting of)”具有美国专利法赋予它们的含义; 即这些术语是封闭式。

如本文所用, 除非上下文另外明确规定, 否则单数形式“一 (a/an)”和“所述”包括复数个指代物。

30 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。

35 “抗原”是指可以被抗体特异性识别和结合的分子。在一些实施方案中, 本文所述的抗原可以是引起免疫反应的分子。这种免疫反应可以是体液反应, 或细胞介导的反应, 或两者兼有。本领域技术人员应理解, 任何大分子, 包括几乎所有的蛋白质或肽, 都可以用作抗原。显而易见, 本公开的抗原包括能够引发免疫反应的治疗性抗体。

40 “抗体”是指与抗原结合的免疫球蛋白 (Ig) 家族的多肽。例如, 天然存在的 IgG 类型的“抗体”是包含通过二硫键相互连接的至少两条重 (H) 链和两条轻 (L) 链的四聚体。每条重链由重链可变区 (本文缩写为 VH) 和重链恒定区构成。重链恒定区由三个域 CH1、CH2 和 CH3 构成。每条轻链由轻链可变区 (本文缩写为 VL) 和轻链恒定区构成。轻链恒定区由一个域 (本文缩写为 CL) 构成。VH 和 VL 区可以进一步细分为高变区, 称为互补决定区 (CDR) (轻链 CDR 包括 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3, 重链 CDR 包括 HCDR1、HCDR2、HCDR3), 其间散布着更保守的区, 称为框架区 (FR)。本文公开的抗体的 CDR 边界可以根据 Kabat、IMGT、Chothia 或 Al-Lazikani 的惯例定义或鉴定 (Al-Lazikani, B., Chothia, C., Lesk, A. M., 《分子生物学杂志》(J. Mol. Biol.), 273(4), 927(1997); Chothia, C.等人, 《分子生物学杂志》, 12 月 5 日; 186(3):651-63(1985); Chothia, C.和 Lesk, A.M., 《分子生物学杂志》, 196,901 (1987); Chothia, C.等人, 《自然》(Nature), 12 月 21-28 日; 342(6252):877-83 (1989); Kabat E.A.等人, 美国国家卫生研究院 (National Institutes of Health), Bethesda, Md. (1991); Marie-Paule Lefranc 等人, 《发育与比较免疫学》(Developmental and Comparative Immunology), 27: 55-77 (2003); Marie-Paule Lefranc 等人, 《免疫组研究》(Immunome Research), 1(3), (2005); Marie-Paule Lefranc, 《B 细胞分子生物学》(Molecular Biology of B cells) (第二版), 第 26 章, 481-514, (2015)。每个 VH 和 VL 由三个 CDR 和四个 FR 构成, 从氨基端到羧基端按以下顺序排列: FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。重链和轻链的可变区含有与抗原相互作用的结合域。

55 如本文中所使用, 抗体的“功能片段”可与“抗原结合片段”互换使用, 是指由包含一个或多个 CDR 的抗体的片段, 或与抗原结合但不包含完整的原生抗体结构的任何其它抗体部分形成的抗体片段。抗原结合片

段的实例包括但不限于双功能抗体、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fd、Fv 片段、二硫键稳定的 Fv 片段 (dsFv)、(dsFv)₂、双特异性 dsFv (dsFv-dsFv')、二硫键稳定的双功能抗体 (ds 双功能抗体)、单链抗体分子 (scFv)、scFv 二聚体 (二价双功能抗体)、多特异性抗体、骆驼化单结构域抗体、纳米抗体、结构域抗体和二价结构域抗体。抗原结合片段能够与亲本抗体所结合的相同抗原结合。在某些实施方式中，抗原结合片段可包含一个或多个来自特定亲本抗体的 CDR。

关于抗体的“Fab”是指抗体的单价抗原结合片段，其由单条轻链（可变区和恒定区）通过二硫键与单条重链的可变区和第一恒定区结合而成。可通过在接近铰链区的重链之间的二硫键的 N 端的残基处木瓜蛋白酶消化抗体来获得 Fab。

“Fab”是指包括铰链区的一部分的 Fab 片段，其可通过在接近铰链区的重链之间的二硫键的 C 端的残基处胃蛋白酶消化抗体而获得，且因此在铰链区中的少量残基（包括一个或多个半胱氨酸）上与 Fab 不同。

“F(ab')₂”是指 Fab' 的二聚体，其包含两条轻链和两条重链的一部分。

关于抗体的“Fv”是指最小的带有完整抗原结合位点的抗体片段。Fv 片段由结合于单条重链的可变区的单条轻链的可变区组成。“dsFv”是指二硫键稳定的 Fv 片段，其中在单条轻链的可变区与单条重链的可变区之间的键联是二硫键。

“单链 Fv 抗体”或“scFv”是指由轻链可变区和重链可变区直接或经由肽接头序列彼此连接组成的工程改造抗体 (Huston JS 等人《美国国家科学院院刊 (Proc Natl Acad Sci USA)》, 85:5879(1988))。“scFv 二聚体”是指包含具有接头的两个重链可变区和两个轻链可变区的单链。在某些实施方式中，“scFv 二聚体”为二价双功能抗体或二价 scFv (BsFv)，其包含 VH-VL (由肽接头连接) 与另一个 VH-VL 部分二聚，使得一个部分的 VH 与另一个部分的 VL 配位且形成可靶向相同抗原 (或表位) 或不同抗原 (或表位) 的两个结合位点。在其它实施方式中，“scFv 二聚体”为双特异性双功能抗体，其包含 VH1-VL2 (由肽接头连接) 与 VL1-VH2 (也由肽接头连接) 结合，使得 VH1 与 VL1 配位且 VH2 与 VL2 配位并且每个配位对具有不同的抗原特异性。

“单链 Fv-Fc 抗体”或“scFv-Fc”是指由连接到抗体的 Fc 区的 scFv 组成的工程改造抗体。

“骆驼化单结构域抗体”、“重链抗体”、“纳米抗体”或“HCAb”是指含有两个 VH 结构域且不含轻链的抗体 (Riechmann L. 和 Muyldermans S., 《免疫学方法杂志 (J Immunol Methods)》, 12 月 10 日;231(1-2):25-38 (1999); Muyldermans S., 《生物技术杂志 (J Biotechnol)》, 6 月;74(4):277-302 (2001); WO94/04678; WO94/25591; 美国专利第 6,005,079 号)。重链抗体最初是从骆驼科 (Camelidae) (骆驼、单峰驼和美洲驼) 获得的。虽然不含轻链，但骆驼化抗体具有真实的抗原结合谱系 (Hamers-Casterman C. 等人, 《自然》, 6 月 3 日;363(6428):446-8 (1993); Nguyen VK. 等人, “骆驼科的重链抗体; 进化创新的案例 (Heavy-chain antibodies in Camelidae; a case of evolutionary innovation)”, 《免疫遗传学 (Immunogenetics)》, 4 月;54(1):39-47 (2002); Nguyen VK. 等人, 《免疫学 (Immunology)》, 5 月;109(1):93-101 (2003))。重链抗体的可变结构域 (VHH 结构域) 代表由适应性免疫反应产生的已知最小的抗原结合单元 (Koch-Nolte F. 等人, 《美国实验生物学学会联合会杂志 (FASEB J.)》, 11 月;21(13):3490-8, 电子版 2007 年 6 月 15 日(2007))。“双功能抗体”包括具有两个抗原结合位点的小抗体片段，其中所述片段包含在单一多肽链中连接到 VL 结构域的 VH 结构域 (VH-VL 或 VL-VH) (参见例如 Holliger P. 等人, 《美国国家科学院院刊》, 7 月 15 日;90(14):6444-8 (1993); EP404097; WO93/11161)。因为接头太短，所以同一条链上的两个结构域无法配对，因此，迫使所述结构域与另一条链的互补结构域配对，从而产生两个抗原结合位点。抗原结合位点可靶向相同或不同的抗原 (或表位)。

“结构域抗体”是指仅含有重链的可变区或轻链的可变区的抗体片段。在某些实施方式中，两个或更多个 VH 结构域通过肽接头共价接合以形成二价或多价结构域抗体。二价结构域抗体的两个 VH 结构域可靶向相同或不同的抗原。

在某些实施方式中，“(dsFv)₂”包含三条肽链：两个 VH 部分通过肽接头连接，且通过二硫桥与两个 VL 部分结合。

在某些实施方式中，“双特异性 ds 双功能抗体”包含经由 VH1 与 VL1 之间的二硫桥与 VL1-VH2 (也由肽接头连接) 结合的 VH1-VL2 (由肽接头连接)。

在某些实施方式中，“双特异性 dsFv”或“dsFv-dsFv”包含三条肽链：VH1-VH2 部分，其中重链由肽接头 (例如，长柔性接头) 结合，并且经由二硫桥分别与 VL1 和 VL2 部分配对。每条二硫键配对的重链和轻链具有不同的抗原特异性。

“自体细胞”是指对于该细胞的接受者而言，来源于同一个体 (即该接受者本身) 的任何细胞。

“同种异体细胞”是指对于该细胞的接受者而言，来源于相同物种的其他个体 (即非该接受者本身) 的任何细胞。

如本文所使用的“构建体”与“蛋白构建体”可以互换使用，是指蛋白或蛋白复合体。术语“复合体”是指超过 1 个蛋白 (例如，2 个、3 个、4 个或更多个蛋白) 聚集或组装形成的聚集集体或者组装体。优选地，复合体能够发挥其中的单个蛋白不能发挥的功能。在复合体中，组成蛋白之间可以相互接触，也可以不相互接触。

如本文中所使用的术语“嵌合”，当与构建体相关时，是指构建体的一部分来源于一个物种，而构建体的另一部分来源于其他物种。

如本文所用，术语“载体”是指可以将编码蛋白质的多核苷酸可操作地插入其中以引起所述蛋白质表达的媒介物。载体可用于转化、转导或转染宿主细胞，以使其携带的基因元件在宿主细胞内表达。载体的实例包括质粒；噬菌粒；粘粒；人工染色体，如酵母人工染色体（YAC）、细菌人工染色体（BAC）或 P1 衍生的人工染色体（PAC）；噬菌体，如 λ 噬菌体或 M13 噬菌体；和动物病毒。用作载体的动物病毒的类别包括逆转录病毒（包括慢病毒）、腺病毒、腺相关病毒、疱疹病毒（例如单纯疱疹病毒）、痘病毒、杆状病毒、乳头瘤病毒和乳多空病毒（例如 SV40）。载体可以含有多种用于控制表达的元件，包括启动子序列、转录起始序列、增强子序列、选择元件和报告基因。另外，载体可以含有复制起点。载体还可以包括有助于其进入细胞的材料，包括但不限于病毒颗粒、脂质体或蛋白质涂层。载体可以是表达载体或克隆载体。本公开提供载体（例如表达载体），其含有本文所提供的编码嵌合蛋白构建体的核酸序列、可操作地连接到所述核酸序列的至少一个启动子（例如 SV40、CMV、EF-1 α ）和/或至少一个选择标记。载体的实例包括但不限于逆转录病毒（包括慢病毒）、腺病毒、腺相关病毒、疱疹病毒（例如单纯疱疹病毒）、痘病毒、杆状病毒、乳头瘤病毒、乳多空病毒（例如 SV40）、 λ 噬菌体和 M13 噬菌体、质粒 pcDNA3.3、pMD18-T、pOptivec、pCMV、pEGFP、pIRES、pQD-Hyg-GSeu、pALTER、pBAD、pDNA、pCal、pL、pET、pGEMEX、pGEX、pCI、pEGFT、pSV2、pFUSE、pVITRO、pVIVO、pMAL、pMONO、pSELECT、pUNO、pDUO、Psg5L、pBABE、pWPXL、pBI、p15TV-L、pPro18、pTD、pRS10、pLexA、pACT2.2、pCMV-SCRIPT.RTM、pCDM8、pCDNA1.1/amp、pcDNA3.1、pRc/RSV、PCR 2.1、pEF-1、pFB、pSG5、pXT1、pCDEF3、pSVSPORT、pEF-Bos 等。

如本文所用，短语“宿主细胞”是指已或将或者待将外源多核苷酸和/或载体引入其中的细胞。

如本文中所使用的术语“功能变体”是指与亲本多肽/蛋白具有至少 70% 序列同一性但仍然保持亲本多肽/蛋白的功能的多肽/蛋白。变体与亲本多肽/蛋白的不同之处可在于一个或多个氨基酸残基。举例来说，功能变体可具有亲本多肽/蛋白的一个或多个氨基酸残基的取代、添加、缺失、插入或截短。

在本申请中，多肽或多核苷酸的“同一性”或“序列同一性”的百分比是通过在比较窗口中比较两个最佳比对的序列来确定的，其中多核苷酸或多肽序列在比较窗口中的部分可能包括与参考序列（其不包括添加或缺失）相比的添加或缺失（即间隙），以便对两个序列进行最佳比对。如下计算百分比：确定两个序列中出现相同的核酸碱基或氨基酸残基的位置数，得出匹配的位置数，用匹配的位置数除以比较窗口中的总位置数，并且将结果乘以 100，得出序列同一性的百分比。出于确定氨基酸（或核酸）序列一致性%的目的进行的比对可例如使用可公开获得的工具，如 BLASTN、BLASTp（可在美国国家生物技术信息中心（NCBI）的网站上获得，另参见 Altschul S.F. 等人，《分子生物学杂志》，215:403-410 (1990)；Stephen F. 等人，《核酸研究（Nucleic Acids Res.）》，25:3389-3402 (1997)）、ClustalW2（可在欧洲生物信息研究所（European Bioinformatics Institute）的网站上获得，另参见 Higgins D.G. 等人，《酶学方法（Methods in Enzymology）》，266:383-402 (1996)；Larkin M.A. 等人，《生物信息学（Bioinformatics）》（英格兰牛津（Oxford, England）），23(21):2947-8 (2007)）和 ALIGN 或 Megalign（DNASTAR）软件实现。本领域的技术人员可使用所述工具提供的默认参数，或可自定义适于比对的参数，例如通过选择合适算法进行。在某些实施方式中，不相同的残基位置可通过保守氨基酸取代而不同。“保守氨基酸取代”为其中氨基酸残基被具有类似化学特性（例如，电荷或疏水性）的侧链（R 基团）的另一个氨基酸残基取代的保守氨基酸取代。一般来说，保守氨基酸取代不会基本上改变蛋白质的功能特性。在两个或更多个氨基酸序列因保守取代而彼此不同的情况下，百分比或类似性程度可以向上调整以校正取代的保守性质。进行这种调整的方式为本领域的技术人员众所周知的。参见例如 Pearson (1994) 《分子生物学方法（Methods Mol. Biol.）》24: 307-331，其以引用的方式并入本文中。

“可操作地连接”是指两个或更多个多核苷酸序列之间的功能关系。在编码融合蛋白（如本公开的 CAR 的多肽链）的多核苷酸的上下文中，该术语是指两个或更多个多核苷酸序列接合，使得这两个多核苷酸保持在同一个表达框内，使得其能够翻译出一条氨基酸序列。在转录或翻译调节的上下文中，该术语是指调节序列与编码序列的功能关系，例如，启动子在编码序列的正确位置和方向上，以便调节转录。

“多核苷酸”或“核酸”是指核苷酸链。如本文所用，多核苷酸包括通过本领域可用的任何手段获得的所有多核苷酸序列，所述手段包括但不限于重组手段和合成手段。

“多肽”和“蛋白质”可互换使用，是指通过肽键共价连接的氨基酸残基链。多肽包括天然肽、重组肽、合成肽或其组合。

“T 细胞受体”或“TCR”是指 T 细胞表面上的蛋白质复合物，其负责识别作为与 MHC 分子结合的肽的抗原片段。

术语“嵌合自然杀伤受体”（chimeric natural killer receptor, CNK 受体）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“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、淋巴毒素 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 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变化, 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。

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。

“有效量”或“治疗有效量”是指有效实现所需生物学结果的在此描述的细胞、组合物、制剂或任何材料的量。此类结果可包括但不限于消除表达特定 B 细胞受体 (BCR) 的 B 细胞和由此产生的抗体。

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“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。

II. 靶向蛋白降解 (Target Protein Degradation, TPD)

本发明提供了一种新的靶向蛋白降解系统，其用于靶向特定蛋白质（即靶蛋白）以阻断其表达（例如，表面表达）并通过内质网相关降解（ER-associated degradation, ERAD）机制加速泛素化介导的降解。

内质网相关蛋白质降解(ERAD)是指靶向内质网中错误折叠的蛋白质进行泛素化并且随后通过蛋白酶体降解的细胞通路。ERAD 的过程可分为三个步骤：(1) 识别内质网中错误折叠或突变的蛋白质；(2) 将识别的错误折叠或突变的蛋白质从内质网反向转运至细胞质中：末端错误折叠的蛋白质必须从内质网转运回细胞质中，而细胞质中包含泛素-蛋白酶体系统(ubiquitin-proteasome system, UPS)；(3) 用蛋白酶体对识别的错误折叠或突变的蛋白质进行泛素依赖的降解（参见 Annamaria et al., ER-associated degradation: Protein quality control and beyond. J. Cell Biol. Vol. 204 No. 6 869-879）。

在这里，本申请提供了一种新的嵌合策略，将靶向结构域（比如特异性蛋白靶向抗体片段(ScFv)）融合 ERAD 功能基序（比如病毒 ER 驻留蛋白 TMD 和 ED 返回信号域），并且证明了该策略可以有效地抑制特定蛋白的表达（例如，特定蛋白在细胞表面的表达）。

本申请提供的 ER-TPD 技术平台相比已有的蛋白降解/去除技术（例如，PROTAC、CRISPR 等）具有以下优势：1. ER-TPD 嵌合蛋白构建体通过载体（例如脂质体、纳米颗粒、慢病毒、腺病毒、溶瘤病毒等）递送至细胞内稳定表达发挥功能，相比 PROTAC，不存在细胞通透性低和半衰期短导致降解效率低下的问题；2. ER-TPD 技术基于内质网的 ERAD 原理，在内质网蛋白合成组装过程中直接干预蛋白合成并实现高效降解，因此 ER-TPD 技术比外源 PROTAC 技术具有更高效的降解效率；3. 外源性 PROTAC 无法有效降解膜蛋白及分泌型蛋白，而 ER-TPD 内质网蛋白合成组装过程中能直接靶向滞留细胞膜蛋白和分泌型蛋白并实现降解，因此 ER-TPD 可以靶向大量常规 TPD 技术无法靶向的重要疾病相关的靶蛋白，为疾病治疗提供全新的药物开发途径；4. ER-TPD 设计方式中，靶向结构域可以采用各类单抗抗体结构或人工亲和配体结构，大大提高对靶蛋白的特异精准识别和结合能力；而常规的 PROTAC 技术采用小分子的化学结构很难保证靶向结构的特异性，因此 ER-TPD 技术具有靶向精确性和特异性的强大优势；5. ER-TPD 技术可通过下游降解导向配体结构实现目标蛋白降解的多通路机制，包括基于泛素蛋白酶体的 UPS 机制和自噬溶酶体的 ALP 机制，下游降解导向配体结构设计可以通过基因工程方法，灵活机动的连接细胞内的降解系统，实现高效靶向降解，而常规 PROTAC 技术只能通过靶向 E3 连接酶而实现降解；6. ER-TPD 技术在蛋白层面降解靶蛋白，相比在基因层面阻断靶蛋白表达的技术（例如 CRISPR 技术）而言不存在因脱靶效应或基因编辑过程而导致的染色体不稳定性等毒副作用；7. ER-TPD 技术可以与基因和细胞治疗技术完美联合，大大扩展了目前基因和细胞治疗的临床适应症，并增强临床效果；8. 基于 ER-TPD 技术开发靶向降解药物的可行性强，周期短，基于 ER-TPD 技术的核酸和细胞药物更容易实现规模化和工业化生产，是新型药物开发的重要基础性平台技术。

在一方面，本公开提供了一种基于内质网的靶向蛋白降解技术（Endoplasmic Reticulum-based Targeted Protein Degradation, ER-TPD）的嵌合蛋白构建体（chimeric protein construct），其包含内质网相关降解（ER-associated degradation, ERAD）机制蛋白结合结构域和靶向结构域。

在某些实施方式中，所述嵌合蛋白构建体进一步包含蛋白降解通路成员（例如泛素-蛋白酶体系统通路成员、内体-溶酶体通路成员、自噬通路成员）结合结构域。所述蛋白降解通路成员结合结构域可以以任何合适的方式连接至所述嵌合蛋白构建体的组成元件，例如，与所述 ERAD 机制蛋白结合结构域连接。

在另一方面，本公开还提供了组合物文库，其中每种组合物包含病毒蛋白质或编码其的核酸分子，其包含能够劫持 ERAD 机制以在 ER 内阻滞并加速蛋白酶体介导的降解的功能基序和靶向特定蛋白质进行降解的亲合部分，为了治疗目的用于修饰细胞表型、改善细胞功能或诱导凋亡或抑制病毒复制。

1. ERAD 机制蛋白结合结构域

如在本文中所使用的术语“ERAD 机制蛋白”指参与 ERAD 机制或通路的蛋白。术语“ERAD 机制蛋白结合结构域”，也称为“ERAD 降解结构域”，指能够结合和/或利用 ERAD 机制蛋白的部分或结构域，例如，病毒内质网（ER）驻留糖蛋白的跨膜结构域（或其功能变体）以及胞质结构域（或其功能变体），该胞质结构域也称为“内质网驻留结构域”或“ER 驻留结构域”。

在一些实施方案中，所述 ERAD 机制蛋白结合结构域包含病毒内质网驻留蛋白的跨膜结构域或其功能变体和内质网驻留结构域或其功能变体。在一些实施方案中，病毒的 ER 驻留糖蛋白可以是任何病毒的 ER 驻留蛋白，它能够劫持 ERAD 机制并促进对靶蛋白的泛素化和蛋白酶体介导的降解。

i. 衍生自腺病毒 E3-19K 的 ERAD 机制蛋白结合结构域

在一些实施方案中，所述病毒内质网驻留蛋白为腺病毒 E3-19K。腺病毒 E3-19K（也称为“E19”）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、跨膜结构域和内质网驻留结构域，其中其内质网驻留结构域包含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，因此也可称为“ER 返回信号基序”。研究表明，需要跨膜结构域和 ER 返回信号基序来确保有效的 ER 定位、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）的转运抑制以及蛋白酶体降解。因此，腺病毒 E3-19K 可以在分泌途径中驻留 MHC I 类分子（例如，MHC-I 和 MICA/B 分子）并干扰抗原呈递。本公开提供的嵌合蛋白构建体利用前病毒 E3-19K 的跨膜结构域和内质网驻留结构域（即 ERAD 降解结构域）与靶向蛋白结合结构域融合，从而实现靶蛋白降解的目的。

在一些优选的实施方案中，所述腺病毒 E3-19K 的 ERAD 降解结构域包含与 SEQ ID NO. 60 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。所述腺病毒 E3-19K 的 ERAD 降解结构域具有细胞质尾中的二赖氨酸基序, 能够将高尔基体返回到内质网。在一些优选的实施方案中, 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。

5 ii. 衍生自其他病毒糖蛋白的 ERAD 机制蛋白结合结构域

在一些实施方案中, 所述病毒内质网驻留蛋白不是腺病毒 E3-19K。

在一些实施方案中, 所述病毒内质网驻留蛋白选自以下的至少一种: HCMV 糖蛋白 US2、US11、US3、US10、US6、HSV ICP47、CPXV12、BHV UL49.5、EBV BNFL2a、HCMV UL16、UL141、UL142、HIV Nef、HIV Vpu、HHV-7 U21、HHV-8 KK3、HHV-8 KK5、MHV-68 MK3、HTLV-1 p12 和 Cowpox Virus 蛋白 CPXV203。在一些实施方案中, 所述病毒内质网驻留蛋白包含 HCMV 糖蛋白 US2 和 US11。

在一些实施方案中, 所述病毒内质网驻留蛋白包含 E3-19K 以及选自以下的至少一种: HCMV 糖蛋白 US2、US11、US3、US10、US6、HSV ICP47、CPXV12、BHV UL49.5、EBV BNFL2a、HCMV UL16、UL141、UL142、HIV Nef、HIV Vpu、HHV-7 U21、HHV-8 KK3、HHV-8 KK5、MHV-68 MK3、HTLV-1 p12 和 Cowpox Virus 蛋白 CPXV203。

15 HIV-1 病毒的 Vpu 蛋白是 ER 膜上的一种蛋白, 并且靶向内质网中新生成的 CD4 用于被细胞质内的蛋白酶体降解。Vpu 蛋白主要通过 SCF β -TrCP 依赖的泛素化和跨膜结构域(TMD)相互作用在 ER 中保留 CD4。

20 a) HCMV US2 和 US11

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 MHC I 类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。

25 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)和细胞质结构域(CT)与 ERAD 机制或途径的细胞成分相互作用, 并有助于易位和促进 MHC I 类和 II 类这两种蛋白的酶解 (Chevalier *MS* 等人, 2002, 2003)。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 易位复合物 (US2-dependent MHC I dislocation complex) 的必要成分 (Loureiro *J et al.*, 2006), 对于 US2 依赖性 MHC 重链易位是必要的 (参见 Joana *et al.*, *Signal peptide peptidase is required for dislocation from the endoplasmic reticulum. Nature volume 441, pages 894–897 (2006)*)。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 (Stagg *HR et al.*, 2009)。

35 相比之下, US11 诱导的 MHC-I 分子降解需要 Derlin-1 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 (Lilley *B N et al.*, 2004; Cho *S et al.*, 2013), 然后诱导它们易位到胞质溶胶以进行蛋白酶体降解。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 Ubc2J2 在 US11 诱导降解之前泛素化 MHC-I。

40 在一些优选的实施方案中, 所述 HCMV 糖蛋白 US2 的 ERAD 降解结构域包含与 SEQ ID NO. 48 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, 并具有内质网驻留的功能。在一些实施方案中, 所述 HCMV 糖蛋白 US2 的 ERAD 降解结构域的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 48 所示。

45 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, 并具有内质网驻留的功能。在一些实施方案中, 所述 US2 的 ERAD 降解结构域的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 76 所示。

50 在一些优选的实施方案中, 所述 HCMV 糖蛋白 US11 的 ERAD 降解结构域包含与 SEQ ID NO. 54 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, 并具有内质网驻留的功能。在一些实施方案中, 所述 HCMV 糖蛋白 US11 的 ERAD 降解结构域的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 54 所示。

55 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, 并具有内质网驻留的功能。在一些实施方案中, 所述 US11 的 ERAD 降解结构域的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 82 所示。

b) HCMV US3

HCMV 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 ER 中并抑制不变链与 ER 中 II 类 DR- $\alpha\beta$ 二聚体的结合,导致 II 类复合物的错误定位和减少的肽负载。因此,在 HCMV 感染的早期阶段,US3 能够干扰 MHC I 类分子的细胞内转运和成熟。US3 是一种内质网驻留膜蛋白。结构域交换实验表明,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。

在一些优选的实施方案中,所述 HCMV 糖蛋白 US3 的 ERAD 降解结构域包含与 SEQ ID NO. 51 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,并具有内质网驻留的功能。在一些实施方案中,所述 HCMV 糖蛋白 US3 的 ERAD 降解结构域的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 51 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,并具有内质网驻留的功能。在一些实施方案中,所述 US3 的 ERAD 降解结构域的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 79 所示。

c) HCMV US10

HCMV US10 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。

在一些优选的实施方案中,所述 HCMV 糖蛋白 US10 的 ERAD 降解结构域包含与 SEQ ID NO. 57 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,并具有内质网驻留的功能。在一些实施方案中,所述 HCMV 糖蛋白 US10 的 ERAD 降解结构域的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 57 所示。

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

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 均抑制猴、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 的亲合力比小鼠 TAP 的亲合力高约 100 倍。ICP47 抑制肽与 TAP 的结合,但不影响 ATP 结合。ICP47 对 TAP 的亲合力比大多数肽高 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。

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,并具有内质网驻留的功能。在一些实施方案中,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 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,并具有内质网驻留的功能。在一些实施方案中,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 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,并具有内质网驻留的功能。在一些实施方案中,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 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 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,并具有内质网驻留的功能。在一些实施方案中,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 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 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, 并具有内质网驻留的功能。在一些实施方案中, 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。

- 5 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。

10 **e) 其他**

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, 并具有内质网驻留的功能。在一些实施方案中, 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。

- 15 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。

- 20 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, 并具有内质网驻留的功能。在一些实施方案中, 所述 HCMV UL16 的 ERAD 降解结构域的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 85 所示。

- 25 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。

- 30 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, 并具有内质网驻留的功能。在一些实施方案中, 所述 HCMV UL141 的 ERAD 降解结构域的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 88 所示。

- 35 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。

- 40 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, 并具有内质网驻留的功能。在一些实施方案中, 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。

- 45 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, 并具有内质网驻留的功能。在一些实施方案中, 所述 HIV Nef 的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 92 所示。

- 50 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。

- 55 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, 并具有内质网驻留的功能。在一些实施方案中, 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, 并具有内质网驻留的功能。在一些实施方案中, 所述 HHV-8 KK3 的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 94 所示。

- 55 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,并具有内质网驻留的功能。在一些实施方案中,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,并具有内质网驻留的功能。在一些实施方案中,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,并具有内质网驻留的功能。在一些实施方案中,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,并具有内质网驻留的功能。在一些实施方案中,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。

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,并具有内质网驻留的功能。在一些实施方案中,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。

2. 靶向结构域

本公开提供的嵌合蛋白构建体的靶向结构域(target binding domain)可以是识别并结合靶蛋白的任何结构,例如抗体、抗体片段、从天然蛋白衍生的功能基序(例如,天然配体)、人工合成的对靶蛋白有亲和力的多肽或蛋白,或者上述分子的突变体、融合体、截短体等各种变体形式。例如,靶向结构域可以为靶蛋白的天然配体、特异性识别靶蛋白的抗体或其抗原结合片段,也可以是能够被抗体特异性识别的抗原。

在一些实施方案中,所述靶向结构域包含特异性靶向靶蛋白的抗体或其功能片段(例如,双功能抗体、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fd、Fv 片段、二硫键稳定的 Fv 片段(dsFv)、(dsFv)₂、双特异性 dsFv(dsFv-dsFv')、二硫键稳定的双功能抗体(ds 双功能抗体)、单链抗体分子(scFv)、scFv 二聚体(二价双功能抗体)、Fv(scFv)、多特异性抗体(例如,双特异性抗体)、骆驼化单结构域抗体(例如,VHH)、纳米抗体、结构域抗体、二价结构域抗体、双链抗体、三链抗体和四链抗体。所述靶向蛋白结构域还可以包含任何能够结合靶蛋白的结合配体,包括但不限于,配体、受体中结合配体的部分、病毒蛋白中结合宿主蛋白的部分等。

靶蛋白可以是其水平或活性期望被调节的任何蛋白,例如,通过 ERAD 机制改变活性以阻滞 ER 中的蛋白质并加速蛋白酶体介导的降解,其降解可以改变细胞的表型、提高细胞功能、引起细胞凋亡和/或抑制病毒复制等,从而起到治疗性目的(例如,提高疗效、降低副作用等)。在一些实施方案中,靶蛋白可以是参与细胞周期、凋亡、信号转导、细胞分化、细胞去分化、细胞生长、细胞因子或其生物调节剂的产生、细胞因子或生物调节剂的产生、调节或功能蛋白的产生、促炎信号传导或葡萄糖调节途径的蛋白。

在另一个实施方案中,靶蛋白是疾病相关蛋白(也称为“致病蛋白”),本文中所述的“疾病相关蛋白”或“致病蛋白”指任何其功能或活性的改变将导致疾病的发生,或者其功能对于疾病的发展而言比较重要的蛋白,示例性致病蛋白包括但不限于致癌蛋白、病毒蛋白、致自身免疫性疾病蛋白(例如,浆细胞产生的抗体)。

在一些实施方案中,所述靶蛋白选自:免疫功能相关的靶蛋白、神经系统疾病相关的靶蛋白、感染类疾病相关的靶蛋白(例如病毒感染类相关的靶蛋白)、自身抗原相关的靶蛋白或肿瘤相关的靶蛋白(或致癌蛋白)、代谢疾病相关的靶蛋白。

在一些实施方案中,所述致病蛋白为致癌蛋白。所述致癌蛋白可以由致癌基因编码,其包括但不限于 BCL2、c-MYC、Ras、HER2、BCR/ABL、ABL1/BCR、TGFB1、TLX1、P53、WNT1、WNT2、WT1、 α - β 3、PKCa、ABL、BCL1、CD24、CDK4、EGFR/ERBB-1、HSTF1、INT1/WNT1、INT2、MDM2、

MET、MYB、MYC、MYCN、MYCL1、RAF1、NRAS、REL、AKT2、APC、BCL2-ALPHA、BCL2-BETA、BCL3、BCR、BRCA1、BRCA2、CBL、CCND1、CDKN1A、CDKN1C、CDKN2A、CDKN2B、CRK、CRK-II、CSF1R/FMS、DBL、DDOST、PMS-2、PRAD-1、RAF、RHOM-1、RHOM-2、SIS、TAL2、TANI、TIAM1、TSC2、TRK、TSC1、STK11、PTCH、MEN1、MEN2、P57/KIP2、PTEN、HPC1、ATM、XPA/XPG、BCL6、DEK、AKAP13、CDH1、BLM、EWSR1/FLI1、FES、FGF3、FER、FGR、FLI1/ERGB2、FOS、FPS/FES、FRA1、FRA2、FYN、HCK、HEK、HER3/ERBB-2、ERBB-3、HER4/ERBB-4、HST2、INK4A、INK4B、JUN、JUNB、JUND、KIP2、KIT、KRAS2A、KRAS2B、LCK、LYN、MAS、MAX、MCC、MLH1、MOS、MSH2、MYBA、MYBB、NF1、NF2、P53、PDGFB、PIM1、PTC、RBI、RET、ROS1、SKI、SRC1、TALI、TGFB2、THRA1、THRB、TIAM1、TRK、VAV、VHL、WAF1、WNT2、WT1、YES1、ALK/NPM1、AM1、AXL、FMS、GIP、GLI、GSP、HOX11、HST、IL3、INT2、KS3、K-SAM、LBC、DCC、DPC4/SMAD4、E-CAD、E2F1/RBAP、ELK1、ELK3、EPH、EPHA1、E2F1、EPHA3、ERG、ETS1、ETS2、LMO-1、LMO-2、L-MYC、LYL1、LYT-10、MDM-2、MLH1、MLL、MLM、N-MYC、OST、PAX-5、PMS-1、FGF4、FGF6、FANCA、FLI1/ERGB2、FOSL1、FOSL2、GLI、HRAS1、HRX/MLLT1、HRX/MLLT2、KRAS2、MADH4、MASI、MCF2、MLLT1/MLL、MLLT2/HRX、MTG8/RUNX1、MYCLK1、MYH11/CBFB、NFKB2、NOTCH1、NPM1/ALK、NRG/REL、NTRK1、PBX1/TCF3、PML/RARA、PRCA1、RUNX1、RUNX1/CBFA2T1、SET、SHP2、TCF3/PBX1、TNFa、Clusterin、Survivin、TOE β 、c-fos、c-SRC 和 INT-1。在某些实施方式中，所述致癌蛋白可以是 Bcl-2 家族成员(如：Bcl-2、Bcl-xL and Bcl-w)、VEGF/VEGFR、PDGFR β 、EGFR、EGFR 突变体、IGF-1R、HDACs、HER2、MYC、KRAS、AFP、CEA、CA199、雌激素受体(estrogen receptor ER- α)、雄激素受体(Androgen receptor, AR)、酪氨酸激酶(c-ABL、BCR-ABL、BTK、FAK、PTK6、Wee1、TRK 跨膜受体)、丝/苏氨酸激酶受体(IRAK4、LRRK2、B-Raf、RIPK2、CDK4/6、CDK7、CDK8、CDK8/19、CDK9、TBK1)、蛋白激酶II(CK2)、表观遗传相关蛋白(BRD2、BRD3、BRD4、BRDT、TRIM24、BRD9、PBRM1、SMARCA2、SMARCA4、EP300、EZH2、WDR5)、肾上腺髓质素(ADM)、DPP3。

在一些实施方案中，所述靶蛋白包括免疫功能相关蛋白。如本文中所使用的术语“免疫功能相关蛋白”指参与机体免疫过程的功能蛋白，例如抗原呈递分子(例如 MHC I 类分子、MHC II 类分子、HLA 等)、抗原识别分子(例如 TCR、CD123、NKG2D 等)、免疫检查点分子(例如 PD-1、PD-L1、CTLA4、TIM3、TIGIT、LAG3、A2AR、BTLA、IDO1、IDO2、TDO、KIR、NOX2、VISTA、SIGLEC7、PVR 等)、免疫刺激/共刺激分子(例如 CD3、CD80/86、CD28 等)，以及其他参与先天性或适应性免疫的分子。在一些实施方案中，免疫功能相关的靶蛋白包括，例如 CD123、CD7、CD5、MHC I 类分子、MHC II 类分子、非经典 MHC 分子(如 HLA-G、HLA-E)、MICA/B、ULBP1-6、IL6、IL6 受体、IL1 受体、RANKL、TGF- β 1、PD1、PD-L1、CTLA4、Tim3、LAG3、Siglec-15、TIGIT、CD47、IL4RA、CD94/NKG2A、CXCR1/2、CXCL8、CCR2/CCR5、CCR4、CXCR4、c-Rel、CCL2、CCL5、CCL20、CCL22、CSF-1、CCL2、CCL5 吡啶胺-2,3-二加氧酶(IDO)、或精氨酸酶 1(ARG1)。

在一些实施方案中，所述靶蛋白包括神经系统疾病相关的靶蛋白。如本文中所使用的术语“神经系统疾病相关”指所述蛋白参与神经系统疾病，特别是在神经退行性疾病中的蛋白。在一些实施方案中，所述神经系统疾病相关的靶蛋白包括，例如，Tau、amyloid- β (A β)、 α 突触核蛋白、亨廷顿蛋白突变体(mutant huntingtin, mHTT)、 α -synuclein、TAR RNA 结合蛋白(TARDBP)和 FUS RNA 结合蛋白(FUS)。

在一些实施方案中，所述靶蛋白包括病毒感染相关的靶蛋白。所述病毒感染相关的靶蛋白包括，例如，HBV 编码 X 蛋白(HBx)、HBV DNA 聚合酶、HBV 衣壳糖蛋白、HIV-1 逆转录酶、HIV gp120、HCV NS3-4A 蛋白酶、HCV RNA 聚合酶、HCV 包膜(envelope)蛋白、EBV DNA 聚合酶、EBV EBNA1、冠状病毒 RNA 合成酶、冠状病毒刺突蛋白、冠状病毒包膜蛋白、冠状病毒膜蛋白、冠状病毒核壳蛋白、RNA 依赖性 RNA 聚合酶(RNA-dependent RNA polymerase, RdRp)，如新冠病毒 RNA 依赖性 RNA 聚合酶、疱疹病毒(Herpesviruses) DNA 和 RNA 聚合酶、疱疹病毒衣壳糖蛋白、CMV DNA 聚合酶、CMV 衣壳糖蛋白、RSV 表膜蛋白、RSV 衣壳蛋白、RSV RNA 聚合酶、流感病毒 RNA 聚合酶、流感病毒包膜(envelope)蛋白、HPV DNA 聚合酶、HPV 衣壳蛋白。在另一个实施方案中，靶蛋白是病毒蛋白，例如 HBV 表面抗原、HBsAg、HBV 聚合酶蛋白、HIV Gag 蛋白、HIV Env 蛋白等，其功能被认为对病毒复制扩增和功能以及病毒性疾病的进展重要。

在一些实施方案中，所述靶蛋白包括自身抗原相关的靶蛋白。本领域已知多种与自身免疫疾病相关的自身抗原。例如，与 I 型糖尿病相关的自身抗原例如，胰岛细胞抗原(ICA)、胰岛素(IAA)、谷氨酸脱羧酶 65(GAD65)、胰岛瘤抗原-2(IA-2)；与类风湿性关节炎(RA)相关的自身抗原(autoantigen)例如，瓜氨酸化蛋白/肽抗体，异核糖核蛋白(heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1)、aldolase、alpha-enolase、calreticulin、热激活蛋白(HSP60)、BiP、PGK1、压力诱导磷酸蛋白(stress-induced phosphoprotein 1)、FUSE-BP1/2；与系统性红斑狼疮(SLE)相关的自身抗原例如，脱氧核糖核蛋白、SmD1 和 SmD3、Clq、抗凝物质(LA)、心磷脂(CL)、 β 2 糖蛋白 I(β 2 GPI)、凝血酶原(PT)和磷脂酰丝氨酸(PS)；与系统性硬化症(Systemic Sclerosis, SSc)/硬皮病(scleroderma SD)相关自身抗原例如，Scl-70、

SSA、Ro52；与自身免疫性肝病相关的抗原例如，线粒体抗原、Spl00、PML、gp210、p62；与重症肌无力相关的自身抗原例如，乙酰胆碱受体；与中枢神经系统自身免疫疾病（边缘性脑炎、脑脊髓炎、小脑性共济失调）相关的自身抗原例如，电压门控性钾离子通道（VGKC）复合物、电压门控性钙离子通道受体、 α -氨基-3-羟基-5-甲基异噻唑-4-丙酸（AMPA）受体、 γ -氨基丁酸-B（GABAB）受体、甘氨酸受体；与多发性硬化相关的自身抗原例如，髓磷脂碱性蛋白（MBP）、髓磷脂少突胶质细胞糖蛋白（MOG）；与多发性肌炎（PM）和皮肌炎（DM）相关的自身抗原例如，Jo-1、Mi-2、PM-Scl、Ro-52；与麸质敏感性肠病相关的自身抗原例如，肌内膜抗体（EMA）、组织谷氨酰胺转移酶（tTG）；与抗 NMDAR 抗体脑炎相关的自身抗原例如，N-甲基-D-天冬氨酸受体；与视神经脊髓炎（NMO）相关的自身抗原例如，水通道蛋白 4（AQP4）；与生殖相关相关的自身抗原例如，卵巢抗原，精子抗原。

10 在一些实施方案中，所述致病蛋白为代谢疾病相关的靶蛋白。所述代谢疾病相关的靶蛋白例如，关于动脉粥样硬化（Atherosclerosis，AS）的靶蛋白，包括但不限于，CD36、低密度脂蛋白受体（LDLR）、ChemR23（CMKLR1）、线粒体脱氢酶（mitochondrial dehydrogenase）ALDH4A1（的靶蛋）；关于 2 型糖尿病的靶蛋白，包括但不限于，RalGAP α 1、二肽基肽酶 IV（DPP4）；关于非酒精性脂肪肝的靶蛋白，包括但不限于，TMEM16A、VAMP3；关于肿瘤糖代谢的靶蛋白，包括但不限于，己糖激酶（hexokinase，HK）、葡萄糖转运体 1（glucosetransporter 1，GLUT1）、葡萄糖转运体 4（glucose transporter 4，GLUT4）、磷酸甘油酸脱氢酶、乳酸脱氢酶；关于肿瘤脂代谢的靶蛋白，包括但不限于，ATP 柠檬酸裂解酶（ATP citrate lyase，ACLY）、脂肪酸合成酶（fatty acid synthase，FASN）、胆固醇酯化酶（acetyl-CoA acetyltransferase 1，ACAT1）。

20 在一些实施方案中，靶向结构域特异性靶向除了以下靶蛋白的其他靶蛋白：TCR、HLA-I、MICA 和 MICB，且所述病毒内质网驻留蛋白是本公开所述的任何病毒内质网驻留蛋白。

在一些实施方案中，靶向结构域特异性靶向至少 2 个以下靶蛋白：TCR、HLA-I、MICA、MICB，所述病毒内质网驻留蛋白是本公开所述的任何病毒内质网驻留蛋白。

在一些实施方案中，靶向结构域特异性靶向 TCR、HLA-I、MICA 或 MICB，且所述病毒内质网驻留蛋白不是腺病毒 E3-K19。

25 在一些实施方式中，所述嵌合蛋白构建体的靶向结构域通过铰链或接头与 ERAD 机制蛋白结合结构域相连。在一些实施方式中，所述铰链包含如 SEQ ID NO. 123（IgG4 铰链）或 SEQ ID NO. 133（Gly4Ser）2 所示的氨基酸序列。

30 在一些优选的实施方案中，所述 HCMV 糖蛋白 US2 的 HLA 结合结构域包含与 SEQ ID NO. 47 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 糖蛋白 US2 的 HLA 结合结构域的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 47 所示。

35 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 HCMV 糖蛋白 US11 的 MHC 结合结构域包含与 SEQ ID NO. 53 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 糖蛋白 US11 的 MHC 结合结构域的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 53 所示。

40 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。

45 在一些优选的实施方案中，所述 HCMV 糖蛋白 US3 的 HLA 结合结构域包含与 SEQ ID NO. 50 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 糖蛋白 US3 的 HLA 结合结构域的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 50 所示。

50 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。

55 在一些优选的实施方案中，所述 HCMV 糖蛋白 US10 的 HLA 结合结构域包含与 SEQ ID NO. 56 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 糖蛋白 US10 的 HLA 结合结构域的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 56 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。

5 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。

10 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。

15 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。

20 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。

25 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。

30 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。

35 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。

40 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。

45 在一些优选的实施方案中,所述腺病毒 E3-19K 的 MHC 结合结构域包含与 SEQ ID NO. 59 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;所述腺病毒 E3-19K 的 MHC 结合结构域的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 59 所示。

3. 蛋白降解通路成员结合结构域

本公开提供的嵌合蛋白构建体还可以包含蛋白降解通路成员结合结构域。如本文所述的“蛋白降解通路成员结合结构域”是指任何能够与蛋白降解通路中的成员直接或间接结合的部分。

45 蛋白降解通路可以是任何能够介导蛋白在细胞内降解的通路。已知的蛋白降解通路包括,但不限于,基于泛素化-蛋白酶体通路,内体-溶酶体通路,和自噬降解通路等。

泛素化-蛋白酶体通路成员包括例如, E1 泛素激活酶、E2 泛素结合酶、E3 泛素连接酶、和蛋白酶体。

E1 泛素激活酶的例子包括,例如 UBA1、UBA2、UBA3、UBA5、UBA6、UBA7、ATG7、NAE1、和 SAE1。

50 E2 泛素结合酶的例子包括,例如, hCdc34、Ubc-Uev1A、UBE2A、UBE2B、UBE2C、UBE2D1、UBE2D2、UBE2D3、UBE2D4、UBE2E1、UBE2E2、UBE2E3、UBE2F、UBE2G1、UBE2G2、UBE2H、UBE2I、UBE2J1、UBE2J2、UBE2K、UBE2L3、UBE2L6、UBE2M、UBE2N、UBE2O、UBE2Q1、UBE2Q2、UBE2R1 (CDC34)、UBE2R2、UBE2S、UBE2T、UBE2U、UBE2V1、UBE2V2、UBE2W、UBE2Z、ATG3、BIRC6、和 UFC1。

55 E3 泛素连接酶的例子包括,例如, 冯·希佩尔-林道 (von Hippel-Lindau, VHL), Cereblon (CRBN), 凋亡抑制蛋白 (inhibitor of apoptosis protein, IAP), 海螺状 ECH 相关蛋白 1 (Kelch-like ECH-associated protein 1,

Keap1), RNF4, RNF114, MDM2, LUBAC, FBW7, Met30, HECT, SKP2, beta TRCP1, HUWEI, TRAF6, SMURF1, 和 E6AP。在某些实施方案中, E3 泛素连接酶的例子包括, 例如, E3A, mdm2, Anaphase-promoting complex (APC)、UBR5 (EDD1)、SOCS/ BC-box/ eloBC/ CUL5/ RING、LNXP80、CBX4, CBL1, HACE1, HECTD1, HECTD2, HECTD3, HECTD4, HECW1, HECW2, HERC1, HERC2, HERC3, HERC4, HERC5, HERC6, HUWEI, ITCH, NEDD4, NEDD4L, PP1L2, PRPF19, PIAS1, PIAS2, PIAS3, PIAS4, RANBP2, RNF4, RBX1, SMURF1, SMURF2, STUB1, TOPORS, TRIP12, UBE3A, UBE3B, UBE3C, UBE3D, UBE4A, UBE4B, UBOX5, UBR5, VHL, WWP1, WWP2, Parkin, 和 MKRN1。

内体-溶酶体通路成员包括, 例如 AP-1、AP-2、AP-3、内体、溶酶体、HOPS、ESCRT、GASP、BLOC-1、ESCRT、Retromer、ESCRT、sortingnexin、Dapper2、SNX4、Pincher、Rap1-PDZ-GEF1、clathrin、C3G/CrkL/Shp2/Gab2 等。

自噬降解通路成员包括, 例如分子伴侣介导的自噬 (chaperone-mediated autophagy, CMA)、USP10、G3BP1、ULK1、ATG16L1、TRIM16、FBXO27VDAC、RHOT1、MFN1/2、BNIP3L、FUNDCl、BNIP3、AMBRA1、BCL2L13、FKBP8、CHDH、DISC1、PHB2、Cardiolipin、SEC62、RTN3、PEX5、PEX14、ABCD3、NUP1P1 等。

在一些实施方案中, 所述蛋白降解通路成员结合结构域是 VHL 结合结构域。在一些实施方案中, 所述 VHL 结合结构域包含如 SEQ ID NO. 119 (DRHDSGLDSM) 或如 SEQ ID NO. 120 (ALAPYIP) 的氨基酸序列。

在一些实施方案中, 所述蛋白降解通路成员结合结构域是 Keap1 结合结构域。在一些实施方案中, 所述 Keap1 结合结构域包含如 SEQ ID NO.121 (LDPETGEYL) 的氨基酸序列。

在一些实施方案中, 所述蛋白降解通路成员结合结构域是 E3 泛素连接酶结合结构域, 其包含如 SEQ ID NO. 119 (DRHDSGLDSM) 的氨基酸序列。

在一些实施方案中, 所述蛋白降解通路成员结合结构域是 CMA 结合结构域。在一些实施方案中, 所述 CMA 结合结构域包含如 SEQ ID NO. 122 (KFERQ) 的氨基酸序列。在一些实施方案中, 所述 CMA 结合结构域包含如 SEQ ID NO. 123 (KFERQKILDQRFFE) 的氨基酸序列。

在一些实施方案中, 所述蛋白降解通路成员结合结构域是蛋白酶体结合结构域。在一些实施方案中, 所述蛋白酶体结合结构域选自: 酵母 Rad23 (例如, *S. cerevisiae* Rad23)、人 Rad23b (hHR23b) 的类泛素 (ubiquitin-like, Ubl) 结构域、HPV E7、锚蛋白的蛋白酶体结合结构域。在一些实施方案中, 所述蛋白酶体结合结构域包含酵母 Rad23 的第 1-77 位氨基酸。在一些实施方案中, 所述蛋白酶体结合结构域包含人 Rad23b 的第 1-83 位氨基酸。

本申请发明人发现, 相比基础的 TPD 设计(Targeted protein binding domain-Transmembrane domain-ER retention domain, TBD-TMD-ERD), 包含蛋白降解通路成员结合结构域(ligand for E3 Ligase (E3L), ligand for E2 Ubiquitin-conjugating enzyme (E2L) 或 ligand for lysosome (LL)) (例如, 如上所述的那些) 的嵌合蛋白构建体对靶蛋白的降解效果具有显著提升。来自病毒 ER 驻留蛋白的功能结构和 ERAD 逆转运器复合物的结合能力不同, 天然结构与 ER 驻留的 E3 ligase 相互作用也存在差异性, 同时还要和内质网内正常的错误折叠蛋白 ERAD 机制降解途径竞争, 所以, 天然的 TMD-ERD 的结构域对靶蛋白的泛素化和降解能力存在差异性和局限性, 为了进一步提高靶蛋白的降解效率, 引入泛素-蛋白酶体系统 (UPS) 配体结构域和/或自噬-溶酶体途径 (ALP) 配体结构域能进一步促进转运到胞质内的靶蛋白的泛素化后和蛋白酶体降解或转运到溶酶体实现靶蛋白高效水解。

在一些实施方式中, 所述嵌合蛋白构建体的靶向结构域或 ERAD 机制蛋白结合结构域通过铰链或接头与蛋白降解通路成员结合结构域相连。铰链或接头可以是一个或多个分子序列结构 (Glyx Scry)_n, 其中 n 可以是 1 到 10 的数字, 而 x, y 可以分别为 0 到 10 的数字, 但 x, y 不能同时为 0。在一些实施方式中, 所述铰链包含如 SEQ ID NO. 172 (IgG4 铰链) 或 SEQ ID NO. 173 ((Gly4Ser)₂) 所示的氨基酸序列。

4. TPD 嵌合蛋白构建体

在一些实施方案中, 本公开提供的嵌合蛋白构建体包含靶向 TCR 的靶向蛋白结合结构域和腺病毒 E3-19K 以及一个或多个上文所述的蛋白降解通路成员结合结构域。在一些实施方案中, 本公开提供的嵌合蛋白构建体包含靶向 TCR 的靶向蛋白结合结构域和腺病毒 E3-19K 以及 E3 泛素连接酶结合结构域。在一些实施方案中, 所述 E3 泛素连接酶结合结构域包含如 SEQ ID NO. 147 (DRHDSGLDSMSGSGALAPYIP) 所示的氨基酸序列。

在一些实施方案中, 本公开提供的嵌合蛋白构建体包含靶向 TCR 的靶向蛋白结合结构域和除了腺病毒 E3-19K 以外的病毒内质网驻留蛋白的跨膜结构域或其功能变体和内质网驻留结构域或其功能变体。所述病毒内质网驻留蛋白可以是选自下组的至少一种: HCMV 糖蛋白 US2、US11、US3、US10、US6、HSV ICP47、CPXV12、BHV UL49.5、EBV BNFL2a、HCMV UL16、UL141、UL142、HIV Nef、HIV Vpu、HHV-7 U21、HHV-8 KK3、HHV-8 KK5、MHV-68 MK3、HTLV-1 p12 和牛痘病毒蛋白 CPXV203。

在一些实施方案中, 本公开提供的嵌合蛋白构建体包含靶向上述靶蛋白 (例如, TCR) 的靶向蛋白结合结构域和 HCMV US2 和/或 US11 的跨膜结构域或其功能变体和内质网驻留结构域或其功能变体。

在一些实施方案中, 本公开提供的嵌合蛋白构建体包含靶向上述靶蛋白 (例如, TCR) 的靶向蛋白结

合结构域和 HCMV US3 的跨膜结构域或其功能变体和内质网驻留结构域或其功能变体。

在一些实施方案中,本公开提供的嵌合蛋白构建体包含靶向上述靶蛋白(例如,TCR)的靶向蛋白结合结构域和 HCMV US10 的跨膜结构域或其功能变体和内质网驻留结构域或其功能变体。

5 在一些实施方案中,本公开提供的嵌合蛋白构建体包含靶向上述靶蛋白(例如,TCR)的靶向蛋白结合结构域和 HCMV US6、HSV ICP47、CPXV012、EBV BNFL2a 和/或 BHV UL49.5 的跨膜结构域或其功能变体和内质网驻留结构域或其功能变体。

在一些实施方案中,本公开提供的嵌合蛋白构建体包含靶向上述靶蛋白(例如,TCR)的靶向蛋白结合结构域和 HHV-7 US21 的跨膜结构域或其功能变体和内质网驻留结构域或其功能变体。

10 在一些实施方案中,本公开提供的嵌合蛋白构建体包含靶向上述靶蛋白(例如,TCR)的靶向蛋白结合结构域和 HCMV UL16、UL141 和/或 UL142 的跨膜结构域或其功能变体和内质网驻留结构域或其功能变体。

在一些实施方案中,本公开提供的嵌合蛋白构建体包含靶向上述靶蛋白(例如,TCR)的靶向蛋白结合结构域和 HIV Nef、HIV Vpu、HHV-7 U21、HHV-8 KK3、HHV-8 KK5、MHV-68 MK3 和/或 HTLV-1 p12 的跨膜结构域或其功能变体和内质网驻留结构域或其功能变体。

15 在一些实施方案中,本公开提供的嵌合蛋白构建体包含靶向上述靶蛋白(例如,TCR)的靶向蛋白结合结构域和 Cowpox Virus 蛋白 CPXV203 的跨膜结构域或其功能变体和内质网驻留结构域或其功能变体。

在一些实施方案中,本公开提供的嵌合蛋白构建体包含不是靶向 TCR 的靶向蛋白结合结构域和腺病毒 E3-19K。在一些实施方案中,本公开提供的嵌合蛋白构建体包含靶向 CD123 的靶向蛋白结合结构域和腺病毒 E3-19K。

20 在一些实施方案中,上述嵌合蛋白构建体进一步包括一个或多个上文所述的蛋白降解通路成员结合结构域。

5. 共表达部分

25 在一些实施方案中,本公开所提供的嵌合蛋白构建体和至少一个共表达部分共同表达。任何适用于共同表达的方式都可以使用。例如,嵌合蛋白构建体(或其中的一部分)和所述至少一个共表达部分可以通过可断裂的接头连接,当接头断裂后,则嵌合蛋白构建体和所述共表达部分可以共同表达。

在一些实施方案中,本公开所提供的嵌合蛋白构建体和至少一个共表达部分连接,例如通过可自我断裂的接头(self-cleavable linkage)进行连接。在一些实施方案中,所述可自我断裂的接头为可切割肽;例如, T2A 肽、GSG-T2A 肽、E2A 肽、GSG-E2A 肽、F2A 肽、GSG-F2A 肽、P2A 肽或 GSG-P2A 肽。

30 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。

35 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。

40 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。

45 本申请提供的所述共表达部分可以是任何具有生物功能的蛋白或者多肽。根据期望实现的生物学功能,可以选择合适的共表达部分。例如,为了降低细胞的免疫原性或抗原呈递,可以选择能够降解或减少 MHC I 类或 II 类分子的蛋白作为共表达部分。再例如,为了使细胞能够识别靶蛋白,可以选择识别或结合靶蛋白的结合结构域(例如趋化因子受体、或嵌合抗原受体 CAR)作为共表达部分。再例如,为了增加免疫刺激活性,可以选择免疫刺激性分子作为共表达部分。

50 在一些优选的实施方案中,所述共表达部分的例子包括但不限于,完整的病毒 ER 驻留糖蛋白(例如, HCMV US2、US3、US11、US10、腺病毒 E3-K1 9、HCMV US6、HSV ICP47)、嵌合抗原受体(CAR)、功能性 T 细胞受体(TCR)、趋化因子受体(例如, CCR4、CCR5、CCR6、CCR7、CCR9、CCR2b、CXCR1、CXCR2 和 CXCR4)、NK 细胞激活受体(例如, 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)、CNK 信号转接组件、细胞因子、CD7、免疫刺激性分子(例如, TNF-a、IFN-β、IFN-γ、IL-1、IL-2、IL-4、IL-6、IL-8、IL-10、IL-12、IL-

18 和粒细胞巨噬细胞集落刺激因子中的一种或多种)等。

i) 完整的病毒ER 驻留糖蛋白

在一些实施方案中,所述共表达部分是完整的病毒 ER 驻留糖蛋白,包括但不限于, HCMV US2、US3、US11、US10、腺病毒 E3-K19、HCMV US6 和 HSV ICP47。

5 在一些优选的实施方案中,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,优选地,具有降解 MHC I 类或 II 类分子的活性;所述 HCMV 糖蛋白 US2 的全长序列的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 46 所示。

10 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,优选地,具有降解 MHC I 类或 II 类分子的活性;所述 US2 的全长序列的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 74 所示。

15 在一些优选的实施方案中,所述 HCMV 糖蛋白 US3 的全长序列包含与 SEQ ID NO. 49 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,优选地,具有降解 MHC I 类或 II 类分子的活性;所述 HCMV 糖蛋白 US3 的全长序列的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 49 所示。

20 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,优选地,具有降解 MHC I 类或 II 类分子的活性;所述 US3 的全长序列的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 77 所示。

25 在一些优选的实施方案中,所述 HCMV 糖蛋白 US11 的全长序列包含与 SEQ ID NO. 52 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,优选地,具有降解 MHC I 类或 II 类分子的活性;所述 HCMV 糖蛋白 US11 的全长序列的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 52 所示。

30 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,优选地,具有降解 MHC I 类或 II 类分子的活性;所述 US11 的全长序列的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 80 所示。

35 在一些优选的实施方案中,所述 HCMV 糖蛋白 US10 的全长序列包含与 SEQ ID NO. 55 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,优选地,具有降解 MHC I 类或 II 类分子的活性;所述 HCMV 糖蛋白 US10 的全长序列的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 55 所示。

40 在一些优选的实施方案中,所述腺病毒 E3-19K 的全长序列包含与 SEQ ID NO. 58 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,优选地,具有降解 MHC I 类或 II 类分子的活性;所述腺病毒 E3-19K 的全长序列的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 58 所示。

45 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,优选地,具有降解 MHC I 类或 II 类分子的活性;所述 HCMV US6 的全长序列的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 64 所示。

50 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,优选地,具有降解 MHC I 类或 II 类分子的活性;所述 HSV ICP47 的全长序列的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 66 所示。

45 ii) 嵌合抗原受体 (CAR)

在某些实施方式中,所述共表达部分是嵌合抗原受体 (CAR)。所述 CAR 包含靶蛋白结合域(例如,靶向肿瘤的胞外识别结构域)、跨膜结构域和免疫受体活化信号传导结构域 (ITAM)(也称为“胞内信号传导结构域”)。在某些实施方式中,所述 CAR 还可以进一步包含共刺激结构域。在某些实施方式中,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。

50 在一些实施方案中,所述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。

55 在一些优选的实施方案中,本文所述的 CAR 的跨膜结构域可来源于任何膜结合蛋白或跨膜蛋白,包括但不限于 BAFFR、BLAME (SLAMF8)、CD2、CD3ε、CD4、CD5、CD8、CD9、CD11a (CD18、

ITGAL、LFA-1)、CD11b、CD11c、CD11d、CD16、CD19、CD22、CD27、CD28、CD29、CD33、CD37、CD40、CD45、CD49a、CD49d、CD49f、CD64、CD80、CD84、CD86、CD96 (Tactile)、CD100 (SEMA4D)、CD103、CD134、CD137 (4-1BB)、CD150 (IPO-3、SLAMF1、SLAM)、CD154、CD160 (BY55)、CD162 (SELPLG)、CD226 (DNAM1)、CD229 (Ly9)、CD244 (2B4、SLAMF4)、CD278 (ICOS)、CEACAM1、CRT AM、GITR、HYEM (LIGHTR)、IA4、IL2R β 、IL2R γ 、IL7R α 、ITGA1、ITGA4、ITGA6、ITGAD、ITGAE、ITGAM、ITGAX、ITGB1、ITGB2、ITGB7、KIR、LTBR、OX40、NKG2C、NKG2D、NKp30、NKp44、NKp46、NKp80 (KLRF1)、PAG/Cbp、PSGL1、SLAMF6 (NTB-A、Ly108)、SLAMF7、T细胞受体的 α 、 β 或 ζ 链、TNFR2、VLA1和VLA-6。

5 在一些优选的实施方案中，所述CAR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。

10 在一些优选的实施方案中，所述CAR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。

15 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 R1、Fc γ R1、Fc γ R1I、Fc γ R1II、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 。

20 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)衍生自CD3 ζ 、共同FcR γ (FCER1G)、Fc γ R1Ia、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。

25 在一些优选的实施方案中，所述CAR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。

30 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(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、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。更优选地，所述共刺激信号传导结构域可以选自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。

45 在一些实施方案中，本文所述的CAR的铰链和/或跨膜域提供了CAR的胞外域的细胞表面呈现。本文所述的CAR的铰链可来源于任何膜结合蛋白或跨膜蛋白，包括但不限于BAFFR、BLAME (SLAMF8)、CD2、CD3 ϵ 、CD4、CD5、CD8、CD9、CD11a (CD18、ITGAL、LFA-1)、CD11b、CD11c、CD11d、CD16、CD19、CD22、CD27、CD28、CD29、CD33、CD37、CD40、CD45、CD49a、CD49d、CD49f、CD64、CD80、CD84、CD86、CD96 (Tactile)、CD100 (SEMA4D)、CD103、CD134、CD137 (4-1BB)、CD154 (IPO-3、SLAMF1、SLAM)、CD154、CD160 (BY55)、CD162 (SELPLG)、CD226 (DNAM1)、CD229 (Ly9)、CD244 (2B4、SLAMF4)、CD278 (ICOS)、CEACAM1、CRT AM、GITR、HYEM (LIGHTR)、IA4、IL2R β 、IL2R γ 、IL7R α 、ITGA1、ITGA4、ITGA6、ITGAD、ITGAE、ITGAM、ITGAX、ITGB1、ITGB2、ITGB7、KIR、LTBR、OX40、NKG2C、NKG2D、NKp30、NKp44、NKp46、NKp80 (KLRF1)、PAG/Cbp、PSGL1、SLAMF6 (NTB-A、Ly108)、SLAMF7、T细胞受体的 α 、 β 或 ζ 链、TNFR2、VLA1和VLA-6。在一些实施方案中，本文所述的CAR的铰链包含CD8 α 的铰链区、人类免疫球蛋白(Ig)的铰链区或富含甘氨酸-丝氨酸的序列。

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. 104 所示的氨基酸序列或 SEQ ID NO. 105 所示的氨基酸序列。

在一些优选的实施方案中，所述铰链是 IgG1 铰链或 IgG4 铰链。

5 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。

10 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。

15 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。

20 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。

25 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。

30 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。

30 iii) CNK 受体

在某些实施方式中，所述共表达部分是 CNK 受体。所述 CNK 受体包含嵌合型 NK 激活受体组件和嵌合型 NK 信号转接组件（也称为“CNK 信号转接组件”）。所述嵌合型 NK 激活受体组件至少可以包含 NK 细胞激活受体或其功能变体。

NK 细胞激活受体

35 在一些实施方案中，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。关于 NK 细胞激活受体和 CNK 信号转接组件的详细描述可参见，例如 US 2020/0308248 A1，其全部内容以引用的方式并入本文中。

40 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、DNAM-1、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) 45 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)。在一些实施方案中，所述天然细胞毒性受体选自 NKp46、NKp44 和 NKp30。

50 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。

55 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。

5 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。

10 在一些优选的实施方案中,所述 NK 细胞激活受体包含人的 NK 细胞激活受体的胞外结构域、鼠的 NK 细胞激活受体的跨膜结构域和人的 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。

15 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。

20 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。

25 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。

30 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。

35 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。

40 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。

45 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。

50 在一些优选的实施方案中,人 KIR2DL4 的全长序列包含与 SEQ ID NO: 10 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 KIR2DL4 的全长序列的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 10 所示。

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。

55 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。

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。

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。

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。

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。

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。

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。

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。

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。

CNK 信号转接组件

在一些实施方案中,所述 CNK 信号转接组件至少包含 (i) NK 细胞信号转换器(adaptor)(例如, DAP10 或 DAP12)或其功能变体。在一些实施方案中,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。

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。

5 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。

10 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。

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 细胞信号转换器的胞外结构域为人或鼠的 NK 细胞信号转换器的胞外结构域。

15 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。

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。

20 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 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。

25 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。

30 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 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。

35 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。

40 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。

45 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。

50 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。

55 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。

5 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, 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。

15 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 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。

30 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。

40 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 DAPI10-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 DAPI10-CD28-CD3zeta 序列的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 41 所示。

45 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。

50 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。

55 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。

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

在一些优选的实施方案中，所述嵌合蛋白构建体和 NK 细胞激活受体和 CNK 信号转接组件形成多功能复合体，其中所述多功能复合体包含如 SEQ ID NO. 117 所示的氨基酸序列。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包含如 SEQ ID NO. 117 所示的氨基酸序列。

6. 核酸分子

在另一方面，本公开还提供了一种嵌合核酸构建体 (chimeric nucleic acid construct)，其编码本申请所述的任一嵌合蛋白构建体。

所述核酸分子中可以包括脱氧核糖核酸(DNA)、核糖核酸(RNA)、苏糖核酸(TNA)、乙二醇核酸(GNA)、肽核酸(PNA)、锁核酸(LNA、包括具有 β -D-核糖构型的 LNA、具有 α -L-核糖构型的 α -LNA (LNA 的非对映异构体)、具有 2'-氨基官能化的 2'-氨基-LNA 和具有 2'-氨基官能化的 2'-氨基- α -LNA)、乙烯核酸 (ENA)、环己烯基核酸 (CeNA) 和/或它们的嵌合体 and/或组合。示例性 DNA 包括但不限于质粒 DNA (pDNA)) 等。示例性 RNA 包括但不限于 mRNA、环状 RNA、ccRNA。

20 在一些优选的实施方案中，所述核酸分子是 mRNA。mRNA 是编码至少一种蛋白质的任何 RNA，并且可以在体外、体内、在原位或离体产生编码的蛋白质。本领域技术人员将理解，除非另有说明，本申请中阐述的核酸序列可以在代表性 DNA 序列中列举“T”，但在该序列代表 RNA (例如，mRNA) 的情况下，“T”将用“U”代替。因此，本文通过特定序列识别号公开和识别的任何 DNA 也公开了与 DNA 互补的相应 RNA (例如，mRNA) 序列，其中 DNA 序列的每个“T”被“U”取代。

25 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%以上同一性的核苷酸序列。

30 在一些优选的实施方案中，所述核酸分子包含与 SEQ ID NO. 160 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%以上同一性的核苷酸序列。在一些优选的实施方案中，所述核酸分子包含与 SEQ ID NO. 162 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%以上同一性的核苷酸序列。在一些优选的实施方案中，所述核酸分子包含与 SEQ ID NO. 165 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%以上同一性的核苷酸序列。

35 在一些优选的实施方案中，所述核酸分子是体外合成的 mRNA。在一些优选的实施方案中，所述体外合成的 mRNA 具有修饰，可选地，包括一种或多种选自下组的修饰：5' UTR、5' UTR、聚 A 尾巴、5'-加帽、以及在编码区具有一个或多个修饰的核苷酸。

i) 核酸分子 (例如 mRNA) 的修饰

40 天然存在的真核细胞 mRNA 分子可以含有稳定元件，包括但不限于在其 5'-末端的未翻译区 (UTR) (5' UTR) 和/或在其 3'-末端的 UTR (3' UTR)，以及以及其他结构特征，例如 5'-帽结构、3'-聚 A 尾巴。5' UTR 和 3' UTR 通常都从基因组 DNA 转录，并且是早产 mRNA (premature mRNA) 的部分。成熟 mRNA 的特征结构 (如 5'-帽结构和 3'-聚 A 尾巴通常在 mRNA 加工过程中添加到转录的 (早产) mRNA 上。

45 “5' UTR”是指 mRNA 的直接位于起始密码子 (即核糖体翻译的 mRNA 转录物的第一个密码子) 上游 (即 5') 的区域，它不编码多肽。当生成 RNA 转录子时，5' UTR 可能包含一个启动子序列。这样的启动子序列是本领域已知的。应当理解，此类启动子序列将不存在于本公开的核酸分子中。

“3' UTR”是指 mRNA 的直接位于终止密码子 (即，指示翻译终止的 mRNA 转录物的密码子) 下游 (即 3') 的区域，其不编码多肽。

50 “聚 A 尾巴”是 mRNA 的下游区域，例如，3' UTR 的直接下游 (即 3')，包含多个连续单磷酸腺苷。一个聚 A 尾可能含有 10 到 300 个单磷酸腺苷。例如，聚 A 尾可能包含 10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290 或 300 单磷酸腺苷。在一些实施方案中，聚 A 尾含有 50 至 250 个单磷酸腺苷。在相关的生物学环境中 (例如，在细胞中或在体内)，聚 A 尾的作用是保护 mRNA 免于酶促降解 (例如在细胞质中的酶促降解)，并有助于转录终止和/或 mRNA 从细胞核中的输出和翻译。3'-聚 A 尾通常是一段添加到转录的 mRNA 的 3'-末端的腺嘌呤核苷酸。在某些情况下，它可以包含多达约 400 个腺嘌呤核苷酸。3'-聚 A 尾的长度可以影响 mRNA 分子本身的稳定性。

多核苷酸的 5'-加帽可以在体外转录反应期间同时完成，可根据制造商的使用规程用以下化学 RNA 帽

类似物生成 5'-鸟苷帽结构：3'-O-Me-m7G(5')ppp(5')G [ARCA 帽]、G(5')ppp(5')A、G(5')ppp(5')G、m7G(5')ppp(5')A、m7G(5')ppp(5')G (新英格兰生物实验室，马萨诸塞州伊普斯威奇)。修饰的 RNA 的 5'-加帽可以在转录后使用牛痘病毒加帽酶完成，以产生“Cap 0”结构：m7G(5')ppp(5')G (新英格兰生物实验室，马萨诸塞州伊普斯威奇)。Cap 1 结构可以使用牛痘病毒加帽酶和 2'-O 甲基转移酶生成：m7G(5')ppp(5')G-2'-O-甲基。Cap 2 结构可以由 Cap 1 结构产生，然后使用 2'-O 甲基转移酶对 5'-倒数第三个 (the 5'-antepenultimate) 核苷酸进行 2'-O-甲基化。Cap 3 结构可以由 Cap 2 结构产生，然后使用 2'-O 甲基转移酶对 5'-倒数第四个 (the 5'-preantepenultimate) 核苷酸进行 2'-O-甲基化。酶可以来源于重组来源。

包含至少一个上述稳定元件的 mRNA 分子能够显著提高其编码的蛋白的表达量，并且当使用两个或更多的上述稳定元件时，其在蛋白表达量上相较于使用的单一稳定元件的 mRNA 显示出协同作用。

在一些实施方案中，本公开所述的 mRNA 被除去一个或更多 AU 丰富的序列。AU 丰富的序列也可以被成为 AURES，是在 3' UTR 发现的去稳定性序列。

在一些实施方案中，本公开所述的 mRNA 还包含编码信号肽的开放阅读框 (ORF)。所述信号肽可以包含蛋白质 N 末端的第 15-60 位氨基酸，其通常是跨分泌通路上的膜转运所必需的，因此，普遍控制大多数蛋白质进入真核生物和原核生物中的分泌途径。所述信号肽的长度可能为 15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59 个氨基酸。

“开放阅读框”是一段连续的 DNA，以起始密码子 (例如，甲硫氨酸 (ATG)) 开始，以终止密码子 (例如，TAA、TAG 或 TGA) 结尾，并编码多肽。

来自异源基因的信号肽在本领域中是已知的，并且可以测试所需的特性和然后掺入本公开的核酸中。

在一些实施方案中，信号肽可以包括以下序列之一：MDSKGSSQKGSRLLLLVSNNLLPQGVVG (SEQ ID NO. 148)、MDWTWILFLVAAATRVHS (SEQ ID NO. 149)、METPAQLLFLLLWLPDTTG (SEQ ID NO. 150)、MLGSNSGQRVFTILLVAPAYS (SEQ ID NO. 151)、MKCLLYLAFLFIGVNCA (SEQ ID NO. 152)、MWLVSLAIVTACAGA (SEQ ID NO. 153) 和 MFVFLVLLPLVSSQC (SEQ ID NO. 154)。

本申请所提供的核酸分子可以通过固相技术合成、液相化学合成、酶促连接及其组合合成。合成后的核酸分子可经纯化和定量。具体可参见 WO2021222304，其全部内容以引用的方式并入本文中。

7. 载体

在另一方面，本公开还提供了一种载体，其包含如本公开所提供的核酸分子，所述核酸分子可操作地连接至至少一个多核苷酸调控元件 (例如，启动子) 以表达所述核酸分子编码的嵌合蛋白构建体。

在一些实施方案中，所述载体选自质粒、纳米质粒、粘粒、病毒载体、小环、RNA 载体或线性或圆形 DNA (例如，转座子 DNA) 或 RNA 分子。

在一些实施方案中，所述病毒载体选自逆转录病毒、慢病毒载体、腺病毒、细小病毒 (例如，腺伴随病毒)、腺相关病毒 (AAV) 载体、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、爱波斯坦-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、病毒样颗粒 (VLP)。

在一些实施方案中，所述病毒载体为逆转录病毒载体。

在一些实施方案中，所述逆转录病毒载体选自禽造血细胞组织增生-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。

在一些实施方案中，所述病毒载体为慢病毒载体。在一些实施方案中，所述病毒载体是溶瘤病毒载体。溶瘤病毒病毒载体是指基于溶瘤病毒的病毒载体，其中能够插入外源核酸序列。

在一些实施方案中，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。

在一些实施方案中，所述载体是基于转座子的表达载体。转座子是可以改变其在基因组内位置的 DNA 序列。在转座子系统中，编码本文所提供的嵌合蛋白构建体的核酸分子侧面是由介导转座子移动的转座酶可识别的末端重复序列。转座酶可以作为蛋白质共递送、与所述嵌合蛋白构建体编码在同一载体上或编码在单独的载体上。转座子系统的非限制性实例包括 Sleeping Beauty、Piggyback、Frog Prince 和 Prince Charming。

在一些实施方案中，本公开所提供的载体可以与其他载体组合，所述其他载体包含其他编码至少一个共表达部分的核酸分子。

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。

在一些优选的实施方案中，本公开所提供的嵌合蛋白构建体可以与共表达部分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。

8. 细胞

在另一方面，本公开还提供了一种工程化细胞，其表达如本公开所提供的嵌合蛋白构建体，或包含如

本公开所提供的嵌合核酸构建体或者载体。

在一些实施方案中,所述工程化细胞同时表达如本公开所提供的嵌合蛋白构建体和上述所述的共表达部分。所述共表达部分和所述嵌合蛋白构建体的靶向蛋白结合结构域可以进行组合以实现特定目的。例如,当靶向蛋白结合结构域特异性识别免疫细胞上表达的能够引起免疫排斥的蛋白时,所述共表达部分可以

5 以为进一步抑制免疫排斥的蛋白(例如,病毒的ER驻留糖蛋白等)、靶向肿瘤微环境的蛋白(例如,趋化因子受体等)、刺激免疫活性的蛋白(例如,细胞因子、免疫细胞种系蛋白CD7、CD5等),由此产生的细胞在移植到人体内时将具有降低的免疫原性(或免疫排斥)和/或具有增强的免疫活性。这对于细胞免疫治疗以及其他治疗性细胞移植中是非常有用的。因此,所述细胞可以是免疫细胞(例如,T细胞)、干细胞、肾细胞、胰岛细胞和心肌细胞等。

10 在一些实施方案中,所述细胞是免疫细胞,其选自:T细胞、自然杀伤(NK)细胞、B细胞、巨噬细胞、单核细胞、树突细胞、中性粒细胞或 $\gamma\delta$ T细胞。所述T细胞可以选自:CD8+T细胞、CD4+T细胞、细胞毒性T细胞、末端效应T细胞、记忆T细胞、幼稚T细胞、调节性T细胞组成的组细胞、自然杀伤T细胞、 $\gamma\delta$ T细胞、细胞因子诱导的杀伤(CIK)T细胞和肿瘤浸润淋巴细胞。

15 在一些实施方案中,所述工程化细胞为T细胞。在表达上文所述的嵌合蛋白构建体和共表达部分以得到具有降低的免疫原性和/或增强的免疫活性的T细胞的情况下,所述T细胞还可以进一步表达能够特异性靶向肿瘤相关标记物的受体,包括但不限于CAR、TCR、NK细胞激活受体组件等。

在一些实施方案中,所述工程化细胞为T细胞,其同时表达如本公开所提供的嵌合蛋白构建体和选自以下的一种或多种:腺病毒E3-K19、CAR、NK细胞激活受体和CNK信号转接组件。

20 在一些实施方案中,所述工程化细胞为T细胞,其同时表达如本公开所提供的嵌合蛋白构建体和NK细胞激活受体以及可选地CNK信号转接组件。

在一些实施方案中,所述工程化细胞为T细胞,其同时表达如本公开所提供的嵌合蛋白构建体、腺病毒E3-K19和CAR。

在另一方面,本公开还提供了一种产生本文所述的工程化细胞(例如,T细胞)的方法,其包括在适合表达如本文所述的核酸分子的条件下将如本文所述的载体引入起始细胞。

25 本领域已知的许多产生CAR-T细胞的方法也可以应用于产生如本文所述的工程化细胞。例如,Zhang等人,Engineering CAR-T cells, Biomarker Research (2017) 5:22 中描述了产生CAR-T细胞的方法。本文提供的方法可以包括选自以下的一个或多个步骤:获得起始细胞、培养(包括扩增,任选地包括激活)起始细胞、和遗传修饰细胞。起始细胞可以是干细胞,所述干细胞可以是造血祖细胞(例如T细胞祖细胞、NK细胞祖细胞、巨噬细胞祖细胞)、造血干细胞(HSC)、CD34+细胞、胚胎细胞系干细胞、间充质干细胞或iPSC细胞。起始细胞也可以是从干细胞分化而来的细胞,例如上文所述的免疫细胞。

30 所述起始细胞可以从任何来源获得,例如,可以分离自受试者(例如,人类受试者)的免疫细胞(例如,T细胞)。在一些实施方案中,免疫细胞获自感兴趣的受试者,例如疑似患有特定疾病或病症的受试者、疑似患有特定疾病或病症的易感性的受试者、将经历、正在经历的受试者,或接受过针对特定疾病或病症的治疗,受试者也可以是健康志愿者或健康供体;免疫细胞也可以来自血库。所述免疫细胞对于感兴趣的受试者可以是自体的或同种异体的。所述免疫细胞可以从它们存在于受试者中的任何位置收集,包括但不限于血液、脐带血、脾脏、胸腺、淋巴结、胸腔积液、脾脏组织、肿瘤和骨髓。分离的免疫细胞可以直接使用,也可以保存一段时间,例如冷冻。

35 免疫细胞的激活和/或扩增是免疫细胞功能的主要步骤之一。在一些实施方案中,免疫细胞在遗传修饰的同时、之前或/和之后被激活和扩增。在一些实施方案中,免疫细胞在体外、离体或体内被激活和/或扩增。激活和扩增免疫细胞的方法已经在本领域中描述,并且可以用于本文描述的方法中。例如,T细胞可以通过与连接有刺激CD3/TCR复合体相关信号的药剂和刺激T细胞表面上的共刺激分子的配体的表面接触来激活和扩增。特别地,可以刺激T细胞群体,如通过与抗CD3抗体或其抗原结合片段或固定在表面上的抗CD2抗体接触,或与蛋白激酶C激活剂(例如苔藓毒素)以及钙离子载体接触。为了共刺激T细胞表面的辅助分子,使用与辅助分子结合的配体。例如,在适合刺激T细胞增殖的条件下,T细胞群可以与抗CD3抗体和抗CD28抗体接触。为了刺激CD4+T细胞或CD8+T细胞的增殖,可以使用抗CD3抗体和抗CD28抗体。在某些实施方案中,T细胞的初级刺激信号和共刺激信号可以由不同的方案提供。

40 遗传修饰细胞可以通过用编码本文提供的嵌合蛋白构建体的核酸分子转导基本上同质的起始细胞来实现。在某些实施方案中,使用逆转录病毒载体(例如慢病毒载体)将本文提供的核酸分子引入起始细胞。例如,可以将本文提供的核酸分子克隆到慢病毒载体中,并且可以从其内源启动子、慢病毒长末端重复序列或对感兴趣的靶细胞类型特异的启动子驱动表达。用于递送病毒载体的常见递送方法包括但不限于电穿孔、显微注射、基因枪和磁转染。

45 遗传修饰细胞还可以通过用LNP递送核酸分子来实现,具体可参见上文“6.核酸分子”小节内容。其他用于核酸递送的非病毒方法包括使用磷酸钙、DEAE葡聚糖、电穿孔和原生质体融合进行体外转染。还可以使用转座酶或靶向核酸酶(例如锌指核酸酶、大范围核酸酶(meganucleases)或TALE核酸酶、CRISPR)来实现对起始细胞的遗传修饰,从而获得如本公开所述的工程化细胞。

55 在某些实施方案中,本文提供的工程化细胞通过在施用之前将编码本文提供的嵌合蛋白构建体的核酸

分子转染到起始细胞中来制备。在某些实施方案中，本文提供的工程化细胞可以通过用编码本文提供的嵌合蛋白构建体的核酸分子通过例如病毒载体转染免疫细胞来制备。本文提供的工程化细胞在细胞表面表现出降低的免疫原性分子（例如，TCR、HLA 等）表达和/或免疫抑制分子（例如，PD-1 等）表达和/或增强的肿瘤靶向性受体（例如 CAR、工程化 TCR、CNK 受体等）表达。

- 5 在另一方面，本公开还提供了通过上述方法离体产生的细胞群。在某些实施方案中，至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%或至少 95%的细胞群表达可检测水平的本文提供的表达标记多肽（例如，与本文所述的嵌合蛋白构建体可切割连接的 EGFR 截短体（EGFRt））。EGFR 截短体的表达水平可以代表本文所述的嵌合蛋白构建体在细胞群中的表达水平。

10 9. 药物组合物、试剂盒

在另一方面，本公开还提供了一种药物组合物或一种试剂盒，其包含（i）如本文所述的嵌合蛋白构建体、核酸分子、载体或细胞群，以及（ii）药学上可接受的媒介。术语“药学上可接受的媒介”是指可促进本公开提供的嵌合蛋白构建体、核酸分子、表达载体和/或细胞群的储存和施用的任何和所有溶剂、分散介质、涂层、抗菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂等，药学上可接受的媒介可以包括任何合适的组分，

- 15 例如但不限于盐水、脂质体、聚合赋形剂、胶体或载体颗粒。

在某些实施方案中，药学上可接受的媒介是可以溶解或分散本公开提供的嵌合蛋白构建体、核酸分子、表达载体和/或细胞群的盐水。盐水的说明性实例包括但不限于缓冲盐水、蔗糖溶液、生理盐水、醋酸盐缓冲液、磷酸盐缓冲液、柠檬酸盐缓冲液、碳酸氢盐缓冲液、盐溶液和聚山梨醇酯溶液。

i) 核酸药物组合物

- 20 在某些实施方案中，药学上可接受的媒介是脂质体。脂质体是单层或多层囊泡，具有由亲脂性材料形成的膜和内部水性部分。本公开提供的核酸分子和/或载体可以封装在脂质体的水性部分中。示例性脂质体包括但不限于基于 3[N-(N',N'-二甲基氨基乙烷)氨基甲酰基]胆固醇(DC-Chlo)的脂质体、基于 N-(2,3-二油酰氧基)丙基-N,N,N-三甲基氯化铵 (DOTMA)的脂质体，和基于 1,2-二油酰氧基-3-三甲基丙烷 (DOTAP)的脂质体。制备脂质体和将核酸分子和/或载体包封在脂质体中的方法在本领域中是众所周知的(参见，例如，

- 25 *D.D. Lasic et al, Liposomes in gene delivery, published by CRC Press, 1997*)。

在某些实施方案中，药学上可接受的媒介是聚合赋形剂，包括但不限于微球、微胶囊、聚合胶束和树枝状聚合物。本公开提供的核酸分子和/或载体可以通过本领域已知的方法封装、粘附或包被在基于聚合物的组分上（参见，例如，*W. Heiser, Nonviral gene transfer techniques, published by Humana Press, 2004; U.S. patent 6025337; Advanced Drug Delivery Reviews, 57(15): 2177-2202 (2005)*)。

- 30 在某些实施方案中，药学上可接受的媒介是胶体或载体颗粒，例如金胶体、金纳米颗粒、二氧化硅纳米颗粒和多段纳米棒。本公开提供的核酸分子和/或载体可以以本领域已知的任何合适的方式包被、粘附到载体或与载体结合（参见，例如，*M. Sullivan et al., Gene Therapy, 10: 1882-1890 (2003)*, *C. McIntosh et al., J. Am. Chem. Soc., 123 (31): 7626-7629 (2001)*, *D. Luo et al., Nature Biotechnology, 18: 893 - 895 (2000)*, and *A. Salem et al., Nature Materials, 2: 668 - 671 (2003)*)。

- 35 在某些实施方案中，药物组合物可进一步包含添加剂，包括但不限于稳定剂、防腐剂和有助于药物的细胞摄取的转染促进剂。合适的稳定剂可以包括但不限于谷氨酸钠、甘氨酸、EDTA 和白蛋白。合适的防腐剂可以包括但不限于 2-苯氧乙醇、苯甲酸钠、山梨酸钾、羟基苯甲酸甲酯、酚类、硫柳汞和抗生素。合适的转染促进剂可以包括但不限于钙离子。

- 40 本文提供的药物组合物可以通过本领域已知的任何合适的途径施用，包括但不限于，肠胃外、口服、肠内、颊、鼻、局部、直肠、阴道、肌内、鼻内、经粘膜、表皮、透皮、真皮、眼、肺和皮下给药途径。本文所提供的药物组合物可以以适合每种给药途径的制剂或制剂的形式施用于受试者。适用于药物组合物给药的制剂可以包括但不限于溶液、分散体、乳剂、粉剂、悬浮液、气雾剂、喷雾剂、滴鼻剂、基于脂质体的制剂、贴片、植入物和栓剂。

- 45 制剂可以方便地以单位剂型存在并且可以通过药学领域中众所周知的任何方法制备。制备这些制剂或药物组合物的方法包括将本公开所述的核酸分子提供给一种或多种药学上可接受的媒介以及任选地一种或多种添加剂的步骤。制备此类制剂的方法可参见，例如，*Remington's Pharmaceutical Sciences (Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19th ed., A. R. Gennaro (ed), Mack Publishing Co., N.J., 1995; R. Stribling et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:11277-11281 (1992); A. Barnes et al., Current Opinion in Molecular Therapeutics 2000 2:87-93(2000); T. W. Kim et al., The Journal of Gene Medicine, 7(6): 749-758(2005); 和 S.F. Jia et al., Clinical Cancer Research, 9:3462 (2003); A. Shahiwala et al., Recent patents on drug delivery and formulation, 1:1-9 (2007);*，其参考文献通过引用整体并入本文)。

- 50 在一些实施方案中，所述核酸分子（例如 mRNA）可以物理方法、生物方法或化学方法进行递送（参见，例如，*S. Guan, J. Rosenecker, Gene Ther. 2017, 24, 133.*）。

- 55 物理方法包括但不限于通过基因枪（例如用 Au-颗粒的基因枪）、电穿孔、声穿孔等进行递送（参见，例如，*Kutzler et al., (2008) DNA vaccines: Ready for prime time? Nat Rev Genet 9: 776-788; Geall et al., Nonviral delivery of self-amplifying RNA vaccines. Proc Natl Acad Sci USA. Sep. 4, 2012;109(36):14604-9.*）。

生物方法包括但不限于通过病毒载体（例如，逆转录病毒载体、腺病毒载体、腺相关病毒载体）进行递送。

化学方法包括但不限于通过天然蛋白/聚糖、聚合物、脂质递送。示例性天然蛋白/聚糖包括鱼精蛋白和壳聚糖（参见，例如，*A. E. Sköld et al., Cancer Immunol. Immunother.* 2015, 64, 1461; *U. S. Kumar et al. ACS Nano* 2021, 11, 17582）。示例性聚合物包括聚乙烯亚胺（PEI）（例如，线性 PEI、分支 PEI 和树枝状 PEI）、聚（ β -氨基酯）（PBAE）（参见，例如，*K. Singha et al., Nucleic Acid Ther.* 2011, 21, 133; *A. A. Eltoukhy et al., Biomaterials* 2012, 33, 3594）。

示例性脂质包括阳离子脂质，例如 1,2-dioctadecenyl-3-trimethylammonium-propane (DOTMA) 和 1,2-dioleoyl-3-trimethylammoniumpropane (DOTAP)（参见，例如，*X. Hou et al., Nat. Rev. Mater.* 2021, 10, 1078.）、由 DOTMA、DOTAP 和 DOPE（1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine，辅助脂质）形成的脂质体，其可以与 mRNA 自组装后形成胶体稳定的纳米粒子（参见，例如，*L. M. Kranz et al., Nature* 2016, 534, 396.）。

示例性脂质还可以是可离子化脂质。可离子化脂质（pKa 6.5-6.9）是一种替代性脂质材料，在生理 pH 下呈中性，但在酸性环境中通过游离胺的质子化而带正电荷（参见，例如，*S. C. Semple et al., Nat. Biotechnol.* 2010, 28, 172）。细胞内化后，可离子化脂质形成的纳米颗粒被包裹在内体（endosome）中。随后，由于内体和溶酶体内 pH 值的不断下降，可离子化脂质获得质子进行离子化，从而促进脂质纳米颗粒（lipid nanoparticle, LNP）与内体膜的融合，最终使得装载在脂质纳米颗粒上的 mRNA 释放到细胞质中（参见，例如，*L. Miao et al., Mol. Cancer* 2021, 20, 41.）。

可离子化脂质可以与胆固醇、辅助脂质和聚乙二醇化脂质（即 PEG 化脂质）形成脂质纳米颗粒制剂。胆固醇是一种天然的刚性和疏水性脂质，可维持脂质纳米颗粒的结构和稳定性。它还可以促进装载 mRNA 的脂质纳米颗粒（即 mRNA 纳米颗粒）与内体膜的融合。辅助脂质（例如两性离子脂质 DOPE、1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DSPC) 和 1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DOPC) 被广泛用于促进细胞膜穿透和内体膜逃逸（参见，例如，*N. Chaudhary et al., Nat. Rev. Drug Discovery* 2021, 20, 817.）。PEG 化脂质由 PEG 和锚定脂质组成。亲水性 PEG 主要分布于 mRNA 复合体表面，而疏水区嵌入脂质双层内部。PEG 化脂质的引入不仅增加了脂质纳米颗粒的半衰期也可以通过改变 PEG 链的分子量来调节粒径。通常，分子量和脂质尾长度的范围可以分别为 350 至 3000Da 和 10 至 18 个碳（参见，例如，*N. Chaudhary et al., Nat. Rev. Drug Discovery* 2021, 20, 817.）。

在过去的几十年来，研究人员开发了用于 mRNA 递送的大型可离子化脂质库，包括 Dlin-MC3-DMA、SM-102、TT3、C12-200、306O₁₀ 和 ALC-0315（参见，例如 *M. Yanez Arteta et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2018, 115, E3351; *R. Verbeke et al., Controlled Release* 2021, 333, 511; *B. Li et al., Nano Lett.* 2015, 15, 8099; *K. A. Hajj et al., Nano Lett.* 2020, 20, 5167; *K. A. Hajj et al., Small* 2019, 15, 1805097; *A. B. Vogel et al., Nature* 2021, 592, 283）。其中一些在临床应用上取得了显著成果。一个典型的例子是 Dlin-MC3-DMA，其是经美国食品和药物管理局(FDA)批准用于 siRNA 递送的关键组分（参见，例如，*A. Akinc et al., Nat. Nanotechnol.* 2019, 14, 1084）。Dlin-MC3-DMA 也被广泛用于 mRNA 递送，包括蛋白质和肽替代、基因编辑和抗病毒感染（参见，例如，*R. S. Riley et al., Sci. Adv.* 2021, 7, eaba1028.）。SM-102 和 ALC-0315 这两个“明星分子”已被 FDA 批准分别为预防 COVID-19 的 BNT162b 和 mRNA-1273 疫苗中的关键成分（参见，例如，*X. Hou et al., Nat. Rev. Mater.* 2021, 10, 1078.）。

理想的基于脂质的 mRNA 载体必须满足以下条件：1) 裸露的 mRNA 可以形成稳定的复合物，保护 mRNA 不被降解；2) 应添加四个关键组件（可离子化脂质、胆固醇、辅助脂质和聚乙二醇化脂质）以稳定 mRNA 复合物；3) 脂质纳米颗粒的成分应该被质子化以引发膜不稳定并促进 mRNA 复合物的内体逃逸；以及 4) 所有的脂质材料都是可生物降解且不会对患者造成任何伤害。

对基于脂质的递送平台进行优化时应当考虑以下几点：1) 可离子化脂质的降解能力：脂质的骨架结构通过将酯基和酯基引入脂质尾部来促进脂质的清除并降低毒性；2) 脂质纳米颗粒的免疫原性：脂质纳米颗粒内的杂环脂质可通过激活树突状细胞（DC）的干扰素基因刺激物（STING）通路来改善 mRNA 疫苗的效率（参见，例如，*L. Miao et al., Nat. Biotechnol.* 2019, 37, 1174.）；3) 脂质纳米颗粒的稳定性：一些有潜力的策略有望提高 mRNA 的稳定性疫苗，包括 pKa 优化、赋形剂引入和 mRNA 修饰等。

脂质纳米颗粒可以使用如本领域公知的组分、组合物和方法产生，参见例如 PCT/US2016/052352、PCT/US2016/068300、PCT/US2017/037551、PCT/US2015/027400、PCT/US2016/047406、PCT/US2016/000129、PCT/US2016/014280、PCT/US2016/014280、PCT/US2017/038426、PCT/US2014/027077、PCT/US2014/055394、PCT/US2016/052117、PCT/US2012/069610、PCT/US2017/027492、CT/US2016/059575 和 PCT/US2016/069491，其全部内容均以引用方式并入本文。

ii) 溶瘤病毒及其药物组合

在一些实施方案中，本申请提供了一种能够表达本申请所述嵌合蛋白构建体的溶瘤病毒。在本申请中，“溶瘤病毒”是指能够通过感染肿瘤细胞，在肿瘤细胞中复制，并且溶解肿瘤细胞的任何病毒。在某些实施方式中，溶瘤病毒进一步能够在连续的复制循环中扩散至其他肿瘤细胞。

溶瘤病毒可源自多种病毒，其非限制性实例包括痘苗病毒、腺病毒、单纯疱疹病毒 1(HSV1)、单纯疱

疹病毒 2(HSV2)、粘液瘤病毒、呼肠孤病毒、脊髓灰质炎病毒、水疱性口炎病毒(VSV)、麻疹病毒(MV)、拉沙病毒(LASV)和新城疫病毒(NDV), 以及这些病毒的变体。

在一些实施方案中, 本申请提供了溶瘤病毒, 其中包含如本申请所提供的核酸分子, 所述核酸分子可操作地连接到至少一个多核苷酸调控元件(例如, 启动子)以表达所述核酸分子编码的嵌合蛋白构建体。

5 在一些实施方案中, 本申请所述的溶瘤病毒可感染基本上任何细胞类型。在一些实施方案中, 溶瘤病毒可以是复制选择性的。复制选择性的溶瘤病毒在肿瘤细胞里的复制比在非肿瘤细胞中的复制更多。

可以理解, 如果病毒的复制处于基因表达调节因子的控制之下, 例如源自白蛋白基因的 5' 侧的增强子/启动子区域, 则可以使溶瘤病毒具有复制选择性(例如参见 Miyatake 等人, 1997, J. Virol. 71: 5124-5132)。

10 在一些实施方案中, 溶瘤病毒在其基因组中可以具有肿瘤细胞特异性启动子, 或肿瘤细胞特异性转录调控序列。“肿瘤细胞特异性”对于启动子或转录条款序列而言, 是指其通常以高于正常细胞的水平存在于靶肿瘤细胞中。通过这种方式, 可赋予溶瘤病毒增强水平的肿瘤细胞特异性。

例如, 通过将 HSV 基因可操作地连接到 TGF- β 启动子, 可以将 HSV 的主要转录单位置于肿瘤生长因子- β (TGF- β)启动子的转录控制之下。已知某些肿瘤细胞相对于相同类型的非肿瘤细胞过度表达 TGF- β 。因此, 其中复制受到 TGF- β 启动子的转录控制的溶瘤病毒是复制选择性的, 因为它在某些肿瘤细胞中比在相同类型的非肿瘤细胞中更能复制。类似的复制选择性溶瘤病毒可以使用任何已知可选择性地在受影响细胞中引起过表达的基因表达调节剂来制备。复制选择性溶瘤病毒可以是例如 HSV-1 突变体, 其中编码 ICP34.5 的基因发生突变或缺失。溶瘤病毒还可以在其基因组中进一步包含其他修饰。例如, 溶瘤病毒可以包含插入到 UL44 基因中的额外 DNA。这种插入可以产生 UL44 基因的功能失活和产生的裂解表型, 或者它可以插入到已经失活的基因中, 或替代缺失的基因。

20 在一些实施方案中, 溶瘤病毒被改造为将编码本申请所述嵌合蛋白构建体的核酸序列置于肿瘤细胞特异性启动子的控制下。

在一些实施方案中, 溶瘤病毒被改造为将至少一个病毒复制所需蛋白的编码基因置于肿瘤细胞特异性启动子的控制下。

25 在一些实施方案中, 所述溶瘤病毒载体可以表达本申请所述的嵌合蛋白构建体, 所述嵌合蛋白构建体的靶向结构域能够识别并结合肿瘤蛋白。肿瘤蛋白可以在肿瘤细胞里高表达的蛋白(例如, c-Myc, Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, KRAS), 在肿瘤细胞里表达的促进肿瘤细胞生长的蛋白(例如雌激素受体, 雄激素受体, Her2, VEGF, VEGFR, PDGFR β , EGFR, EGFR 突变体), 或促进肿瘤细胞逃逸正常免疫反应的蛋白(例如 PD-L1, TGF- β 1)。

30 在一些实施方案中, 所述嵌合蛋白构建体的靶向结构域可以结合 Bcl-2。任何能够靶向结合 bcl-2 的靶向结构域都可以使用, 例如但不限于, 开发针对 Bcl-2 抗凋亡家族成员蛋白高度保守和同源的 BH1, BH2 基序的纳米抗体序列可以作为靶向结构域, 构建完成靶向 Bcl-2 家族蛋白的 ER-TPD 元件, 并克隆装载在溶瘤病毒强启动子后, 特异性的感染肿瘤细胞后, 溶瘤病毒大量扩增, 并表达 Bcl-2 家族蛋白的 ER-TPD 元件, 实现细胞内 Bcl-2 抗凋亡成员蛋白的降解, 直接导致肿瘤细胞凋亡。

35 在一些实施方案中, 所述嵌合蛋白构建体的靶向结构域可以结合 VEGFR。任何能够靶向结合 VEGFR 的靶向结构域都可以使用, 例如但不限于, VEGFR 抗体(anti-VEGF-A 抗体 Bevacizumab and anti-VEGFR2 抗体 Ramucizumab,)的重链和轻链重组的 scFv 串联 ER-TPD 元件, 构建靶向 VEGFR ER-TPD 元件, 并克隆装载在溶瘤病毒强启动子后, 特异性的感染肿瘤细胞后, 溶瘤病毒大量扩增, 并表达 VEGFR ER-TPD 元件, 直接抑制肿瘤细胞 VEGFR 的表达, 导致肿瘤细胞因缺乏足够的营养而生长抑制和凋亡。

40 在一些实施方案中, 所述嵌合蛋白构建体的靶向结构域可以结合 TGF- β 1 和 PD-L1。任何能够靶向结合 bcl-2 的靶向结构域都可以使用, 例如但不限于, 利用 TGF- β 1 和 PD-L1 抗体的重链和轻链重组的 scFv 串联 ER-TPD 元件, 构建靶向 TGF- β 1 和 PD-L1 ER-TPD 元件, 并克隆装载在溶瘤病毒强启动子后, 特异性的感染肿瘤细胞后, 溶瘤病毒大量扩增, 并表达 TGF- β 1 和 PD-L1 ER-TPD 元件, 直接抑制和降解 TGF- β 1 和 PD-L1 在肿瘤细胞内的表达, 打破肿瘤免疫抑制微环境, 从而达到治疗肿瘤的效果。

45 不受理论限制, 但认为本申请的嵌合蛋白构建体通过溶瘤病毒载体在肿瘤细胞中表达具有独特的优势。一方面, 通过本申请的嵌合蛋白构建体靶向降解肿瘤细胞中帮助肿瘤细胞生长或免疫逃逸或者对抗凋亡的蛋白, 可以促使肿瘤细胞的凋亡或死亡; 另一方面, 溶瘤病毒载体可以在肿瘤细胞内特异性复制, 通过病毒复制和裂解促使肿瘤细胞溶解, 将两种不同的肿瘤杀伤手段整合在溶瘤病毒载体内, 能够在同一个药物形式实现协同杀伤作用。

50 在另一个方面, 本公开还提供了一种药物组合物, 其包含本公开所提供的溶瘤病毒和药学上可接受的媒介。在某些实施方式中, 药学上可接受的媒介包含任何和所有运输媒介、溶剂、稀释剂、赋型剂、佐剂、分散介质、包被、抗菌剂和抗真菌剂等, 在哺乳动物和特别是人类对象中与施用兼容的此类物质。

在某些实施方式中, 本申请所述的溶瘤病毒或其药物组合物配制为用于静脉内或瘤内施用。在某些实施方式中, 溶瘤病毒或其药物组合物可被放置于适合人类或动物使用的溶剂或稀释剂中。所述溶剂或稀释剂优选为等渗的、低渗的或弱低渗的并且具有相对低的离子强度。典型示例包括 无菌水、生理盐水(例如氯化钠)、林格液(Ringer's solution)、葡萄糖、海藻糖或蔗糖溶液、Hank's 液和其他水性生理平衡盐溶液。

在一个实施方式中, 本申请所述的溶瘤病毒或其药物组合物可具有缓冲剂。合适的缓冲剂包括但不限于磷酸盐缓冲液(例如 PBS)、碳酸氢盐缓冲液和/或能够保持生理上或微偏碱性的 pH(例如从大约 pH7 到大约 pH9)的 Tris 缓冲液。

在一个实施方式中, 本发明的溶瘤病毒组合物可能为提高其稳定性特别是在生产条件下和长期(即至少 6 个月, 优选至少 2 年)冰冻(例如 -70°C、-20°C)储存、冷藏储存(例如 4°C)、室温环境储存的稳定性而制备。多种本领域既有的病毒制剂或为冰冻的液体形式或为冻干的形式(例如 WO98/02522 和 WO2008/114021 等)。固体(例如干粉或冻干)组合物能通过涉及真空干燥和冻干的步骤获得。为说明目的, 加入 NaCl 和糖的缓冲剂特别适于保存病毒。

iii) 细胞药物组合物

在另一个方面, 本公开还提供了一种细胞药物组合物, 其包含本公开所提供的工程化细胞或细胞群和药学上可接受的媒介。示例性的媒介包括缓冲剂, 如中性缓冲盐水、磷酸盐缓冲盐水等; 碳水化合物, 如葡萄糖、甘露糖、蔗糖或葡聚糖、甘露糖醇; 蛋白质; 多肽或氨基酸, 如甘氨酸; 抗氧化剂; 螯合剂, 如 EDTA 或谷胱甘肽; 佐剂(例如氢氧化铝); 和防腐剂。在一个方面, 本发明的细胞药物组合物被配制用于静脉内施用。

III. TPD 的应用

在一方面, 本公开还提供了一种本申请所述的嵌合蛋白构建体、核酸分子或载体在制备治疗用的细胞中的用途。在一方面, 本公开还提供了一种本申请所述的嵌合蛋白构建体、核酸分子或载体在治疗疾病中的用途。在一方面, 本公开还提供了一种表达本申请所述的嵌合蛋白构建体、核酸分子或载体的细胞在疾病治疗中的用途。

1. 细胞移植

在一方面, 本公开还提供了一种本申请所述的嵌合蛋白构建体、核酸分子或载体在制备待移植细胞(例如同种异体细胞移植)中的用途。

在某些实施方式中, 所述待移植细胞是免疫细胞(例如, T 细胞)、干细胞(及其分化得到的细胞)、肾细胞、胰岛细胞、心肌细胞等。在某些实施方式中, 所述待移植细胞可以是自体细胞, 也可以是同种异体细胞。

在一方面, 本申请还提供了一种表达上文所述的嵌合蛋白构建体、核酸分子或载体的待移植细胞, 其中表达本申请所述的嵌合蛋白构建体, 所述嵌合蛋白构建体包含 ERAD 机制蛋白结合结构域和靶向结构域, 所述靶向结构域包含特异性靶向或结合靶蛋白的结构域, 所述靶蛋白是移植排斥反应相关蛋白。在某些实施方式中, 所述嵌合蛋白构建体进一步包含如本申请所述的蛋白降解通路成员(例如 E3 泛素连接酶、蛋白酶体、溶酶体)结合结构域。本申请所述的任何蛋白降解通路成员结合结构域都可以使用。

在某些实施方式中, 所述移植排斥反应相关蛋白包括抗原呈递分子(例如 MHC I 类分子、MHC II 类分子、MICA/B 分子等)、抗原识别分子(例如 TCR、CD123、NKG2D 等)、免疫检查点分子(例如 PD-1、PD-L1、CTLA4、TIM3、TIGIT、LAG3、A2AR、BTLA、IDO1、IDO2、TDO、KIR、NOX2、VISTA、SIGLEC7、PVR 等)等。

在某些实施方式中, 所述移植排斥反应相关蛋白包含免疫原性蛋白(例如, HLA (HLA α / β)、TCR (α β TCR)、NKG2D (自然杀伤细胞 2 族成员 D) 配体等)。

本公开还提供上述待移植细胞及其治疗方法, 能够克服现有细胞移植和细胞治疗中面临的个性化移植细胞和治疗细胞的来源问题, 无法标准化和规模化生产, 治疗效率低等问题。

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 γ δ 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。

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。

α β T 淋巴细胞通过称为 α β 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 α β 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 γ ϵ 、 δ ϵ 和 ζ ζ) 组成。 α β T 细胞受体 (α β 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，当同种异体移植植物上的供体 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细胞（如 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移植细胞（如 T 细胞），建议通过基因破坏 TCR 来有效阻断移植植物抗宿主病（GVHD）。此外，有必要抑制同种异体细胞（如 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。

在某些实施方式中，表达上文所述的嵌合蛋白构建体、核酸分子或载体的待移植细胞具有降低的免疫原性。

- 10 在一些实施方案中，本申请所述的具有降低的免疫原性（或具有高度兼容性）的待移植细胞为 T 细胞，其表达的 TPD 嵌合蛋白构建体包含特异性识别 TCR 和/或 HLA 的 scFv 以及 HCMV 糖蛋白 US2 和/或 US11 的跨膜结构域或其功能变体和内质网驻留结构域或其功能变体。

所述 ERAD 机制蛋白结合结构域包含如 SEQ ID NO. 76 或 SEQ ID NO. 82 所示的氨基酸序列或与其具有至少 80%（例如，至少 85%、至少 90%、至少 95%或至少 99%）同一性的氨基酸序列。

- 15 在一些实施方案中，所述具有降低的免疫原性的待移植细胞为 T 细胞，其表达的 ER-TPD 嵌合蛋白构建体包含特异性识别 TCR 的 scFv 以及腺病毒 E3-K19 的跨膜结构域或其功能变体和内质网驻留结构域或其功能变体。在一些实施方案中，所述具有降低的免疫原性的待移植细胞为 T 细胞，其表达包含靶向蛋白结合结构域和 ERAD 机制蛋白结合结构域的 ER-TPD 嵌合蛋白构建体，所述靶向蛋白结合结构域包括包含于如 SEQ ID NO: 116 所示的氨基酸序列或与其具有至少 80%（例如，至少 85%、至少 90%、至少 95%或至少 99%）同一性的氨基酸序列的 6 个 CDR。所述 ERAD 机制蛋白结合结构域包含如 SEQ ID NO. 60 所示的氨基酸序列或与其具有至少 80%（例如，至少 85%、至少 90%、至少 95%或至少 99%）同一性的氨基酸序列。

- 25 在一些实施方案中，上述具有降低的免疫原性的 T 细胞表达的 ER-TPD 嵌合蛋白构建体还包含蛋白降解通路成员（例如 E3 泛素连接酶、蛋白酶体）结合结构域，可选地，所述蛋白降解通路成员结合结构域与所述 ERAD 机制蛋白结合结构域连接。在一些实施方案中，上述具有降低的免疫原性的 T 细胞表达的 ER-TPD 嵌合蛋白构建体还包含具有如 SEQ ID NO. 147 所示的氨基酸序列的 E3 泛素连接酶结合结构域。

在一些实施方案中，上述具有降低的免疫原性的待移植细胞（如 T 细胞）还表达如上文所述的共表达部分。

- 30 例如，为了降低细胞的免疫原性或抗原呈递，可以在上述具有降低的免疫原性的待移植细胞（如 T 细胞）中表达能够降解或减少 MHC I 类或 II 类分子的蛋白作为共表达部分（例如，完整的病毒 ER 驻留糖蛋白，包括但不限于，HCMV US2、US3、US11、US10、腺病毒 E3-K19、HCMV US6 和 HSV ICP47）。TCR 的有效下调将大大抑制 TCR 介导的免疫攻击，减少异体输注 T 细胞时的 GVHD。包括天然病毒 ER 驻留的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，抑制异体 T 细胞的免疫识别。因此，如上文所述的高度兼容的 T 细胞也称为“自体通用 T 细胞（Universal T cell, UT）”或“通用 T 细胞（Universal T cell, UT）”，可实现异体输血治疗目的，且可以提高异体 T 细胞的兼容性和输注后的长期持久性。

- 35 在另一方面，本公开提供了一种降低受试者对细胞移植免疫反应的方法，包括向受试者施用治疗有效量的如上文所述的具有降低的免疫原性的待移植细胞，从而降低受试者对所述移植植物或对所述经修饰的细胞的免疫反应。在某些实施方式中，所述待移植细胞在细胞内表达如本文所述的 TPD 嵌合蛋白构建体，所述 TPD 嵌合蛋白构建体包含靶向免疫原性蛋白（例如，HLA（HLA $\alpha\beta$ ）、TCR（ $\alpha\beta$ TCR）、NKG2D（自然杀伤细胞 2 族成员 D）配体等）的结构域以及上文所述的 ERAD 机制蛋白结合结构域，以及可选地，蛋白降解通路成员结合结构域。

2. 细胞治疗

- 45 细胞治疗，通过基因工程技术改造细胞（例如免疫细胞）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目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。

在本申请中提供的待移植的细胞（例如 T 细胞），能够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等问题。

5 为了细胞治疗的目的，可以进一步对具有降低的免疫原性的待移植细胞（例如 T 细胞，进一步地，具有 TCR $\alpha\beta$ 和 MHC 分子表面表达缺陷的通用 T 细胞）进行基因工程改造，例如以表达如上文所述的共表达部分，以达到治疗目的。

10 例如，为了使待移植细胞（如 T 细胞）能够特异性作用于疾病相关的靶蛋白或表达疾病相关的靶蛋白的细胞，可以在上述具有降低的免疫原性的待移植细胞（如 T 细胞）中表达识别或结合疾病相关的靶蛋白的结合结构域或分子，例如嵌合抗原受体 CAR，工程化 TCR、或本申请提供的 CNK 受体、或抗病毒蛋白结合结构域等。

在一些实施方式中，也可以在上述具有降低的免疫原性的待移植细胞（如 T 细胞）中表达能够介导待移植疾病迁移至疾病微环境的分子（例如趋化因子受体或细胞因子受体）。

再例如，为了使待移植细胞（如 T 细胞）能够具有增加的免疫刺激活性，可以在上述具有降低的免疫原性的待移植细胞（如 T 细胞）中表达免疫刺激性分子。

15 在另一方面，本申请还提供了在本申请提供的待移植细胞（例如 UT 细胞）中通过导入 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，可选地，进一步通过优化转导元件，使得 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段，所以，CNK 技术可有效的解决单一 CAR-T 的脱靶效应，消除肿瘤免疫逃逸的机率。同时，CNK 在设计中导
20 入的复合型转接器（Chimeric Adaptor），能有效的转导和放大 NK 信号，跨越如 PD1 信号的免疫检查点的限制，高效激活 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，MHCI 的组装或转运或直接促进 MHCI 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。

25 在一方面，本公开提供了一种 UT 细胞，其还表达 CNK 受体以及可选地 CAR，这种 UT 细胞也可称为“CNKT-UT”。在本申请中验证了 CNK-UT 具有广谱的肿瘤识别和杀伤能力。本申请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
30 对肿瘤细胞杀伤和激活的功能。

在一些优选的实施方案中，所述 CNKT-UT 包含一种核酸分子，其编码与如 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。在一些优选的实施方案中，其中所述 CNKT-UT 包含一种核酸分子，其编码如 SEQ ID
35 NO. 117 所示的氨基酸序列。在另一方面，本公开还提供了 CNKT-UT 在制备用于治疗疾病的药物中的用途。

在一方面，本公开还提供了一种包含或表达本申请所述的嵌合蛋白构建体、编码其核酸分子或载体的免疫细胞，其中所述嵌合蛋白构建体包含 ERAD 机制蛋白结合结构域和靶向结构域，所述靶向结构域包含
40 特异性靶向或结合靶蛋白的结构域，所述靶蛋白在所述免疫细胞上以及在靶细胞上都有表达。在某些实施方式中，所述免疫细胞进一步包含或表达靶向所述靶蛋白的结合结构域或分子（例如 CAR）、编码其的核酸分子或载体。在某些实施方式中，此类靶蛋白的例子包括，CD123, CD5, CD7, CD38, 或 CD4。

不受理论限制，某些靶蛋白既在靶细胞（例如癌细胞或病毒感染细胞）上表达，又在用于治疗的免疫细胞上表达。这类靶点通常难以通过细胞治疗的方法进行治疗，因此当用于治疗的免疫细胞上表达靶向此类靶点的 CAR，则 CAR 也会导致识别免疫细胞自身表达的同一靶点，导致免疫细胞发生自噬，进而无法
45 正常扩增，或者对靶细胞杀伤效果有限。通过本申请提供的嵌合蛋白构建体，可以将免疫细胞自身表达的靶蛋白降解，从而避免自噬作用，同时又保留了对靶细胞的特异性杀伤作用。使用本申请的嵌合蛋白构建体的另一个优势在于，可以通过共表达的方式同时表达靶向该靶点的嵌合蛋白构建体和靶向该靶点的结合结构域（例如 CAR, TCR 等），比传统基因敲除等方法更简便，效果更好。

在某些实施方式中，所述嵌合蛋白构建体进一步包含如本申请所述的蛋白降解通路成员（例如 E3 泛素连接酶、蛋白酶体、溶酶体）结合结构域。本申请所述的任何蛋白降解通路成员结合结构域都可以使用。
50

用于过继细胞疗法的细胞施用方法是已知的，并且可以与所提供的方法和组合物结合使用。例如，过继性 T 细胞疗法的方法在例如 Gruenberg 等的美国专利申请公开号 2003/0170238；Rosenberg 的美国专利号 4,690,915；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)
55 PLoS ONE 8(4): e61338。

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一千万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。肠胃外输注包括肌肉内、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)的功效和/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。

在过继细胞疗法的背景下,给定“剂量”的施用包括作为单一组合物和/或单次不间断施用(例如,作为单次注射或连续输注)的给定量或数量的细胞的施用,并且还包括在指定的时间段(不超过 3 天)中,以多个个体组合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。

3. 靶向性降解致病蛋白

在另一方面,本公开还提供了一种在体内或体外降解靶蛋白的方法,其包括将如本文所述的核酸分子和/或载体递送至表达靶蛋白的细胞或受试者内,所述核酸分子和/或所述载体在所述细胞或受试者内表达产生如本文所述的嵌合蛋白构建体。所述嵌合蛋白构建体的靶向蛋白结合结构域能够结合靶蛋白,所述嵌合蛋白构建体的 ERAD 机制蛋白结合结构域能够利用 ERAD 通路诱导泛素-蛋白酶体系统(UPS)的空间上靠近,从而利用 UPS 中的蛋白酶体来降解靶蛋白。当所述嵌合蛋白构建体进一步包含蛋白降解通路成员结合结构域时,该方法将诱导额外的降解系统靠近靶蛋白,使得降解效果得到显著提升。

在另一方面,本公开还提供了一种治疗有需要的受试者的病症或疾病和/或预防其复发的方法,包括:向所述受试者施用治疗有效量的上文所述的药物组合物(包含例如本申请所述的核酸分子,例如 mRNA、病毒载体、溶瘤病毒、嵌合蛋白构建体等)。

在某些实施方式中,所述方法包括将本申请所述的编码嵌合蛋白构建体的核酸分子(例如 mRNA)或载体(例如病毒载体)导入有需要的个体中,以使所述核酸分子或载体在所述个体的细胞中表达所述嵌合蛋白构建体。

任何常规的施用路径都可在本发明的情况下使用,包括非肠道的、局部的或粘膜路径。非肠道途径为注射或输液施用,包含全身以及局部路径。通常非肠道注射类型是静脉内的(进入静脉)、动脉内的(进入动脉)、皮肤内的(进入真皮层)、皮下的(表皮以下)、肌肉的(进入肌肉)以及瘤内的(进入肿瘤或极为贴近肿瘤的部位)。典型的输液是通过静脉途径。粘膜施用包含但不限于口/食道、鼻内、气管、肺内、阴道内、或直肠内的途径。局部施用也可通过透皮肤的手段完成(例如贴片等依此类推)。可使用常规的注射器和针头来施用或任何现有技术中已有的能够促进或提高在对象内递送活性剂的化合物或装置。

根据所述个体需要治疗的疾病,以及需要降解的致病蛋白,可以选择适当的嵌合蛋白构建体,及其核酸分子和载体。

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、感染性疾病(例如病毒感染类疾

病)、自身免疫性疾病、神经退行性疾病、代谢类疾病。

在一些实施方案中,所述疾病是肿瘤或癌症,所述嵌合蛋白构建体的靶向结构域包含特异性靶向肿瘤相关的靶点或免疫功能相关的靶点。所述肿瘤相关的靶点或免疫功能相关的靶点如本申请前文所述。

5 在一些优选的实施方案中,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。

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。

10 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。

15 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。

20 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)、骨髓增生异常综合症(MDS)等

25 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。

在另一方面,本公开还提供了一种治疗有需要的受试者的肿瘤或癌症的方法,包括:向所述受试者施用治疗有效量的本申请所述的溶瘤病毒或溶瘤病毒药物组合物。本发明的溶瘤病毒或组合物可向对象中单一剂量或多剂量施用。如果多剂量施用,可通过相同的或不同的路径进行施用,并且可在同一部位或不同部位施用。也可连续循环施用,在休息期之后重复。每次施用之间的间隔可从几小时到一年(例如24h、30 48h、72h、每周、每两周、每月或每年)。间隔也可是不定期的(例如在肿瘤发展之后)。每次施用剂量可在上述范围内变化。在某些实施方式中,施用溶瘤病毒的路径可以包括静脉内的和瘤内的路径。

在本发明的情况下,可以以合适的剂量(例如 10^7 到 5×10^9 pfu)一次或多次施用溶瘤病毒。每次病毒施用的间隔可从约1天到约8周范围内变化。另一优选治疗方案涉及IO8或IO9Pfu的溶瘤痘苗病毒的2到35 5次(例如3)静脉或瘤内施用,大约有1或2周间隔,其可以由医生根据实际情况选择。在一些实施方案中,所述方法包括向所述受试者施用包含如上文所述的核酸分子的溶瘤病毒载体,其中所述受试者患有癌症。所述药物组合物或包含如上文所述的核酸分子的溶瘤病毒载体能够靶向性降解致病蛋白,例如,致癌蛋白、病毒蛋白、免疫相关蛋白等。

40 在一些实施方案中,所述疾病是感染类疾病,所述嵌合蛋白构建体的靶向结构域包含特异性靶向感染类疾病相关的靶点。所述感染类疾病相关的靶点如本申请前文所述。

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。

45 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。

50 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。

55 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。

- 5 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。

- 10 在一些实施方案中，所述疾病是自身免疫性疾病，所述嵌合蛋白构建体的靶向结构域包含特异性靶向自身抗原相关的靶点。所述自身抗原相关的靶点如本申请前文所述。

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。

- 15 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。

在一些实施方案中，所述疾病是神经类或退行性疾病，所述嵌合蛋白构建体的靶向结构域包含特异性靶向神经系统疾病相关的靶点。所述神经系统疾病相关的靶点如本申请前文所述。

- 20 在一些实施方案中，所述神经类疾病包括神经系统疾病周围神经疾病如三叉神经痛、面瘫、面肌痉挛、前庭神经元炎、舌咽神经痛、单神经疾病、臂丛神经痛、多数性单神经病、多发性神经病、急性炎症性脱髓鞘性多发性神经病、慢性炎症性脱髓鞘性多发性神经病；

脊髓疾病如脊髓炎、压迫性脊髓病、脊髓亚急性联合变性、脊髓空洞症、脊髓血管病、脊髓蛛网膜炎等；

- 25 脑血管疾病如短暂性脑缺血发作、脑梗死、脑出血、蛛网膜下腔出血、颅内静脉系统血栓形成等；

中枢神经系统感染性疾病如有病毒、细菌、真菌或寄生虫等感染导致的脑膜炎、脑炎等以及有慢病毒感染导致的慢病毒脑炎等；

中枢神经系统脱髓鞘性疾病如多发性硬化、视神经脊髓炎、急性传播性脑脊髓炎、脑白质营养不良等；

- 30 运动障碍疾病如帕金森病、舞蹈病、肝豆状核变性、肌张力障碍、特发性震颤、迟发型运动障碍等；癫痫；

头痛如偏头痛、紧张性头痛、丛集性头痛等

神经系统变性疾病如运动神经元病、阿尔茨海默病、路易体痴呆、额颞叶痴呆、多系统萎缩等；

神经系统遗传性疾病如遗传性共济失调、遗传性痉挛性截瘫、腓骨肌萎缩症、神经纤维瘤病、结节性

- 35 硬化、脑面血管瘤病等；

神经系统发育异常性疾病如先天性脑积水、脑性瘫痪、颅底凹陷症、小脑扁桃体下病等；

神经-肌肉接头和肌肉疾病如重症肌无力、周期性瘫痪、多发性肌炎、进行性肌营养不良症、肌强直性肌病（强直性肌营养不良症、先天性肌强直症）、代谢性肌病（线粒体肌病、脂质沉积性肌病、糖原沉积症）等；

- 40 自主神经系统疾病如雷诺氏病、红斑性肢痛症、面偏侧萎缩症、全身自主神经功能不全、自发性多汗症、进行性脂肪营养不良等；

神经系统肿瘤如脑胶质瘤、淋巴瘤、脊膜瘤等；

神经系统副肿瘤综合征如副肿瘤性小脑变性、副肿瘤性脑脊髓炎、亚急性坏死性脊髓病、亚急性运动神经元病、副肿瘤性感觉神经元病等。

- 45 在一些优选的实施方案中，神经退行性疾病会导致神经元结构和功能逐渐丧失，包括神经元死亡和胶质细胞平衡，会导致痴呆等认知障碍。示例性的神经退行性疾病包括：阿尔兹海默症、帕金森病 (PD)、亨廷顿氏舞蹈病、早发性 AD 或 PD、和肌萎缩性脊髓侧索硬化症 (ALS) 等。

在一些实施方案中，所述疾病是代谢性疾病，例如糖尿病，高脂血症，痛风等。所述代谢性疾病相关的靶点如本申请前文所述。

50

实施例

实施例 1：ER-TPD 嵌合蛋白构建体的设计

- 55 本实施例设计了五种结构的基于内质网的靶向蛋白降解技术（Endoplasmic Reticulum-based Targeted Protein Degradation, ER-TPD）的嵌合蛋白构建体（chimeric protein construct）。其中，第一种结构是基本 ER-TPD 嵌合蛋白构建体，其它四种结构是在第一种结构的基础上再进一步增加 E3 泛素连接酶配体、E2 泛素结合酶配体或溶酶体配体或其组合而形成的、功能更强大的 ER-TPD 嵌合蛋白构建体。ER-TPD 嵌合

蛋白构建体包含结合靶蛋白并使其定向降解的重组蛋白分子多功能集成的结构域或其功能变体。

1.1 基本 ER-TPD 嵌合蛋白构建体

在一些实施方式中,使用基本 ER-TPD 嵌合蛋白构建体 TBD-TMD-ERD,其线性示意图和结构示意图如图 1A 所示,其包含 3 个结构域:(1)靶向结构域(targeted protein binding domain, TBD)或其功能变体,其可以是靶向的亲配体蛋白分子或其功能变体(可以是抗体片段、多肽、天然受体、配体,或具有靶蛋白亲和力的人工重组蛋白或其结合结构域);(2)病毒内质网(ER)驻留糖蛋白的跨膜结构域(transmembrane domain, TMD)或其功能变体;和(3)病毒内质网驻留糖蛋白的胞质结构域(ER retention domain, ERD)或其功能变体。任选地,所述靶向结构域或其功能变体、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之间通过铰链或接头连接。

如图 1B 所示,ER-TPD 嵌合蛋白构建体 TBD-TMD-ERD 的工作结构原理如下:[1]特异性结合和滞留:嵌合蛋白构建体表达后,TBD-TMD-ERD 驻留在内质网,通过靶向结构域和靶蛋白结合,靶蛋白滞留在内质网内,阻止合成的靶蛋白转运到高尔基体。[2]逆转运:嵌合蛋白构建体结合靶蛋白后,通过 ERAD 机制中的逆转运器,将嵌合蛋白构建体和靶蛋白形成的复合物从内质网内转运到胞质内。经典的逆转运器包括 Derlin、E3 连接酶 Hrd1 以及其伴侣蛋白 Sel1L,并能够招募细胞质内 ATPase p97。Derlin 具有 6 个穿膜结构域,其中 N 端和 C 端都在胞质内,形成转运通道,同时逆转运过程都需要 ATPase p97 的参与(Byun H et al. ERAD and how viruses exploit it. Front Microbiol. 2014 Jul 3; 5:330)。[3]泛素化和蛋白酶体降解:逆转运器可与内质网固有的 E3 泛素化连接酶作用,促进靶蛋白泛素化,逆转运器将泛素化的靶蛋白转运到胞质内,并被蛋白酶体识别和降解。

1.2 具有 E3 泛素连接酶配体结构域的 ER-TPD 嵌合蛋白构建体

在一些实施方式中,使用具有 E3 泛素连接酶配体结构域的 ER-TPD 嵌合蛋白构建体 TBD-TMD-ERD-E3L,其线性示意图和结构示意图分别如图 2A 和 2B 所示,其包含 4 个结构域:(1)靶向结构域或其功能变体,其可以是靶向的亲配体蛋白分子或其功能变体(可以是抗体片段,多肽,自然受体,配体,或具有靶蛋白亲和力的人工重组蛋白结构域);(2)病毒内质网驻留糖蛋白的跨膜结构域或其功能变体;(3)病毒内质网驻留糖蛋白的胞质结构域或其功能变体;和(4)E3 泛素连接酶配体(ligand for E3 ligase, E3L)或其功能变体,该 E3 泛素连接酶配体可以是多肽或重组蛋白,用于连接内质网外数量诸多的 E3 泛素连接酶。任选地,所述靶向结构域或其功能变体、病毒内质网驻留糖蛋白的跨膜结构域或其功能变体、病毒内质网驻留糖蛋白的胞质结构域或其功能变体以及 E3 泛素连接酶配体结构域或其功能变体之间通过铰链或接头连接。由于内质网固有的 E3 泛素连接酶数量有限,同时还因为内质网内错误折叠蛋白的 ERAD 途径会竞争 E3 泛素连接酶,因此,若不增加内质网外的泛素化蛋白酶体降解途径,则无法实现靶蛋白高效降解。基于此,本申请发明人发现,通过外源增加 E3 泛素连接酶配体,可以实现靶蛋白的高效泛素化和降解。

如图 2C 所示,ER-TPD 嵌合蛋白构建体 TBD-TMD-ERD-E3L 的工作结构原理如下:[1]特异性结合和滞留:嵌合蛋白构建体表达后,TBD-TMD-ERD-E3L 驻留在内质网,通过靶向结构域和靶蛋白结合,靶蛋白滞留在内质网内,阻止合成的靶蛋白转运到高尔基体。[2]逆转运:嵌合蛋白构建体结合靶蛋白后,通过 ERAD 机制中的逆转运器,将嵌合蛋白构建体和靶蛋白形成的复合物从内质网内转运到胞质内。经典的逆转运器包括 Derlin、E3 连接酶 Hrd1 以及其伴侣蛋白 Sel1L,并能够招募细胞质内 ATPase p97。Derlin 具有 6 个穿膜结构域,其中 N 端和 C 端都在胞质内,形成转运通道,同时逆转运过程都需要 ATPase p97 的参与。[3]泛素化和蛋白酶体降解:嵌合蛋白构建体中的 E3 连接酶配体和 E3 连接酶复合物结合,并通过复合物中的 E2 泛素结合酶对靶蛋白进行泛素化,并转运到蛋白酶体进行降解。其中靶向 E3 连接酶复合物配体可以是人工筛选和构建的蛋白序列,也可以是天然存在的蛋白序列或其重组序列,如源自 I κ B α 的磷酸多肽(DRHDSGLDSM, SEQ ID NO. 119),该多肽能招募 E3 泛素连接酶复合物中的 SCF β -TRCP,实现介导靶蛋白的泛素化降解途径(Sakamoto KM et al. Protacs: chimeric molecules that target proteins to the Skp1-Cullin-F box complex for ubiquitination and degradation. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001;98:8554-9);还可以包括源自 HIF-1 α 的 E3 连接酶识别肽段(ALAPYIP, SEQ ID NO. 120),通过该识别肽段连接 E3 连接酶 VHL,从而实现泛素化降解途径(Ivan M et al. HIF α targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O $_2$ sensing. Science. 2001;292:464-8)。

1.3 具有 E2 泛素结合酶配体结构域的 ER-TPD 嵌合蛋白构建体

在一些实施方式中,使用具有 E2 泛素结合酶配体结构域的 ER-TPD 嵌合蛋白构建体 TBD-TMD-ERD-E2L,其线性示意图和结构示意图分别如图 3A 和 3B 所示,其包含 4 个结构域:(1)靶向结构域或其功能变体,其可以是靶向的亲配体蛋白分子或其功能变体(可以是抗体片段,多肽,自然受体,配体,或具有靶蛋白亲和力的人工重组蛋白结构域);(2)病毒内质网驻留糖蛋白的跨膜结构域或其功能变体;(3)病毒内质网驻留糖蛋白的胞质结构域或其功能变体;和(4)E2 泛素结合酶配体结构域或其功能变体,该 E2 泛素结合酶配体可以是多肽或重组蛋白。任选地,所述靶向结构域或其功能变体、病毒内质网驻留糖蛋白的跨膜结构域或其功能变体、病毒内质网驻留糖蛋白的胞质结构域或其功能变体以及 E2 泛素结合酶配体结构域或其功能变体之间通过铰链或接头连接。

如图 3C 所示, ER-TPD 嵌合蛋白构建体 TBD-TMD-ERD-E2L 的工作结构原理如下: [1]特异性结合和滞留: 嵌合蛋白构建体表达后, TBD-TMD-ERD-E2L 驻留在内质网, 通过靶向结构域和靶蛋白结合, 靶蛋白滞留在内质网内, 阻止合成的靶蛋白转运到高尔基体。[2]逆转运: 嵌合蛋白构建体结合靶蛋白后, 通过 ERAD 机制中的逆转运器, 将嵌合蛋白构建体和靶蛋白形成的复合物从内质网内转运到胞质内。经典的逆转运器包括 Derlin、E3 连接酶 Hrd1 以及其伴侣蛋白 Sel1L, 并能够招募胞质内 ATPase p97。Derlin 具有 6 个穿膜结构域, 其中 N 端和 C 端都在胞质内, 形成转运通道, 同时逆转运过程都需要 ATPase p97 的参与。[3]泛素化和蛋白酶体降解: 嵌合蛋白构建体通过 E2 泛素结合酶配体结构域直接和 E2 泛素结合酶结合, 并实现 E2 泛素结合酶对靶蛋白的泛素化, 并转运到蛋白酶体进行降解。E2 泛素结合酶配体结构域可以通过源于 IAP 家族蛋白 RING 锌指结构域与 E2 泛素结合酶的 UBC 结构域结合, 从而实现靶蛋白的泛素化和蛋白酶体降解。其中靶向 E2 泛素结合酶的配体可以是源自 IAP 家族蛋白的 RING 锌指结构域或带 RING 锌指结构域的重组蛋白序列。IAP (inhibitor of apoptosis proteins) 是凋亡蛋白抑制分子家族, IAP 可作为促凋亡蛋白 (如 Caspases、SMAC、ARTS) 的 E3 连接酶, 可以实现促凋亡蛋白的泛素化和降解, 从而抑制细胞凋亡; 并能通过泛素化 RIPK2(receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 2)调控 NOD 信号和免疫反应。IAP 的 5 个家族成员 (XIAP、cIAP1、cIAP2、Livin 和 ILP2) 均具有 RING 锌指结构域, 能和泛素化结合酶 E2 以及 Apollon 蛋白结合 (Mikihiko Naito et al. SNIPERs-Hijacking IAP activity to induce protein degradation. Drug Discov Today Technol. 2019 Apr;31:35-42)。因此, 可以利用源自 IAP 家族成员的 RING 锌指结构域来连接嵌合蛋白构建体和泛素结合酶 E2, 实现更高效的靶蛋白泛素化和蛋白酶体介导的降解。以下序列可以作为设计 E2 配体的序列:

来自 XIAP 的 RING 结构域: CKICMDRNIIVFVPCGHLVTCKQCAEAVDKCPMCY (SEQ ID NO. 155);

来自 cIAP1 的 RING 结构域: CKVCMDKEVSVVFIPCGHLVVCQECAPSLRKCPICR (SEQ ID NO. 156);

来自 cIAP2 的 RING 结构域: CKVCMDKEVSVVFIPCGHLVVCQECAPSLRKCPICR (SEQ ID NO. 157);

来自 Livin 的 RING 结构域: CKVCLDRAVSIVFVPCGHLVCAECAPGLQLCPICR (SEQ ID NO. 158);

来自 ILP-2 的 RING 结构域: CKICMDRHIIVFVPCGHLVTCKQCAEAVDRCPMCS (SEQ ID NO. 159)。

1.4 具有溶酶体配体结构域的 ER-TPD 嵌合蛋白构建体

在一些实施方式中, 使用具有溶酶体配体结构域的 ER-TPD 嵌合蛋白构建体 TBD-TMD-ERD-LL, 其线性示意图和结构示意图分别如图 4A 和 4B 所示, 其包含 4 个结构域: (1) 靶向结构域或其功能变体, 其可以是靶向的亲配体蛋白分子或其功能变体 (可以是抗体片段, 多肽, 自然受体, 配体, 或具有靶蛋白亲和力和的人工重组蛋白结构域); (2) 病毒内质网驻留糖蛋白的跨膜结构域或其功能变体; (3) 病毒内质网驻留糖蛋白的胞质结构域或其功能变体; 和 (4) 溶酶体配体结构域或其功能变体, 该溶酶体配体可以是多肽或重组蛋白。任选地, 所述靶向结构域或其功能变体、病毒内质网驻留糖蛋白的跨膜结构域或其功能变体、病毒内质网驻留糖蛋白的胞质结构域或其功能变体以及溶酶体配体结构域或其功能变体之间通过铰链或接头连接。

如图 4C 所示, ER-TPD 嵌合蛋白构建体 TBD-TMD-ERD-LL 的工作结构原理: [1]特异性结合和滞留: TBD-TMD-ERD-LL 表达驻留在内质网内膜并通过靶向靶蛋白配体和靶蛋白结合, 滞留在内质网内, 阻止合成的靶蛋白转运到高尔基体。[2]逆转运: 嵌合蛋白构建体结合靶蛋白后, 通过 ERAD 机制中的逆转运器, 将嵌合蛋白构建体和靶蛋白形成的复合物从内质网内转运到胞质内。[3]溶酶体内吞和水解: 嵌合蛋白构建体通过溶酶体配体结构域直接和溶酶体分子伴侣结合, 并通过分子伴侣转运到溶酶体, 在溶酶体内, 各种水解酶对靶蛋白进行降解。

溶酶体配体结构域可以是 KFERQ 类似基序或带有 KFERQ 类似基序的重组蛋白序列, KFERQ 类似基序能被分子伴侣 Hsc70 特异性的识别和结合, 通过分子伴侣自噬 (Chaperone mediated Autophagy, CMA) 机制并实现靶蛋白 ER-TPD 复合物被转运到溶酶体而被各类水解酶所降解。

分子伴侣自噬 (Chaperone mediated Autophagy, CMA) 是一种选择性蛋白自噬和溶酶体降解过程。分子伴侣 Hsc70 通过识别和靶向靶蛋白上的 KFERQ 类似基序, 并通过识别溶酶体膜上的受体蛋白 LAMP2A, 将靶蛋白转运到溶酶体进行降解。其中 KFERQ 类似基序可以是源自 RNaseA 的 KFERQ (Backer J et al. Regulation of catabolism of microinjected ribonuclease A requires the amino-terminal 20 amino acids. Proc Natl Acad Sci. 1983; 80:2166-2170); 源自 Hsc70 的 QKILD (SEQ ID NO. 124) 和 QRDKV (SEQ ID NO. 125) (Cuervo AM et al. Unique properties of lamp2a compared to other lamp2 isoforms. J Cell Sci. 2000; 113(Pt 24):4441-4450); 源自 hemoglobin 的 QRFFE (SEQ ID NO. 126) (Slot LA et al. Intracellular protein degradation in serum-deprived human fibroblasts. Journal of Biochemistry. 1986; 237:491-498); 源自醛缩酶 B 的 QKKEL (SEQ ID NO. 127)、QFREL (SEQ ID NO. 128) 和 IKLDQ (SEQ ID NO. 129); 源自 Annexin I 的 EFLKQ (SEQ ID NO. 130); 源自 Annexin II 的 QKVFD (SEQ ID NO. 131); 源自 Annexin IV 的 QELLR (SEQ ID NO. 132); 源自 Annexin VI 的 QEFIK (SEQ ID NO. 133); 源自天冬氨酸氨基转移

酶的 RKVEQ (SEQ ID NO. 134); 源自 c-fos 的 NLLKE; 源自 GAPDH 的 NRVVD (SEQ ID NO. 135); 源自谷胱甘肽转移酶的 NKKFE (SEQ ID NO. 136); 源自 IkB 的 VKELQ (SEQ ID NO. 137); 源自 α -2-微球蛋白的 VDKLN (SEQ ID NO. 138) 和 RIKEN (SEQ ID NO. 139); 源自 Pax-2 的 DVVRQ (SEQ ID NO. 140)、QRIVE (SEQ ID NO. 141) 和 QLLRE (SEQ ID NO. 142); 源自 26S proteasome (C8) 的 IEKLQ (SEQ ID NO. 143); 源自 19S 的蛋白酶体(PA28)的 QEKFV (SEQ ID NO. 144); 源自丙酮酸激酶的 QDLKF (SEQ ID NO. 145); 源自 α -synuclein 的 VKKDQ (SEQ ID NO. 146) (Massey AC. et al. Chaperone-Mediated Autophagy in Aging and Disease. Current Topics in Developmental Biology, 2006; 73:205-235)。

1.5 具有 E3 泛素化连接酶和溶酶体配体结构域的 ER-TPD 嵌合蛋白构建体

- 在一些实施方式中, 使用具有 E3 泛素化连接酶配体和溶酶体配体组合的 ER-TPD 嵌合蛋白构建体 TBD-TMD-ERD-E3L-LL, 其线性示意图和结构示意图分别如图 5A 和 5B 所示, 其包含 5 个结构域: (1) 靶向结构域或其功能变体, 其可以是靶向的亲配体蛋白分子或其功能变体 (可以是抗体片段, 多肽, 自然受体, 配体, 或具有靶蛋白亲和力的人工重组蛋白结构域); (2) 病毒内质网驻留糖蛋白的跨膜结构域或其功能变体; (3) 病毒内质网驻留糖蛋白的胞质结构域或其功能变体; (4) E3 泛素连接酶配体或其功能变体 (ligand for E3 ligase, E3L) 和 (5) 溶酶体配体或其功能变体 (Ligand for lysosome)。任选地, 所述靶向结构域或其功能变体、病毒内质网驻留糖蛋白的跨膜结构域或其功能变体、病毒内质网驻留糖蛋白的胞质结构域或其功能变体、E3 泛素连接酶配体或其功能变体以及溶酶体配体结构域或其功能变体之间通过铰链或接头连接。

- 如图 5C 所示, ER-TPD 嵌合蛋白构建体 TBD-TMD-ERD-E3L-LL 的工作结构原理如下: [1]特异性结合和滞留: 嵌合蛋白构建体表达后, TBD-TMD-ERD-E3L-LL 驻留在内质网, 通过靶向结构域和靶蛋白结合, 靶蛋白滞留在内质网内, 阻止合成的靶蛋白转运到高尔基体。[2]逆转运: 嵌合蛋白构建体结合靶蛋白后, 通过 ERAD 机制中的逆转运器, 将嵌合蛋白构建体和靶蛋白形成的复合物从内质网内转运到胞质内。[3]溶酶体内吞和酶解以及泛素化/蛋白酶体降解: 嵌合蛋白构建体被转运到内质网外, 通过溶酶体配体结构域直接和溶酶体分子伴侣结合, 并通过分子伴侣转运到溶酶体, 在溶酶体内, 各种水解酶对靶蛋白进行降解; 同时部分嵌合蛋白被转运到内质网外, 嵌合蛋白构建体中的 E3 连接酶配体可和 E3 连接酶复合物结合, 并通过复合物中的 E2 泛素结合酶对靶蛋白进行泛素化, 并转运到蛋白酶体进行降解。

实施例 2: 靶向 TCR 的 ER-TPD 嵌合核酸构建体的设计

本实施例设计了两款靶向 TCR 的 ER-TPD 嵌合核酸构建体 TCR-ER-TPD。

- 在一些实施方式中, 如图 6 所示, 采用单一慢病毒表达载体和 EF1 α 启动子, 设计了以下两款靶向 TCR 的 ER-TPD 嵌合蛋白构建体 TCR-ER-TPD:

(A) TCR-TPD1: anti-TCR-E3/19K TMD-ERD-P2A-EGFRt (图 6A);

(B) TCR-TPD2: anti-TCR-E3/19K TMD-ERD-G4S-E3L-P2A-EGFRt (图 6B)。

实施例 3: 靶向 TCR 的 ER-TPD 嵌合蛋白构建体的表达质粒的制备

- 全基因合成实施例 2 设计的靶向 TCR 的 ER-TPD 嵌合蛋白构建体 TCR-ER-TPD (TCR-TPD1 和 TCR-TPD2) 的编码核苷酸序列, 其中, TCR-TPD1 的核苷酸序列如 SEQ ID NO.160 所示, 其编码蛋白如 SEQ ID NO. 161 所示; TCR-TPD2 的核苷酸序列如 SEQ ID NO. 162 所示, 其编码蛋白如 SEQ ID NO. 163 所示。通过分子克隆的方式分别将 TCR-TPD1 的核苷酸序列和 TCR-TPD2 的核苷酸序列连接到慢病毒载体 pCDH-CMV-MCS-EF1 α -Puro (购自优宝生物), 构建 TCR-ER-TPD 慢病毒目标载体, 并通过测序确定正确后, 分别用质粒转化 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 PureLink™ HiPure Plasmid Maxiprep Kit (Thermo Fisher) 进行质粒生产和纯化, 分别获得 TCR-ER-TPD 慢病毒质粒, 即 TCR-TPD1 慢病毒质粒和 TCR-TPD2 慢病毒质粒。

实施例 4: 靶向 TCR 的 ER-TPD 嵌合蛋白构建体的病毒制备

- 将实施例 3 获得的 TCR-ER-TPD 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 的比例用聚乙二醇亚胺转染试剂 (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 PureLink™ 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°C, 3000rpm 离心 10~15 分钟后经 0.45 μ m 滤膜过滤, 最后于 4°C, 25000rpm 超离心 2~3 小时, 浓缩病毒, 收集 TCR-ER-TPD 慢病毒 (TCR-TPD1 慢病毒或 TCR-TPD2 慢病毒) 浓缩液, 将收集的 TCR-ER-TPD 慢病毒浓缩液转入 -80°C 保存。

实施例 5: TCR ER-TPD Jurkat 细胞的制备

复苏的 Jurkat 细胞培养在加有 5% FBS 的 RPMI1640 培养基, 在 37°C、5%CO₂ 培养箱中培养, 每 2-3

天换一次液,并保持细胞密度在 1×10^6 个单个细胞/ml,待细胞状态恢复,用实施例 4 制备的装载有 TCR-ER-TPD 慢病毒质粒的慢病毒对恢复的细胞进行转染。具体步骤如下:将 Jurkat 细胞稀释至浓度为 0.5×10^6 个单个细胞/ml,铺在 24 孔板中,分别取实施例 4 制备的 TCR-TPD1 慢病毒和 TCR-TPD2 慢病毒浓缩液,按照 MOI=1 的值将病毒液加入细胞,并加入 Polybrene 5 μ g/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 TCR-ER-TPD 的 Jurkat 细胞(TCR ER-TPD Jurkat 细胞),然后进行流式检测细胞表型。继续培养 96h 和 6 天后可进行下一步的表型检测和细胞功能实验。

实施例 6: ER-TPD 转染细胞的表型检测

对实施例 5 制备的 TCR ER-TPD Jurkat 细胞进行流式细胞检测。图 7 示出了 TCR ER-TPD Jurkat 细胞在 48h (A)、96h (B) 和第 6 天(C)时细胞表型检测结果。在细胞培养和流式细胞检测过程中,分别取 5×10^5 个未转染的 Jurkat 细胞和转染 TCR-ER-TPD 慢病毒载体转染的 Jurkat 细胞进行培养,经过抗体 CD8-Pacific Blue、CD4-APC、EGFR-PE、TCR- $\alpha\beta$ -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,(A)经过 48h 的培养,未转染的 Jurkat 细胞表达 TCR- $\alpha\beta$,不表达 EGFR;TCR-TPD1 慢病毒转染改造 Jurkat 细胞,EGFR 高表达;TCR- $\alpha\beta$ 开始降解,细胞膜上的表达量下降;TCR-TPD2 慢病毒转染改造 Jurkat 细胞,EGFR 高表达,TCR- $\alpha\beta$ 细胞膜表达量下降程度显著高于 TCR-TPD1 慢病毒;(B)经过 96h 的培养,两种 TPD 病毒转染的 Jurkat 细胞表面 TCR 都出现下降,TCR-TPD2 慢病毒转染后 TCR 下降的程度显著优于 TCR-TPD1 慢病毒;(C)经过 6 天的培养,两种 TPD 病毒转染的 Jurkat 细胞表面 TCR 都出现下降,TCR-TPD2 慢病毒转染后 TCR 下降的程度显著优于 TCR-TPD1 慢病毒。

实施例 7: 靶向 HLA 的 ER-TPD 嵌合核酸构建体的设计

本实施例设计了靶向 HLA 的 ER-TPD 嵌合核酸构建体。

在一些实施方式中,如图 8 所示,采用单一慢病毒表达载体和 EF1 α 启动子,设计了以下三种表达载体:

(A) CNK: DAPI0-CD3 ζ -T2A-NKG2D (图 8A);

(B) HLA-TPD: E3/19K-E3L (图 8B);

(C) CNK-HLA-TPD: DAPI0-CD3 ζ -T2A-NKG2D-p2A-E3/19K-E3L (图 8C)。

其中,HLA-TPD 是靶向 HLA 的 ER-TPD 嵌合蛋白构建体 HLA-ER-TPD;CNK-HLA-TPD 是靶向 HLA 的 ER-TPD 嵌合蛋白构建体 CNK-HLA-ER-TPD。

实施例 8: 靶向 HLA 的 ER-TPD 嵌合蛋白构建体的表达质粒的制备

全基因合成实施例 7 设计的靶向 HLA 的 ER-TPD 嵌合蛋白构建体的编码核苷酸序列(E3/19K-E3L 核苷酸序列如 SEQ ID NO. 164 所示,其编码蛋白如 SEQ ID NO. 165 所示;DAPI0-CD3 ζ -T2A-NKG2D-p2A-E3/19K-E3L 的核苷酸序列如 SEQ ID NO. 166 所示,其编码蛋白如 SEQ ID NO. 167 所示),全基因合成实施例 7 设计的 CNK 的核苷酸序列(其核苷酸序列如 SEQ ID NO. 168 所示,其编码蛋白如 SEQ ID NO. 169 所示)。通过分子克隆的方式分别将靶向 HLA 的 ER-TPD 嵌合蛋白构建体的编码核苷酸序列和 CNK 核苷酸序列连接到慢病毒载体 pCDH-CMV-MCS-EF1 α -Puro (购自优宝生物),构建 HLA-TPD 慢病毒目标载体、CNK-HLA-TPD 慢病毒目标载体以及 CNK 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 PureLink™ HiPure Plasmid Maxiprep Kit (Thermo Fisher) 进行质粒生产和纯化,分别获得 TCR-ER-TPD 慢病毒质粒(HLA-TPD 慢病毒质粒、CNK-HLA-TPD 慢病毒质粒)以及 CNK 慢病毒质粒。

实施例 9: 靶向 HLA 的 ER-TPD 嵌合蛋白构建体的病毒制备

将实施例 8 获得的 TCR-ER-TPD 慢病毒质粒和 CNK 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 PureLink™ 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°C,3000rpm 离心 10~15 分钟后经 0.45 μ m 滤膜过滤,最后于 4°C,25000rpm 超离心 2~3 小时,浓缩病毒,分别收集 HLA-TPD 慢病毒浓缩液、CNK-HLA-TPD 慢病毒浓缩液以及 CNK 慢病毒浓缩液,将收集的慢病毒浓缩液转入 -80°C 保存。

实施例 10: HLA ER-TPD 293 细胞的制备

复苏的 293 细胞培养在加有 5% FBS 的 DMEM 培养基,在 37°C、5%CO₂ 培养箱中培养,每 2-3 天换

一次液, 并保持细胞密度在 80%, 待细胞状态恢复, 用实施例 9 制备的慢病毒对恢复的细胞进行转染。具体步骤如下: 将 293T 细胞稀释至浓度为 0.5×10^6 个细胞/ml, 铺在 24 孔板中, 取实施例 9 制备的慢病毒浓缩液, 按照 MOI=1 的值将病毒液加入细胞, 并加入 Polybrene 5 μ g/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, 分别获得表达 CNK、

5 HLA-TPD 或 CNK-HLA-TPD 的 293T 细胞, 然后进行流式检测细胞表型。

图 9 示出了靶向 HLA-abc 的 ER-TPD 嵌合核酸构建体联合 CNK 表达载体转染 293 细胞的细胞表型 48h 流式结果。将培养的 293T 细胞分别转染病毒: (1) CNK 慢病毒 (DAPI10-CD3 ζ -T2A-NKG2D); (2) HLA-TPD 慢病毒 (E3/19K-E3L); 和 (3) CNK-HLA-TPD 慢病毒 (DAPI10-CD3 ζ -T2A-NKG2D-p2A-E3/19K-E3L); 没有转病毒的细胞作为对照。病毒转染 48h 后, 取 5×10^5 个未转染和转染病毒载体的 293T 细胞, 经过抗体 HLA-abc-FITC、NKG2D-PE-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 293 细胞表达 HLA-abc, 不表达 NKG2D; (1) CNK 慢病毒转染的 293T 细胞同时表达 HLA-abc 和 NKG2D; (2) HLA-TPD 慢病毒转染的 293T 细胞不表达 HLA-abc 和 NKG2D; (3) CNK-HLA-TPD 慢病毒转染的 293T 细胞不表达 HLA-abc, 但表达 NKG2D。

15

实施例 11: 靶向 CD123 的 ER-TPD 嵌合核酸构建体的设计

本实施例设计了靶向 CD123 的 ER-TPD 嵌合核酸构建体。

在一些实施方式中, 如图 10 所示, 采用单一慢病毒表达载体和 EF1 α 启动子, 设计了表达 anti-CD123 scFv-E3L 的靶向 CD123 的 ER-TPD 嵌合核酸构建体。

20

实施例 12: 靶向 CD123 的 ER-TPD 嵌合蛋白构建体的表达质粒的制备

全基因合成实施例 11 设计的靶向 CD123 的 ER-TPD 嵌合蛋白构建体的编码核苷酸序列 (anti-CD123 scFv-E3L 核苷酸序列如 SEQ ID NO. 170 所示, 其编码蛋白如 SEQ ID NO. 171 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 (购自优宝生物), 构建 CD123-ER-TPD 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 CD123 ER-TPD 慢病毒质粒。

25

实施例 13: 靶向 CD123 的 ER-TPD 嵌合蛋白构建体的病毒制备

将实施例 12 获得的 CD123 ER-TPD 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°C, 3000rpm 离心 10~15 分钟后经 0.45 μ m 滤膜过滤, 最后于 4°C, 25000rpm 超离心 2~3 小时, 浓缩病毒, 收集 CD123-ER-TPD 慢病毒浓缩液, 将收集的慢病毒浓缩液转入 -80°C 保存。

35

实施例 14: 靶向 CD123 的 ER-TPD THP1 细胞的制备

复苏的 THP1 细胞培养在加有 5% FBS 的 RPMI1640 培养基, 在 37°C、5%CO₂ 培养箱中培养, 每 2-3 天换一次液, 并保持细胞密度在 1×10^6 个单个细胞/ml, 待细胞状态恢复, 用实施例 4 制备的装载有 CD123-ER-TPD 慢病毒质粒的慢病毒对恢复的细胞进行转染。具体步骤如下: 将 THP1 细胞稀释至浓度为 0.5×10^6 个单个细胞/ml, 铺在 24 孔板中, 取实施例 13 制备的慢病毒浓缩液, 按照 MOI=0.5 或 1 的值将病毒液加入细胞, 并加入 Polybrene 5 μ g/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 CD123 ER-TPD THP1 细胞, 然后进行流式检测细胞表型。

40

45

图 11 是为实施例 13 中其中靶向 CD123 scFv TPD 慢病毒转染急性髓系白血病细胞系 THP1 细胞 48h 表型流式结果。将采用 RPMI 培养基培养的 THP1 细胞分别转染病毒 (1) anti-CD123 ERD-E3L MOI=0.5; (2) anti-CD123 ERD-E3L MOI=1; 没有转病毒的细胞做对照。病毒转染 48h 后, 取 5×10^5 个未转染和转染病毒载体的 THP1 细胞, 经过抗体 CD14-FITC、CD33-APC-Cy7、CD123-PE-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 THP1 细胞高表达 CD14、CD33 和 CD123; (1) 转染 anti-CD123 ERD-E3L MOI=0.5 的 THP1 细胞, CD14、CD33 的表达量不变, CD123 的表达出现明显下降; (2) 转染 anti-CD123 ERD-E3L MOI=1 的 THP1 细胞, CD14、CD33 的表达量不变, CD123 的表达显著下降。

50

55

实施例 15: 靶向 CD123 的 ER-TPD-CD123 CAR-T 细胞的应用

CD123 是急性髓系白血病 AML 非常重要的靶标, 可以制备靶向 CD123 CAR-T 细胞 (图 12A1), 但 CD123 也表达在激活的 T 细胞上 (图 12B1), 所以靶向 CD123 CAR-T 细胞在激活培养和杀伤肿瘤细胞过程中都会产生自杀伤效应 (图 12C1), 导致细胞增殖困难, 临床治疗效果不佳。

- 通过本公开的 ER-TPD 技术可以设计 CD123 CAR-T-T2A-CD123 ER-TPD 嵌合蛋白构建体 (图 12A2),
- 5 高效的降解自身表达的 CD123 (图 12B2), 从而保证细胞良好的增殖, 同时实现对肿瘤细胞更精确的杀伤效应 (图 12C2)。针对靶向 T 细胞自身抗原的 CAR-T, 联合 ER-TPD 技术, 实现对自身抗原的定向降解, 靶向同一抗原的 CAR 和 ER-TPD 能构建在同一载体上, 实现一次性改造 T 细胞, 同时完成对自身抗原的降解和 CAR 的靶向功能, 由于转染后的细胞通过 ER-TPD 嵌合蛋白构建体定向降解其抗原, 而未转染细胞表达该抗原, 所以转染后的 CAR-T 细胞实现对未转染细胞的特异性清除, 在培养过程中能天然地提高细胞的
- 10 纯度, 避免了后续的纯化筛选工作, 大大提高规模化生产的效率。此外, ER-TPD 技术相比常规 Crispr/cas9 技术, 成本低, 效率高, 可实现规模化制备, 没有基因编辑导致染色体的不稳定或脱靶效应的副作用, 因此, CAR/ER-TPD-T 细胞的功能和活力都更有优势。这种联合 CAR/ER-TPD 技术可以很好的解决临床上的难点, 将 CAR-T 技术应用于靶向特定表达在 T 细胞上的靶标 (如 CD4、CD5、CD7、CD38、CD123), 避免自杀伤效应, 如针对 T 淋巴细胞白血病 (如急性 T 淋巴细胞白血病 (T-ALL) 或慢性 T 淋巴
- 15 细胞白血病 (T-CLL)、T 幼淋巴细胞白血病 (T-PLL)、大颗粒淋巴细胞白血病 (LGLL)、髓性白血病 (如急性髓系白血病 (AML)、慢性髓性白血病 (CML)))、HIV 感染, 用于清除病毒感染的 CD4 T 细胞。

实施例 16: 靶向 Tau/A β 的 ER-TPD mRNA 在神经退行性疾病阿尔兹海默症的应用

- Tau、 β -淀粉样蛋白 (amyloid- β , A β) 在细胞内堆积是阿尔兹海默症 (AD) 和相关 tau 病的标志性病理
- 20 特征, 因此靶向 Tau 可以促进药物开发。高度磷酸化 Tau (p-tau) 的细胞内累积和 β -淀粉样蛋白 (A β) 的细胞外沉淀是阿尔兹海默症 (AD) 脑部的标志性病理特征。在过往几十年中, AD 药物开发主要着眼于 A β 。因此, 已经开发并测试了多种靶向 A β 的疗法, 例如通过 β - γ -分泌酶抑制剂减少 A β 的产生、通过促进 A β 的降解或抗体以除去 A β 。但不幸的是, 迄今为止这些靶向 A β 的策略的临床效果都令人失望。因此
- 25 靶向 Tau 是治疗 AD 的重要策略。目前基于 PROTAC 技术开发了脑细胞内定向降解 Tau 的药物, 但因为该分子往往无法有效进入细胞内, 导致临床效果尚不明确。然而, 可以利用本公开的 ER-TPD 技术, 开发设计编码靶向 Tau 和 β -淀粉样蛋白 (A β) 的 ER-TPD 嵌合蛋白构建体的 mRNA or eRNA (endless cyclic RNA), 利用靶向神经元细胞的脂质体 (LNP) 或纳米颗粒 (NP), 递送到神经元细胞内, 稳定表达靶向 Tau 和/或 β -淀粉样蛋白的 ER-TPD 嵌合蛋白构建体, 实现对 Tau 和 β -淀粉样蛋白的高效降解, 从而有效保护神经元细胞的
- 30 退行性变, 控制阿尔兹海默症的进展。

实施例 17: 靶向 HBx 的 ER-TPD DNA 在 HBV 慢性肝炎治疗中的应用

- 肝细胞癌 (HCC) 是现代世界中因癌症致死的主要原因之一, 并且多数病例与慢性乙型肝炎病毒 (HBV) 感染相关。已知 HBV 编码 X 蛋白 (HBx) 在病毒性 HCC 的发病机制中起到关键作用。HBx 是一种
- 35 多功能蛋白, 可调节涉及细胞存活、细胞周期进程、DNA 修复、侵袭、蛋白质降解的多种细胞和病毒基因的表达, 并调控多种信号通路 (如 Ras/Raf/MAPK、PI3K/Akt、NF- κ B 和 JNK)。可以利用本公开的 ER-TPD 技术, 设计表达靶向 HBx ER-TPD 嵌合蛋白构建体的转座子 DNA, 利用靶向肝细胞的脂质体或纳米颗粒, 递送到肝细胞内, 并实现整合, 长期表达 HBx ER-TPD 嵌合蛋白构建体, 实现对 HBV 致癌功能蛋白 HBx 的长期降解, 有效阻碍 HBV 的扩增, 并消除因 HBx 而导致细胞病变和进展癌变的过程。

实施例 18: 靶向 HBV 的 DNA Polymerase ER-TPD DNA 在 HBV 慢性肝炎治疗中的应用

- HBV DNA 聚合酶: 乙型肝炎病毒 (HBV) 聚合酶是一种多功能酶, 具有 RNA 依赖性和 DNA 依赖性聚合酶功能, 以及核糖核酸酶 H 功能。它作用于 HBV 前基因组 RNA (pgRNA) 以将其逆转录以在新衣壳内形成新的 rcDNA 分子。乙型肝炎病毒 DNA 聚合酶是 HBV 病毒衣壳的关键成分。基于 ER-TPD 技术, 可以设计表达靶向 HBV DNA Polymerase ER-TPD 嵌合蛋白构建体的转座子 DNA, 利用靶向肝细胞的脂质体
- 45 或纳米颗粒, 递送到肝细胞内, 并实现整合, 长期表达 HBV DNA Polymerase ER-TPD 嵌合蛋白构建体, 实现对 HBV DNA Polymerase 高效降解, 从而直接抑制 HBV 感染整合基因组后 DNA 的复制, 阻断 HBV 构建和包装, 从而使得 HBV 基因的完全沉默。

实施例 19: 靶向 HIV RNA 逆转录酶的 ER-TPD DNA 在 HIV 感染治疗中的应用

- HIV 是一种单链 RNA 病毒, 为了感染宿主细胞, 必须将单链 RNA 基因组通过逆转录酶逆转录为双链 DNA 副本, 并把该副本整合到宿主染色体中。因此, 靶向 HIV RNA 逆转录酶可以有效的控制活性 HIV 的
- 50 包装和整合。基于本公开的 ER-TPD 技术, 设计表达靶向 HIV-1 逆转录酶 ER-TPD 嵌合蛋白构建体的转座子 DNA, 利用靶向 CD4+ 细胞的脂质体或纳米颗粒, 递送到 CD4+ 细胞内, 并实现整合, 长期表达 HIV-1 逆转录酶 ER-TPD 嵌合蛋白构建体, 实现对 HIV-1 逆转录酶的定向降解, 从而直接抑制 HIV 感染整合基因组后病毒的组装, 从而直接实现 HIV 基因的沉默。
- 55

实施例 20: 靶向 Bcl-2 的 ER-TPD DNA 在肿瘤治疗中的应用

细胞凋亡在肿瘤的发生、发展以及在其产生耐药中发挥着重要作用。Bcl-2 家族的表达和调控对肿瘤细胞凋亡具有较大的影响,并能协同原癌基因 ras 的作用,使细胞发生恶性转化,从而促进肿瘤增长。许多人类肿瘤如胃肠道肿瘤、淋巴瘤、成神经细胞瘤及膀胱癌等都存在着 Bcl-2 和(或) Bcl-xL 的过度表达。

- 5 高表达的 Bcl-2 可抑制细胞凋亡,使细胞生长加速,进而导致恶性肿瘤的发生。

Bcl-2 蛋白过表达在非实体瘤中也较为常见。Bcl-2 在慢性淋巴细胞白血病 (CLL)、滤泡型淋巴瘤 (FL)、套细胞淋巴瘤 (MCL) 和华氏巨球蛋白血症 (WM) 中均呈高表达。因此,抗凋亡蛋白 Bcl-2 已成为肿瘤治疗领域新兴的药物靶标。Bcl-2 抗凋亡成员包括 Bcl-2、Bcl-xL、Bcl-W 和 Mcl-1 等,具有保守和高度同源的 BH1 和 BH2 基序,因此,可以针对 BH1 和 BH2 基序开发纳米抗体,筛选对 Bcl-2 抗凋亡家族成员广泛结合的抗体序列,并基于 ER-TPD 技术,设计表达靶向 Bcl-2 抗凋亡的家族成员(如: Bcl-2、Bcl-xL 和 Bcl-w)的 ER-TPD 嵌合核酸构建体。将该嵌合核酸构建体装载在溶瘤病毒上,获得装载有靶向 Bcl-2 的 ER-TPD 嵌合核酸构建体的溶瘤病毒。将该溶瘤病毒特异性感染肿瘤细胞,并利用溶瘤病毒上的强启动子,如 CMV 启动表达靶向 Bcl-2 抗凋亡蛋白的 ER-TPD 嵌合蛋白构建体,实现对 Bcl-2 家族抗凋亡蛋白的高效定向降解,解除肿瘤抗凋亡机制,直接导致肿瘤细胞凋亡,并促进溶瘤病毒更快的裂解细胞和扩散,

- 15 实现杀伤和清除肿瘤细胞。

同样的原理,与溶瘤病毒配合可以直接靶向促癌基因蛋白的 ER-TPD,如靶向突变 Kras 蛋白 ER-TPD,实现对促癌基因蛋白的降解。

实施例 21: 靶向自体抗体的 ER-TPD 嵌合蛋白构建体在自身免疫性疾病治疗中的应用

20 I 型糖尿病的 beta 细胞自身免疫的标志物包括 4 种自体抗体(autoantibody),包括胰岛细胞抗体 (ICA)、谷氨酸脱羧酶抗体(GAD-65)、胰岛素抗体 (IAA) 和络氨酸磷酸酶抗体 (IA-2A),是疾病发生的诊断标志物,同时也直接导致病情的进展。胰岛素抗体通常是儿童 I 型糖尿病最早的危险标志物,70% 的儿童患者在诊断时候有胰岛素抗体;85% 的患者有针对 GAD65 的抗体。在临床上很难真正的干预和消除这些自体抗体。基于 ER-TPD 技术,可以设计靶向胰岛素自体抗体 (IAA) 的 ER-TPD 转座子 DNA,利用靶向浆细胞的脂质体或纳米颗粒,递送到浆细胞内,并实现整合,长期表达 IAA ER-TPD 嵌合蛋白构建体,实现对胰岛素抗体的长期降解,提高外周血中胰岛素的使用率,从而有效阻碍糖尿病的过程。如图 13A 所示,在 I 型糖尿病患者浆细胞表达释放胰岛素抗体,该抗体结合胰岛素,并清除外周血中的胰岛素,导致患者胰岛素使用率严重下降;图 13B,通过靶向胰岛素自体抗体的 ER-TPD 转座子 DNA,利用靶向浆细胞的脂质体,递送到浆细胞内,并实现整合,长期表达 IAA ER-TPD 嵌合蛋白构建体,在内质网内定向结合和降解胰岛细胞抗体,从而保证在外周血中胰岛素的正常功能。

- 30

实施例 22: UT 元件及其衍生物

图 14 中说明了含有 TCR $\alpha\beta$ 或 HLA 分子结合分子、病毒 ER 驻留蛋白的一个或多个跨膜和胞质结构域的示例性嵌合融合蛋白。例如,在图 14A 中,嵌合融合蛋白包括 anti-TCR $\alpha\beta$ HLA 抗体片段 scFv、Hinge/linker (例如 SEQ ID NO.172 IgG4 铰链;和 SEQ ID NO.173(Gly4Ser)₂),并与 ER 驻留糖蛋白的任何跨膜结构域和细胞质结构域融合,例如 HCMV US2 (SEQ ID NO.174 和 NO.175)。例如,在图 14B 中,嵌合融合蛋白包括 anti-TCR $\alpha\beta$ 或 HLA 抗体片段 scFv、Hinge/linker (例如 SEQ NO.5.IgG4 铰链;和 SEQ ID NO.173(Gly4Ser)₂),并与 ER 驻留糖蛋白的两个或多个跨膜结构域和细胞质结构域融合,例如 HCMV US2 (SEQ ID NO.174 和 NO.175) 和 HCMV US3 (SEQ ID NO.175 和 NO.176)。例如,在图 14C 中,嵌合融合蛋白包括 anti-TCR $\alpha\beta$ 或 HLA 抗体片段 scFv、Hinge/linker (例如 SEQ NO.5.IgG4 铰链;和 SEQ ID NO.173(Gly4Ser)₂),并与来自各种 ER 驻留糖蛋白的跨膜结构域和细胞质结构域的重组基序融合,例如 HCMV US2 (SEQ ID NO.174 和 NO.175) 和 HCMV US11 (SEQ ID NO.174、NO.175、NO.177、NO.178)。

- 40

该 UT 元件编码核/酸分子被克隆到慢病毒载体中,然后转导到 Jurkat 细胞或人类 T 细胞。

- 45

实施例 23: 转导的 UT 元件有效地阻止了 Jurkat 细胞中 TCR $\alpha\beta$ 的表达

设计了一个编码 UT 元件的示例性慢病毒构建体,该构建体包括与 HCMV US2 或 HCMV US11 或/和腺病毒 E19 的跨膜和细胞质结构域融合的 anti-TCR $\alpha\beta$, T2A 自裂肽,截短的 EGFR (命名为 anti-TCR-US2 TM/CT-T2A-EGFRt; anti-TCR-1US1 TM/CT-T2A-EGFRt; anti-TCR-E19 TM/CT-T2A-EGFRt; anti-TCR-US2-TM/CT-T2A-anti-TCR-E19 TM/CT-T2A-EGFRt)。合成 DNA 并克隆到慢病毒载体(如 pLenti CMV GFP-puro),使用包装载体(如 psPAX 和 pMD2G)在 293T 细胞中生产慢病毒。Jurkat 细胞在 RPMI、10% 人血清、2mM L-谷氨酰胺和 1%青霉素-链霉素 (CTL 培养基) 中培养,然后用慢病毒上清液(如图所示) (MOI=3) 转导,辅以 0.8 μ g/mL 多烯 (Millipore, Bedford, Mass.) 扩增 3 天后,将细胞提交给流式细胞仪检查截短的 EGFR 和 TCR $\alpha\beta$ 在 Jurkat 细胞中的表达 (图 15)。以下是用于流式细胞仪表型和分析的共轭抗体: CD4-APC, CD8-太平洋蓝, TCR-ab-APC-Cy7, EGFR-PE (Biolegend)。用碘化丙啶 (PI, BD Biosciences) 染色,按照制造商的指示进行活/死细胞区分。流动分析在 FACS Canto II 上进行,分类纯化

- 55

在 FACS Ariall (Becton Dickinson, Franklin Lakes, N.J.) 上进行, 并使用 FlowJo 软件 (Treestar, Ashland, Oreg.) 分析数据。结果表明, 转导的细胞表达截短的 EGFR, CD8+ 和 CD4+ T 细胞上的 TCR $\alpha\beta$ 明显下调, 而非转导的 Jurkat 细胞在没有截短的 EGFR 的时候表达高水平的 TCR $\alpha\beta$ 。

5 实施例 24: 强制表达 UT 元件可以有效地抑制人类 T 细胞中 TCR 的表达

在图 16A 中, 编码 UT 元件的示例性慢病毒构建体, 包括融合到 HCMV US2 的跨膜和胞质结构的 anti-TCR $\alpha\beta$ 。设计了由 anti-TCR-US2 TM/CT-T2A-EGFRt 组成的 UT 元件, 并将其克隆到慢病毒载体 (如 pLenti CMV GFP-puro) 中, 使用包装载体 (如 psPAX 和 pMD2G), 在 293T 细胞中生产慢病毒。使用 CD3+T 细胞分离试剂盒 (Miltenyi Biotec) 从正常供体的 PBMC 中分离出人类 CD8+ 和 CD4+, 根据制造商的说明用抗 CD3/CD28 珠 (Life Technologies) 激活, 并用慢病毒上清液 (如各实施例中所示) (MOI=3) 进行转导, 辅以 0.8 μ g/mL 聚苯 (Millipore, Bedford, Mass.), 在 32°C 下以 2100rpm 离心 45 分钟激活后的第 3 天, 在 RPMI、10% 人血清、2mM L-谷氨酰胺和 1% 青霉素-链霉素 (CTL 培养基) 中扩增 T 细胞, 每 48 小时补充重组人 (rh) IL-2 至最终浓度为 50U/mL。扩增 12 天后, 用 CD8-太平洋蓝、CD4-APC、TCR-ab-APC-Cy7、EGFR-PE (Biolegend) 对每个转导的 T 细胞系进行等分染色, 然后提交流式细胞仪分析。

15 结果表明, 与非转导的 T 细胞相比, 转导的 T 细胞 (EGFR+) 在 CD8+ 和 CD4+ 细胞表面都能明显下调 TCR $\alpha\beta$ 表达。总之, 含有 anti-TCR-US2 TM/CT 的 US 元件可以有效地抑制人类 T 细胞中 TCR $\alpha\beta$ 的表达, 这可能会抑制输注到不同受体后体内 TCR 介导的 GVHD。

在图 16B 中, 设计了编码由融合到腺病毒 E19 的跨膜和胞质结构域的 anti-TCR $\alpha\beta$ 、T2A 自裂肽和截短的 EGFRt 组成的 UT 元件的示例性慢病毒构建体 (命名为 anti-TCR-E19 TM/CT-T2A-EGFRt 被克隆到慢病毒载体 (例如 pLenti CMV GFP-puro) 中, 并在 293T 细胞中生产慢病毒。用两种剂量的慢病毒上清液 (1x, 2x) 转导人类 CD8+ 和 CD4+, 并在 CTL 培养基中扩增, 辅以重组人 (rh) IL-2。扩增 12 天后, 用 CD8-太平洋蓝、CD4-APC、TCR-ab-APC-Cy7、EGFR-PE (Biolegend) 对每个转导的 T 细胞系进行等分染色, 然后提交流式细胞仪分析。

25 结果表明, 与未转导 T 细胞相比, UT (E19) 转导的 T 细胞 (EGFR+) 也可以有效地阻断 TCR $\alpha\beta$ 在 CD8+ 和 CD4+ 细胞表面的表达。增加转导的病毒剂量, 对 TCR $\alpha\beta$ 表达的抑制可以随着转导效率和细胞中 UT 元件拷贝数的增加而明显改善。总之, 含有 anti-TCR-E19 TM/CT 的 US 元件可以有效地抑制人类 T 细胞中 TCR $\alpha\beta$ 的表达, 这也可能抑制输注到不同受体后体内 TCR 介导的 GVHD。

实施例 25: 表达 UT 元件的 CNK-T 细胞的表型

30 在图 17 中, 设计了编码 CNK 序列、T2A 序列和由 anti-TCR $\alpha\beta$ 融合到腺病毒 E19 的 TM 和 CT 结构域组成的 UT 元件的示例性慢病毒构建体 (命名为 CNK-UT-E19), 将其克隆到慢病毒载体 (如 pLenti CMV GFP-puro) 中, 并在 293T 细胞中产生慢病毒。用两个剂量的慢病毒上清液转导人类 CD8+ 和 CD4+, 并在 CTL 培养基中扩增, 辅以 IL-2。扩增 12 天后, 用 CD8-太平洋蓝、CD4-APC、TCR-ab-APC-Cy7、NKG2D-PE-Cy7 (Biolegend) 对每个转导的 T 细胞系进行等分染色, 然后提交流式细胞仪分析。结果表明, 在 CNK-T 细胞中加入 UT 元件可以明显抑制 CNK-T 细胞中 TCR $\alpha\beta$ 的表达, 而不干扰 NKG2D 在 CD8+ 和 CD4+ T 细胞中的表达。

实施例 26: 表达 UT 元件的 CNK-T 细胞的细胞毒性

在与 HCC 细胞系 HepG2 细胞的共培养试验中, 分别对表达 CNK 或 CNK-UT 的 CD3+ 批量 T 细胞的体外效应器功能与非转导 T 细胞进行了比较。简而言之, 在共培养前 24 小时, 将 0.5×10^6 个 HepG2 细胞播种在 24 孔板上。将 HepG2 细胞与 1×10^5 效应细胞 (E:T=1:5) 一起加入, 并在分析前的 37 度下再培养 24 小时。共培养后, 收获细胞, 用 CD8-太平洋蓝、CD4-APC、CD45-PerCP-Cy5.5、CD25-APC-Cy7 和 CD137-PE-Cy7 (Biolegend) 染色, 然后进行流式细胞仪分析。结果表明 (图 18), 与非转化的 T 细胞相比, CNK-T 和 CNK-UT (E19) 在共培养试验中都能有效地消除 HepG2。此外, CNK-UT 细胞与普通的 CNK-T 一样, 明显上调了 T 细胞激活标志物 CD25 和 CD137。总之, 加入 UT 元件不会干扰 T 细胞的功能, 如对肿瘤细胞的细胞毒性。

实施例 27: CNK-UT 多功能复合体的设计

50 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。

3.1 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 19A 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;

在一些优选的实施方案中, 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

(3) UT 组件, 其至少包含 (i) 靶向降解 TCR 的重组蛋白分子或其功能变体, 所述靶向降解 TCR 的重组蛋白分子包含: (a) 靶向 TCR 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。

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. 113 所示的氨基酸序列。

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。

3.2 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 19B 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 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,也借助 UT 元件有效抑制和降解 TCR 和 MHC I 的表达。

3.3 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 19C 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、DAPI10 跨膜结构域、DAPI12 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;

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、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 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。

3.4 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 19D 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、UT 组件和/或靶向杀伤肿瘤细胞受体组件之间通过铰链或接头连接。

所述 (4) 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 R1a、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 28：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。

4.1 CNK-UT 元件设计结构 1

在一些实施方式中，如图 20A 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。

4.2 CNK-UT 元件设计结构 2

在一些实施方式中，如图 20B 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。

4.3 CNK-UT 元件设计结构 3

在一些实施方式中，如图 20C 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，实现在单个载体上表达多个功能元件。

4.4 CNK-UT 元件设计结构 4

在一些实施方式中，如图 20D 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，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 29：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 的编码核苷酸序列（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），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 PureLink™ 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 30：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 1.64pmol：1.3pmol：0.72pmol 的比例用聚乙二醇转染试剂（408727，Sigma）按 DNA:μg 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 PureLink™ 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℃，3000rpm 离心 10~15 分钟后经 0.45μm 滤膜过滤，最后于 4℃，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℃ 保存。

实施例 31：CNK-UT 细胞的制备

取健康供者的新鲜外周血，1:1 加入 PBS+EDTA，通过 Ficoll 密度梯度离心分离新鲜的外周血单核细胞；再利用 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 1×10⁶ 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℃、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℃ 培养，感染后 48 小时后获得表达 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 32：CNK-UT 细胞的表型检测

图 21 是一种 CNK-UT（DAP10-CD3ζ-T2A-NKG2D-p2A-anti-TCR scFv-AdE3）（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）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 5×10⁵ 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 33：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）。

33.1 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 22 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 0.5×10⁶ 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 0.5×10⁶ 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，HT-29 细胞 59.0%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 22A），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 22B）。

33.2 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 23 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（DAPI10-CD3 ζ -T2A-NKG2D-p2A-ant-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。实验数据说明，MDA-MB453 细胞 83.7%上调 MICA 的表达，33.6%的细胞上调 MICB 的表达，31.2%的细胞上调 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 23A）；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 23B）。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。

实施例 34：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，合成 anti-GPC3 41BB-CD3 ζ 基因克隆到慢病毒载体 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，其具体制备方法同 CNK-UT 细胞。

CNK-UT 组：给予 GPC3 CAR/CNK-U 细胞

制备 GPC3 CAR/CNK-UT 细胞，合成 anti-GPC3 41BB-Z-T2A-DAPI10-CD3 ζ -T2A-NKG2D-p2A-ant-TCR scFv-AdE3 基因克隆到慢病毒载体 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，其具体制备方法同 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 3×10^6 /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，分别给予普通人原代 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 2×10^6 /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 24 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 2×10^6 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 25 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 25 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。

- 5 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，其活性明显优于 GPC3 CAR-T，清除肿瘤后，其抗肿瘤效果可至少维持 56 天。
- 10 此外，还研究了不同细胞回输后小鼠体重变化。其中，回输 CNK-UT 细胞的 CNK-UT 组实验动物体重与 D0 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。
- 15 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。

权 利 要 求 书

1. 一种嵌合蛋白构建体，其包含内质网相关降解（ER-associated degradation, ERAD）机制蛋白结合结构域和靶向结构域。

2. 如权利要求1所述的嵌合蛋白构建体，其中所述ERAD机制蛋白结合结构域包含病毒内质网驻留蛋白的跨膜结构域或其功能变体和内质网驻留结构域或其功能变体。

3. 如权利要求1或2所述的嵌合蛋白构建体，其中所述病毒内质网驻留蛋白为腺病毒E3-19K。

4. 如权利要求1或2所述的嵌合蛋白构建体，其中所述病毒内质网驻留蛋白不是腺病毒E3-19K。

5. 如权利要求4所述的嵌合蛋白构建体，其中所述病毒内质网驻留蛋白选自以下的至少一种：HCMV糖蛋白US2、US11、US3、US10、US6、HSV ICP47、CPXV12、BHV UL49.5、EBV BNFL2a、HCMV UL16、UL141、UL142、HIV Nef、HIV Vpu、HHV-7 U21、HHV-8 KK3、HHV-8 KK5、MHV-68 MK3、HTLV-1 p12、Cowpox Virus 蛋白 CPXV203。

6. 如前述权利要求中任一项所述的嵌合蛋白构建体，其进一步包含蛋白降解通路成员（例如E3泛素连接酶、蛋白酶体、溶酶体）结合结构域，可选地，所述蛋白降解通路成员结合结构域与所述ERAD机制蛋白结合结构域连接。

7. 如前述权利要求中任一项所述的嵌合蛋白构建体，其中所述靶向结构域包含特异性靶向靶蛋白的抗体或其功能片段（例如，Fd、Fv、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv(scFv)、单链抗体（scFv）、纳米抗体（nanobody）、双链抗体、三链抗体和四链抗体）。

8. 如权利要求7所述的嵌合蛋白构建体，其中所述靶蛋白为致病蛋白，可选地，所述致病蛋白是肿瘤相关的蛋白、病毒相关的蛋白、免疫功能相关蛋白（包括免疫抑制性蛋白和免疫激活性蛋白）、自身抗原蛋白、或神经退行性疾病相关的蛋白。

9. 如权利要求8所述的嵌合蛋白构建体，其中所述自身抗原蛋白选自下组：与I型糖尿病相关的自身抗原例如，胰岛细胞抗原（ICA）、胰岛素（IAA）、谷氨酸脱羧酶65（GAD65）、胰岛瘤抗原-2（IA-2）；与类风湿性关节炎（RA）相关的自身抗原（autoantigen）例如，瓜氨酸化蛋白/肽抗体，异核糖核蛋白（heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1）、aldolase、alpha-enolase、calreticulin、热激活蛋白（HSP60）、BiP、PGK1、压力诱导磷酸蛋白（stress-induced phosphoprotein 1）、FUSE-BP1/2；与系统性红斑狼疮（SLE）相关的自身抗原例如，脱氧核糖核蛋白、SmD1和SmD3、Clq、冷球蛋白（LA）、心磷脂（CL）、β2糖蛋白I（β2 GP I）、凝血酶原（PT）和磷脂酰丝氨酸（PS）；与系统性硬化症（Systemic Sclerosis, SSc）/硬皮病（scleroderma, SD）相关自身抗原例如，Scl-70、SSA、Ro52；与自身免疫性肝病相关的抗原例如，线粒体抗原、Spl00、PML、gp210、p62；与重症肌无力相关的自身抗原例如，乙酰胆碱受体；与中枢神经系统自身免疫疾病（边缘性脑炎、脑脊髓炎、小脑性共济失调）相关的自身抗原例如，电压门控性钾离子通道（VGKC）复合物、电压门控性钙离子通道受体、α-氨基-3-羟基-5-甲基异噻唑-4-丙酸（AMPA）受体、γ-氨基丁酸-B（GABAB）受体、甘氨酸受体；与多发性硬化相关的自身抗原例如，髓磷脂碱性蛋白（MBP）、髓磷脂少突胶质细胞糖蛋白（MOG）；与多发性肌炎（PM）和皮肌炎（DM）相关的自身抗原例如，Jo-1、Mi-2、PM-Scl、Ro-52；与麸质敏感性肠病相关的自身抗原例如，肌内膜抗体（EMA）、组织谷氨酰胺转移酶（tTG）；与抗NMDAR抗体脑炎相关的自身抗原例如，N-甲基-D-天冬氨酸受体；与视神经脊髓炎（NMO）相关的自身抗原例如，水通道蛋白4（AQP4）；与生殖相关相关的自身抗原例如，卵巢抗原，精子抗原。

10. 如权利要求9所述的嵌合蛋白构建体，其中所述肿瘤相关的蛋白由选自以下组成的组的致癌基因编码：BCL-2、c-MYC、Ras、HER2、BCR/ABL、ABL1/BCR、TGFB1、TLX1、P53、WNT1、WNT2、WT1、αv-β3、PKCa、ABL、BCL1、CD24、CDK4、EGFR/ERBB-1、HSTF1、INT1/WNT1、INT2、MDM2、MET、MYB、MYC、MYCN、MYCL1、RAFI、NRAS、REL、AKT2、APC、BCL2-ALPHA、BCL2-BETA、BCL3、BCR、BRCA1、BRCA2、CBL、CCND1、CDKN1A、CDKN1C、CDKN2A、CDKN2B、CRK、CRK-II、CSF1R/FMS、DBL、DDOST、PMS-2、PRAD-1、RAF、RHOM-1、RHOM-2、SIS、TAL2、TANI、TIAM1、TSC2、TRK、TSC1、STK11、PTCH、MEN1、MEN2、P57/KIP2、PTEN、HPC1、ATM、XPA/XPG、BCL6、DEK、AKAP13、CDH1、BLM、EWSR1/FLI1、FES、FGF3、FER、FGR、FLI1/ERGB2、FOS、FPS/FES、FRA1、FRA2、FYN、HCK、HEK、HER3/ERBB-2、ERBB-3、HER4/ERBB-4、HST2、INK4A、INK4B、JUN、JUNB、JUND、KIP2、KIT、KRAS2A、KRAS2B、LCK、LYN、MAS、MAX、MCC、MLH1、MOS、MSH2、MYBA、MYBB、NF1、NF2、P53、PDGFB、PIM1、PTC、RBI、RET、ROS1、SKI、SRC1、TALI、TGFB2、THRA1、THRB、TIAM1、TRK、VAV、VHL、WAF1、WNT2、WT1、YES1、ALK/NPM1、AMH1、AXL、FMS、GIP、GLI、GSP、HOX11、HST、IL3、INT2、KS3、K-SAM、LBC、DCC、DPC4/SMAD4、E-CAD、E2F1/RBAP、ELK1、ELK3、EPH、EPA1、E2F1、EPA3、ERG、ETS1、ETS2、LMO-1、LMO-2、L-MYC、LYL1、LYT-10、MDM-2、MLH1、MLL、MLM、N-MYC、OST、PAX-5、PMS-1、FGF4、FGF6、FANCA、FLI1/ERGB2、FOSL1、FOSL2、GLI、HRAS1、HRX/MLLT1、HRX/MLLT2、KRAS2、MADH4、MASI、MCF2、MLLT1/MLL、MLLT2/HRX、MTG8/RUNX1、MYCLK1、MYH11/CBFB、NFKB2、NOTCH1、NPM1/ALK、NRG/REL、NTRK1、PBX1/TCF3、PML/RARA、PRCA1、RUNX1、RUNX1/CBFA2T1、SET、

SHP2、TCF3/PBX1、TNF α 、Clusterin、Survivin、TOE β 、c-fos、c-SRC、雌激素受体基因(estrogen receptor ER- α)、雄激素受体基因(Androgen receptor, AR)和 INT-1, 可选地, 所述肿瘤相关的蛋白选自下组: Bcl-2 家族成员(如: Bcl-2、Bcl-xL 和 Bcl-w)、VEGF/VEGFR、PDGFR β 、EGFR、EGFR 突变体、IGF-1R、HDACs、HER2、MYC、KRAS、AFP、CEA、CA199、雌激素受体(estrogen receptor ER- α)、雄激素受体(Androgen receptor, AR)、酪氨酸激酶(c-ABL、BCR-ABL、BTK、FAK、PTK6、Wee1、TRK 跨膜受体)、丝/苏氨酸激酶受体(IRAK4、LRRK2、B-Raf、RIPK2、CDK4/6、CDK7、CDK8、CDK8/19、CDK9、TBK1)、蛋白激酶 II (CK2)、表观遗传相关蛋白(BRD2、BRD3、BRD4、BRDT、TRIM24、BRD9、PBRM1、SMARCA2、SMARCA4、EP300、EZH2、WDR5)、肾上腺髓质素(ADM)、DPP3。

11. 如权利要求 8 所述的嵌合蛋白构建体, 其中所述致病蛋白是病毒相关蛋白, 其选自: HBV 表面抗原、HBV 衣壳糖蛋白、HBsAg、HBV DNA 聚合酶、HBV 编码 X 蛋白(HBx)、HIV Gag 蛋白、HIV Env 蛋白、HIV gp120、HIV-1 逆转录酶、HIV gp120、HCV NS3-4A 蛋白酶、HCV RNA 聚合酶、HCV 包膜(envelope)蛋白、EBV DNA 聚合酶、EBV EBNA1、冠状病毒 RNA 合成酶、冠状病毒刺突蛋白、冠状病毒包膜蛋白、冠状病毒膜蛋白、冠状病毒核壳蛋白、RNA 依赖性 RNA 聚合酶(RNA-dependent RNA polymerase, RdRp), 如新冠病毒 RNA 依赖性 RNA 聚合酶、疱疹病毒(Herpesviruses) DNA 和 RNA 聚合酶、疱疹病毒衣壳糖蛋白、CMV DNA 聚合酶、CMV 衣壳糖蛋白、RSV 表膜蛋白、RSV 衣壳蛋白、RSV RNA 聚合酶、流感病毒 RNA 聚合酶、流感病毒包膜(envelope)蛋白、HPV DNA 聚合酶、和 HPV 衣壳蛋白。

12. 如权利要求 7 所述的嵌合蛋白构建体, 其中所述靶蛋白为免疫功能相关蛋白, 其选自: 抗原呈递分子(例如 MHC I 类分子、MHC II 类分子、MICA/B 分子等)、抗原识别分子(例如 TCR、CD123、NKG2D 等)、免疫检查点分子(例如 PD-1、PD-L1、CTLA4、TIM3、TIGIT、LAG3、A2AR、BTLA、IDO1、IDO2、TDO、KIR、NOX2、VISTA、SIGLEC7、PVR 等)、免疫刺激/共刺激分子(例如 CD3、CD80/86、CD28 等)。

13. 如权利要求 7 所述的嵌合蛋白构建体, 其中所述靶蛋白为神经系统疾病相关的靶蛋白, 其选自: Tau、 β -淀粉样蛋白(amyloid- β (A β))、 α 突触核蛋白、亨廷顿蛋白突变体(mutant huntingtin, mHTT)、 α -synuclein、TAR RNA 结合蛋白(TARDBP) 和 FUS RNA 结合蛋白(FUS)。

14. 如权利要求 2、4 或 5 所述的嵌合蛋白构建体, 其中所述靶向结构域不是特异性结合 TCR。

15. 如权利要求 14 所述的嵌合蛋白构建体, 其中所述靶向结构域特异性结合 MHC I、MHC II、MICA、MICB、ULBP1、ULBP2、ULBP3、ULBP4、ULBP5 和/或 ULBP6; 优选地, MHC I 是 HLA I; 优选地, MHC II 是 HLA II。

16. 如权利要求 4 所述的嵌合蛋白构建体, 其中所述靶向结构域特异性结合 TCR。

17. 如权利要求 16 所述的嵌合蛋白构建体, 其中所述病毒内质网驻留蛋白选自以下的至少一种: HCMV 糖蛋白 US2、US11、US3、US10、US6、HSV ICP47、CPXV12、BHV UL49.5、EBV BNFL2a、HCMV UL16、UL141、UL142、HIV Nef、HIV Vpu、HHV-7 U21、HHV-8 KK3、HHV-8 KK5、MHV-68 MK3、HTLV-1 p12、Cowpox Virus 蛋白 CPXV203。

18. 如前述任意权利要求所述的嵌合蛋白构建体, 其和至少一个共表达部分连接。

19. 如权利要求 18 所述的嵌合蛋白构建体, 其中所述至少一个共表达部分独立地选自: 完整的病毒 ER 驻留糖蛋白(例如, HCMV US2、US3、US11、US10、腺病毒 E3-K19、HCMV US6、HSV ICP47)、嵌合抗原受体(CAR)、功能性 T 细胞受体(TCR)、趋化因子受体和 NK 细胞激活受体。

20. 如权利要求 19 所述的嵌合蛋白构建体, 其中所述趋化因子受体选自: CCR4、CCR5、CCR6、CCR7、CCR9、CCR2b、CXCR1、CXCR2 和 CXCR4。

21. 如权利要求 20 所述的嵌合蛋白构建体, 其中所述 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。

22. 如权利要求 21 所述的嵌合蛋白构建体, 其中所述 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。

23. 如权利要求 21 或 22 所述的嵌合蛋白构建体, 其中所述 NK 细胞激活受体与 CNK 信号转接组件复合。

24. 如权利要求 18-23 中任一项所述的嵌合蛋白构建体, 其中所述至少一个共表达部分通过可断裂的接头连接至所述嵌合蛋白构建体。

25. 一种核酸分子, 其编码如权利要求 1-24 中任一项所述的嵌合蛋白构建体。

26. 根据权利要求 25 所述的核酸分子, 其为脱氧核糖核酸(DNA)、核糖核酸(RNA) (例如, mRNA、环状 RNA、ccRNA)、苏糖核酸(TNA)、乙二醇核酸(GNA)、肽核酸(PNA)、锁核酸(LNA)、包括具有 β -D-核糖构型的 LNA、具有 α -L-核糖构型的 α -LNA (LNA 的非对映异构体)、具有 2'-氨基官能化的 2'-氨基-LNA 和具有 2'-氨基官能化的 2'-氨基- α -LNA)、乙烯核酸(ENA)、环己烯基核酸(CeNA)和/或它们的嵌合体和/或组合。

27. 一种载体,其包含如权利要求 25 或 26 所述的核酸分子,所述核酸分子可操作地连接至至少一个多核苷酸调控元件以表达所述核酸分子编码的嵌合蛋白构建体。

28. 如权利要求 27 所述的载体,其中所述载体选自:质粒、纳米质粒、粘粒、病毒载体(例如,溶瘤病毒载体)、小环、RNA 载体或线性或圆形 DNA(例如,转座子 DNA)或 RNA 分子。

29. 如权利要求 28 所述的载体,其中所述载体为病毒载体,其选自:逆转录病毒、慢病毒载体、腺病毒、细小病毒(例如,腺伴随病毒)、腺相关病毒(AAV)载体、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、病毒样颗粒(VLP)。

30. 如权利要求 29 所述的载体,其中所述病毒载体为逆转录病毒载体。

31. 如权利要求 30 所述的载体,其中所述逆转录病毒载体选自: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。

32. 如权利要求 29 所述的载体,其中所述病毒载体为慢病毒载体。

33. 如权利要求 32 所述的载体,其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。

34. 如权利要求 27-33 中任一项所述的载体,其进一步与其他载体组合,所述其他载体包含其他核酸分子,所述其他核酸分子编码至少一个共表达部分。

35. 一种工程化细胞,其表达如权利要求 1-25 中任一项所述的嵌合蛋白构建体,或包含如权利要求 26 所述的核酸分子,或包含如权利要求 27-33 中任一项所述的载体。

36. 如权利要求 35 所述工程化的细胞,其表达如权利要求 1-18 任一项所述的嵌合蛋白构建体,以及共表达部分。

37. 如权利要求 35 或 36 所述的工程化细胞,其中所述细胞为免疫细胞,其选自:T 细胞、自然杀伤(NK)细胞、B 细胞、巨噬细胞、单核细胞、树突细胞、中性粒细胞或 $\gamma\delta$ T 细胞。

38. 如权利要求 37 所述的工程化细胞,其中所述 T 细胞选自:CD8+T 细胞、CD4+T 细胞、细胞毒性 T 细胞、末端效应 T 细胞、记忆 T 细胞、幼稚 T 细胞、调节性 T 细胞组成的组细胞、自然杀伤 T 细胞、 $\gamma\delta$ T 细胞、细胞因子诱导的杀伤 (CIK) T 细胞和肿瘤浸润淋巴细胞。

39. 一种产生如权利要求 35-38 中任一项所述的工程化细胞的方法,其包括在适合表达如权利要求 25 或 26 所述的核酸分子的条件将如权利要求 27-34 中任一项所述的载体引入起始细胞。

40. 如权利要求 39 所述的方法,其中所述起始细胞是干细胞或从干细胞分化的细胞。

41. 如权利要求 38 所述的方法,其中所述干细胞是造血祖细胞(例如 T 细胞祖细胞、NK 细胞祖细胞、巨噬细胞祖细胞)、造血干细胞(HSC)、CD34+细胞、胚胎细胞系干细胞、间充质干细胞或 iPSC 细胞。

42. 如权利要求 37 所述的方法,其中所述细胞是免疫细胞。

43. 如权利要求 40 所述的方法,其中所述免疫细胞是 T 细胞、自然杀伤(NK)细胞、B 细胞、巨噬细胞、单核细胞或树突细胞。

44. 如权利要求 41 所述的方法,其中所述细胞是 T 细胞,其选自:CD4+T 细胞、CD8+T 细胞、细胞毒性 T 细胞、末端效应 T 细胞、记忆 T 细胞、幼稚 T 细胞、调节性 T 细胞组成的组细胞、自然杀伤 T 细胞、 $\gamma\delta$ T 细胞、细胞因子诱导的杀伤 (CIK) T 细胞和肿瘤浸润淋巴细胞。

45. 细胞群,其由如权利要求 39-44 中任一项所述的方法离体产生。

46. 一种药物组合物或一种试剂盒,其包含 (i) 如权利要求 1-24 中任一项所述的嵌合蛋白构建体或如权利要求 25 或 26 所述的核酸分子或如权利要求 27-34 中任一项所述的载体或如权利要求 35-38 中任一项所述的工程化细胞或如权利要求 45 所述的细胞群,以及 (ii) 药学上可接受的媒介。

47. 一种降解靶蛋白的方法,其包括将如权利要求 27-34 中任一项所述的载体递送至表达靶蛋白的细胞内。

48. 如权利要求 47 所述的方法,其中所述细胞选自:肿瘤细胞、病毒感染细胞、神经性细胞、移植细胞、免疫细胞。

49. 如权利要求 47 或 48 所述的方法,其中所述递送包括通过病毒载体(例如,溶瘤病毒)递送。

50. 如权利要求 49 所述的方法,其中所述载体在所述细胞内表达如权利要求 1-24 中任一项所述的嵌合蛋白构建体。

51. 如权利要求 50 所述的方法,其中所述嵌合蛋白构建体能够同时结合靶蛋白和 ERAD 机制蛋白,从而降解所述靶蛋白。

52. 一种治疗有需要的受试者的病症或疾病的方法,包括:

向所述受试者施用治疗有效量的如权利要求 46 所述的药物组合物。

53. 如权利要求 52 所述的方法,其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、自身免疫性疾病和神经类和退行性疾病(例如,阿尔茨海默症)、代谢类疾病(例如糖尿病(例如,2 型糖尿病)、

脂代谢相关疾病(例如,肿瘤脂代谢、非酒精性脂肪肝)、动脉粥样硬化(Atherosclerosis, AS)、肿瘤糖代谢);

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;

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癌;

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;流行性感冒;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、皮肌炎、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;

优选地,神经类疾病包括神经系统疾病周围神经疾病如三叉神经痛、面瘫、面肌痉挛、前庭神经元炎、舌咽神经痛、单神经病、臂丛神经病、多发性单神经病、多发性神经病、急性炎症性脱髓鞘性多发性神经病、慢性炎症性脱髓鞘性多发性神经病;

脊髓疾病如脊髓炎、压迫性脊髓病、脊髓亚急性联合变性、脊髓空洞症、脊髓血管病、脊髓蛛网膜炎等;

脑血管疾病如短暂性脑缺血发作、脑梗死、脑出血、蛛网膜下腔出血、颅内静脉系统血栓形成等；

中枢神经系统感染性疾病如有病毒、细菌、真菌或寄生虫等感染导致的脑膜炎、脑炎等以及有慢病毒感染导致的慢病毒脑炎等；

中枢神经系统脱髓鞘性疾病如多发性硬化、视神经脊髓炎、急性传播性脑脊髓炎、脑白质营养不良等；

运动障碍疾病如帕金森病、舞蹈病、肝豆状核变性、肌张力障碍、特发性震颤、迟发型运动障碍等；

癫痫；

头痛如偏头痛、紧张性头痛、丛集性头痛等

神经系统变性疾病如运动神经元病、阿尔茨海默病、路易体痴呆、额颞叶痴呆、多系统萎缩等；

神经系统遗传性疾病如遗传性共济失调、遗传性痉挛性截瘫、腓骨肌萎缩症、神经纤维瘤病、结节性硬化、脑面血管瘤病等；

神经系统发育异常性疾病如先天性脑积水、脑性瘫痪、颅底凹陷症、小脑扁桃体下疝等；

神经-肌肉接头和肌肉疾病如重症肌无力、周期性瘫痪、多发性肌炎、进行性肌营养不良症、肌强直性肌病（强直性肌营养不良症、先天性肌强直症）、代谢性肌病（线粒体肌病、脂质沉积性肌病、糖原沉积症）等；

自主神经系统疾病如雷诺氏病、红斑性肢痛症、面偏侧萎缩症、全身自主神经功能不全、自发性多汗症、进行性脂肪营养不良等；

神经系统肿瘤如脑胶质瘤、淋巴瘤、脊膜瘤等；

神经系统副肿瘤综合症如副肿瘤性小脑变性、副肿瘤性脑脊髓炎、亚急性坏死性脊髓病、亚急性运动神经元病、副肿瘤性感觉神经元病等。

优选地，代谢类疾病包括糖尿病，高脂血症，痛风等。

54. 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如权利要求 46 所述的药物组合物。