

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.  
C12N 5/0783 (2006.01)  
C12N 5/10 (2006.01)



# [12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810198913.3

[43] 公开日 2010年3月31日

[11] 公开号 CN 101684456A

[22] 申请日 2008.9.28

[21] 申请号 200810198913.3

[71] 申请人 江门罗森生物制药有限公司

地址 529000 广东省江门市港口路 72 号市科技创业中心 806

[72] 发明人 张明杰

权利要求书 1 页 说明书 15 页

## [54] 发明名称

一种体外培养条件下扩增人 NK 细胞的方法

## [57] 摘要

本发明公开了一种体外扩增人 NK 细胞的方法。其特征在于以人外周血单个核细胞(PBMC)为原始培养材料,与采用基因工程的方法构建的刺激 NK 细胞生长的工程细胞一起共同培养。构建的刺激 NK 细胞生长的工程细胞是把具有促进 NK 细胞生长的几种细胞因子(IL-2、IL-12、IL-15、IL-18、4-1BB)表达在 K562 细胞的表面。该工程细胞经过  $\gamma$  射线照射灭活后与 PBMC 在体外进行共培养,结果这种刺激方法比目前通用的单纯向培养液中加入可溶性的细胞因子的扩增效果要强几百倍;经过 3 周的培养, PBMC 中的非 NK 细胞基本上死亡消失, NK 细胞大量增殖, NK 细胞的纯度达到了 96% 以上, NK 细胞总数扩增了 1500 倍以上。

1、一种体外扩增人NK细胞的方法，其特征是以人外周血单个核细胞（PBMC）为原始培养材料，与采用基因工程的方法构建的刺激NK细胞生长的工程细胞共同培养。

2、根据权利要求1所述的方法，其特征是刺激NK细胞生长的工程细胞，把具有促进NK细胞生长的若干种细胞因子表达在传代细胞膜表面。

3、根据权利要求2所述的方法，其特征是在传代细胞膜表面表达的细胞因子包括IL-2、IL-12、IL-15、IL-18、4-1BBL五种蛋白单独或共同表达，传代细胞包括K562细胞或HFWT细胞。

4、根据权利要求3所述的方法，其特征是在传代细胞膜上表达人IL-2、IL-12、IL-15、IL-18、4-1BBL五种蛋白是在基因水平将IL-2、IL-12、IL-15、IL-18四种蛋白的基因分别与一段跨膜蛋白的基因拼接；4-1BBL本身含有跨膜区，故不与跨膜蛋白的基因拼接，用其自身完整的基因；随后将这些基因分别克隆到真核表达载体，单独或混合转染传代细胞，构建刺激细胞。

5、根据权利要求4所述的方法，其特征是刺激NK细胞扩增时，使用若干种基因共转染的表达若干种细胞因子的一种工程细胞，或使用至少两种以上表达单一细胞因子的工程细胞的组合。

## 一种体外培养条件下扩增人NK细胞的方法

### 技术领域

本发明涉及免疫学与分子生物学领域，具体涉及有效提高NK细胞的纯度及其杀伤活性的一种体外培养条件下扩增人NK细胞的方法。

### 背景技术

NK（自然杀伤，natural killer）细胞是机体重要的免疫细胞，在抗肿瘤、抗病毒感染免疫中起着重要的作用。由于NK细胞的杀伤活性无MHC限制，因此称为自然杀伤。NK细胞的靶细胞主要是肿瘤细胞、病毒感染细胞、某些自身组织细胞（如血细胞）、寄生虫等，因此NK细胞是机体抗肿瘤、抗感染免疫的重要组成部分。由于这些特点，NK细胞在细胞免疫治疗上有着广泛的应用前景。但是人外周血中NK细胞的含量很少（约占淋巴细胞的5%-20%），从外周血中分离NK细胞成本昂贵，而且分离的NK细胞一般都处于非活化状态，在很大程度上限制了其在临床上的应用。研究显示，IL-2、IL-12、IL-15、IL-18、4-1BBL等细胞因子对促进NK细胞的分化成熟、活化、增殖及细胞毒活性有重要作用。多年来，人们一直尝试在体外培养条件下加入这些细胞因子，期望能使NK细胞得到大量的扩增。从以往的研究报道看，采用向培养液中加入细胞因子的方法，外周血单核细胞（PBMC）经过14-21天的培养，能够使NK细胞扩增几十倍，纯度达到50-60%。另外，采用灭活的K562细胞或者是HFWT肿瘤细胞与PBMC共培养，也能使NK细胞扩增几十倍。但是，这种扩增效果仍然不能满足实际的应用，总的说来，目前尚缺乏有效的体外扩增体系，所以NK细胞的临床应用受到了严重的限制。

### 发明内容

本发明提供了一种扩增人NK细胞的方法，使人PBMC中的NK细胞在体外培养条件下大规模扩增，有效提高NK细胞的总量、纯度以及杀伤活性。

本发明在体外培养条件下扩增人NK细胞的方法是按如下技术方案实现的：采用基因工程的

方法构建一种刺激NK细胞生长的工程细胞,即把具有促进NK细胞生长的几种细胞因子表达在K562细胞的膜表面,构建了表达几种细胞因子的工程细胞。该工程细胞经过 $\gamma$ 射线照射灭活后与人PBMC在体外进行共培养,结果表明这种刺激方法比目前已有的单纯向培养液中加入可溶性细胞因子的扩增效果要强几百倍,经过3周的培养,PBMC中的非NK细胞基本上死亡消失,NK细胞大量增殖,NK细胞纯度达到了96%以上,NK细胞总数扩增了1500倍以上。

本发明提供的体外扩增人NK细胞的方法其特征是,采用基因工程方法构建特殊的刺激细胞,使人PBMC中的NK细胞在体外特定的培养条件下与特殊的刺激细胞共同培养的过程中得到大规模的扩增。特殊的刺激细胞是指采用基因工程的方法在传代细胞表面分别表达人IL-2、IL-12、IL-15、IL-18、4-1BBL五种细胞因子,表达这几种细胞因子的传代细胞可以是K562细胞或HFWT细胞;特定的培养条件包括配制特殊的培养液。

本发明提供的体外扩增人NK细胞的方法其特征是在传代细胞表面表达人IL-2、IL-12、IL-15、IL-18、4-1BBL几种细胞因子,是在基因水平将IL-2、IL-12、IL-15、IL-18四种细胞因子的基因分别与一段跨膜蛋白的基因拼接。4-1BBL本身含有跨膜区,故不与跨膜蛋白的基因拼接,用其自身完整的基因。随后将这些基因分别克隆到真核表达载体pcDNA3.1,再转染K562细胞,构建了特殊的刺激细胞。跨膜蛋白是指当IL-2、IL-12、IL-15、IL-18基因与跨膜蛋白基因融合表达后,能够将IL-2、IL-12、IL-15、IL-18蛋白锚定在表达细胞膜外侧的一类蛋白。

本发明中在体外培养条件下扩增人NK细胞的方法具有以下优点: NK细胞的扩增倍数得到了显著效提高,比单纯向培养液中掺入可溶性IL-2、IL-12、IL-15、IL-18或单纯K562要高几百倍;并且,提高了NK细胞的纯度,扩增获得的NK细胞纯度可以达到96%;与外周血中直接分离的NK细胞相比,按本发明扩增的NK细胞杀伤活性提高20倍、 $\gamma$ -干扰素表达量增加300多倍,表达NKp46激活性受体的NK细胞从0.31%提高到65%,相差约200倍。

### 具体实施方式

本发明中扩增人NK细胞的关键是用人PBMC为原始材料,在特定的条件下把PBMC与采用基因工程的方法构建的刺激细胞一起培养。下面结合实施例具体介绍本发明中在体外扩增人NK细胞

的方法。

实施例 1: CD8  $\alpha$  链跨膜区基因的克隆。

为了能够将 IL-2、IL-12、IL-15、IL-18 细胞因子以膜蛋白形式表达在 K562 细胞的膜外层, 首先把这些细胞因子的胞外部分分别与 CD8  $\alpha$  链跨膜区基因融合。

完整的 CD8  $\alpha$  链跨膜区基因(CD8<sub>tm</sub>)为:

ggatcctacatctgggccccttggccgggacttgtgggtccttctcctgtcactggttatcacccttactgctaagcggccgc

CD8<sub>tm</sub> 是用下面的两段核苷酸链合成的:

CD8F: 5' tcggatcctacatctgggccccttggccgggacttgtgggtccttctcctgtcactgg 3'

CD8R: 5' atcgggccgcttagcagtaaagggtgataaccagtgcagggagaaggaccccaagtcggc 3'

这两段核苷酸链通过退火、延伸得到了完整的 CD8  $\alpha$  链跨膜区基因, 基因的 5' 端和 3' 端分别引入了 BamH I 和 Not I 酶切位点。利用这两个酶切位点, 将 CD8  $\alpha$  链跨膜区基因克隆至 pcDNA3.1+/Neo 真核表达载体上, 测序正确后备用。构建含 CD8  $\alpha$  链跨膜区基因的载体称为: pcDNA3.1-CD8。

实施例 2: IL-2、IL-12、IL-15、IL-18 基因在 K562 细胞膜上的表达。

采用 RT-PCR 的方法分别从人 PBMC 中提取 mRNA, 扩增 IL-2、IL-12、IL-15、IL-18 的 cDNA。

扩增 IL-2 的上游引物是 IL-2F: 5'tcgctagcatgtacaggatgcaactcctg 3', 下游引物是 IL-2R: 5' tcggatcc agtcagtgttgagatgatgc 3', 上下游引物中分别引入了 Nhe I 和 BamH I 酶切位点;

扩增 IL-12 的上游引物是 IL-12F: 5' tagctagc atgtggccccctgggtcagcct 3', 下游引物是 IL-12R: 5' tcggatccggaagcattcagatagctc 3', 上下游引物中分别引入了 Nhe I 和 BamH I 酶切位点;

扩增 IL-15 的上游引物是 IL-15F: 5' tcgctagcatgagaatttcgaaaccacatttgag 3', 下游引物是 IL-15R: 5' tcggatccagaagtgttgatgaacatttgac 3', 上下游引物中分别引入了 Nhe I 和 BamH I 酶切位点;

扩增 IL-18 的上游引物是 IL-18F: 5' tcgctagc atgctgctgaaccagtagaagac 3', 下游引物是 IL-18R: 5' tcggatcc gtcttcgtttgaaacagtgaacattatag 3', 上下游引物中分别引入了 Nhe I 和 BamH I 酶切位点;

扩增的 IL-2、IL-12、IL-15、IL-18 cDNA 用 Nhe I 和 BamH I 双酶切后分别克隆到 pcDNA3.1-CD8

载体中 CD8  $\alpha$  链跨膜区基因的上游，然后分别转染 K562 细胞，G418 筛选单个克隆细胞，抗体染色鉴定，最后分别获得了以跨膜形式表达 IL-2、IL-12、IL-15、IL-18 的 K562 工程细胞（刺激 NK 细胞扩增的 K562 细胞）。

IL-2 与 CD8  $\alpha$  链跨膜区的融合基因（IL-2CD8）序列为：

gctagcatgtacaggatgcaactcctgtcttcattgcactaagctctgcactgtcacaacagtgacacttcaagttctacaaagaaaacacagctacaa  
ctggagcatttactgtctggatttacagatgatttgaatggaattaataaattacaagaatc  
ccaaacaccaggatgctcacatftaagttttacatgcccaagaaggccacagaactgaaacatcttcagtgcttagaa  
gaagaacicaaacctctggaggaagtgtctaaatftagctcaaaagcaaaaactttcacttaagaccagggacttaacag  
caatatcaacgtaatagttctggaactaaaggatctgaaacaacattcatgtgtgaatgctgatgagacagcaacca  
ttgtagaatttctgaacagatgattacctttgtcaaaagcatcatcaacactgactggatcctacatctgggcgcccttgccgggactgtgggtcctctc  
ctgtcactggttatcacccttactgctaagcggccgc

IL-12 与 CD8  $\alpha$  链跨膜区的融合基因（IL-12CD8）序列为：

gctagcatgtggcccctgggtcagocctccagccaccgccctcaactgcccggccacaggctcgcacccagcggctcgcctgt  
gtccctgcagtgccggctcagcatgtgtccagcgcgagcctcctctgtgctaccctggctcctctgaccacctca  
gtttggccagaacctcccgtgocactccagaccaggaatgtcccatgcctcaccactccaaaacctgtctgagg  
gcccgtcagcaacatgctccagaaggccagacaacctagaattttacccttgactctgaagagattgatcatgaaga  
tatcacaagaataaacaccagcacagtggaggcctgtttaccattggaaitaaccaagaatgagagttgcctaaaitcca  
gagagacctttcataactaatggaggttgccctgccccagaaagaccttttatgatggccctgtgccttagtagt  
attatgaagactgaagatgtaccagggtgagttcaagaccatgaatgcaaaagcttctgatggatcctaagaggcagat  
ctttctagatcaaacatgctggcagttatgatgagctgatgcaggccctgaattcaacagtgagactgtgccacaaa  
aatccctccctgaagaaccggattttataaaactaaaatcaagctctgcatacttctcatgctttcagaattcgggca  
gtgactatgatagatgatgagctatctgaatgtccggatcctacatctgggcgcccttgccgggactgtgggtcctctcctgtcactggttatcacccttactgctaagcgg  
ccgc

IL-15 与 CD8  $\alpha$  链跨膜区的融合基因（IL-15CD8）序列为：

gctagcatgagaatttcgaaaccacattfgaagaagtatttccatccagtgcacttctgtttacttctaaacagtcattttctaactgaagctggcattcatgtctcait  
ttgggctgtttcagtcagggtctcctaaacagaagccaactgggtgaatgtaataagtgatttgaaaaaattgaagatcttaticaatctatgcatattgatgc  
tactttatatacggaaagtgatgttaccaccagttgcaaaagtaacagcaatgaagtgctttctcttgagttacaagtattttcacttgagtcggagatgcaagtat  
tcatgatacagtagaaaactgtatccttagcaaaacagttgtcttctaatgggaatgtaacagaatctggatgcaagaatgtgagggaactggaggaaa  
aaaaatftaagaattttgtcagagttttgtacataattgtccaaatgttcatcaacacttctggatcctacatctgggcgcccttgccgggactgtgggtcctctcctgtca  
ctggttatcacccttactgctaagcggccgc

IL-18 与 CD8  $\alpha$  链跨膜区的融合基因（IL-18CD8）序列为：

gctagcatggctgctgaaccagtagaagacaaitgcatcaactttggcgaatgaaatttatgacaatacgttactttatagc  
tgaagatgatgaaacctggaatcagatttctggcaagcttgaatcctaattatcagtcataagaattgaaatgacc  
aagttcttcatgaccaaggaaatcggccttattgagatagactgattctgactgtgagataatgcacccgg  
accatattatataagatgtataaagatagccagcctagaggtatggctgtaactatctctgtaagtgtagaaaat  
ttcaactctcctgtgagaaacaaattatttcttlaaggaatgaaatcctctgataacatcaggatacaaaaagt  
acatcatattttcagagaaggtgtccaggacatgataaagatgcaattgaaatcttcatatcagaggatacttt  
ctagctgtgaaaaagagagacaccttttaaacctatttgaaaaaagaggatgaattggggatagatctataatgtt



4-1BBL 的 K562 工程细胞’刺激组为 93%。NK 细胞的数量从扩增初的 3 万/孔到扩增后的 5 千万和 5.5 千万，分别扩增了 1666 倍和 1833 倍。

#### 实施例 5: NK 杀伤活性实验

‘表达 IL-12、IL-15、IL-18、4-1BBL 的 K562 工程细胞’刺激组扩增的 NK 细胞以及‘表达 IL-2、IL-12、IL-15、IL-18、4-1BBL 的 K562 工程细胞’刺激组扩增的 NK 细胞，分别与 K562 细胞作用，观察 NK 细胞对 K562 细胞的杀伤率。NK 细胞（效应细胞）与 K562 细胞（靶细胞）的比例为 5:2。效应细胞与靶细胞 37°C 二氧化碳孵箱孵育 4 小时后加入甲基偶氮唑盐(methy thiazolyl tetrazolium , MTT)再孵育 4 小时，570nm 波长测 OD 值并计算杀伤率。杀伤率 (%) =  $(1 - (\text{效应细胞孔 OD 值} - \text{效应细胞孔 OD 值}) / \text{靶细胞孔 OD 值}) \times 100\%$ ；‘表达 IL-12、IL-15、IL-18、4-1BBL 的 K562 工程细胞’刺激组扩增的 NK 细胞的杀伤率为 80%，‘表达 IL-2、IL-12、IL-15、IL-18、4-1BBL 的 K562 工程细胞’刺激组扩增的 NK 细胞的杀伤率为 85%。



## 说明书单独部分 核苷酸序列表

<110> 江门罗森生物制药有限公司

<120> 一种体外培养条件下扩增人NK细胞的方法

<130>

<140>

<141>

<150>

<151>

<160> 18

<170>

<210> 1

<211>

<212> DNA

<213> CD8  $\alpha$  链跨膜区

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(78)

<223>

<400> 1

```

gga tcc tac atc tgg gcg ccc ttg gcc ggg act tgt ggg gtc ctt 45
Gly Ser Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu
1           5           10           15
ctc ctg tca ctg gtt atc acc ctt tac tgc taa gcg gcc gc 86
Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys *
                20                25

```

<210> 2

<211>

<212> DNA

<213> CD8F

<220>

<221>

<222>

<223>

<400> 2

```

tcggatccta catctgggcg cccttggccg ggaacttggtg ggtccttctc ctgtcactgg 60

```

<210> 3

<211>

<212> DNA

<213> CD8R

<220>

<221>

<222>

---

<223>

<400> 3

atgCGGCCGC ttagcagtaa agggTgataa ccagtGacag gagaaggacc ccacaagtcc 60  
cgg 63

<210> 4

<211>

<212> DNA

<213> IL-2F

<220>

<221>

<222>

<223>

<400> 4

tCgctagcat gTAcaggatg caactcctg 29

<210> 5

<211>

<212> DNA

<213> IL-2R

<220>

<221>

<222>

<223>

<400> 5

tCggatccag tCagtgttga gatgatgc 29

<210> 6

<211>

<212> DNA

<213> IL-12F

<220>

<221>

<222>

<223>

<400> 6

tagctagcat gTggccccct gggTcagcct 30

<210> 7

<211>

<212> DNA

<213> IL-12R

<220>

<221>

<222>

<223>

<400> 7

tCggatccgg aagcattcag atagctc 27

---

<210> 8  
<211>  
<212> DNA  
<213> IL-15F  
<220>  
<221>  
<222>  
<223>  
<400> 8  
tcgctagcat gagaatttgc aaaccacatt tgag 34

<210> 9  
<211>  
<212> DNA  
<213> IL-15R  
<220>  
<221>  
<222>  
<223>  
<400> 9  
tcggatccag aagtgttgat gaacatttgg ac 32

<210> 10  
<211>  
<212> DNA  
<213> IL-18F  
<220>  
<221>  
<222>  
<223>  
<400> 10  
tcgctagcat ggctgctgaa ccagtagaag ac 32

<210> 11  
<211>  
<212> DNA  
<213> IL-18R  
<220>  
<221>  
<222>  
<223>  
<400> 11  
tcggatccgt cttcgttttg aacagtgaac attatag 37

<210> 12  
<211>  
<212> DNA  
<213> IL-2CD8  
<220>

&lt;221&gt;

&lt;222&gt; (7)...(543)

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 12

```

gct agc atg tac agg atg caa ctc ctg tct tgc att gca cta agt 45
      Met Tyr Arg Met Gln Leu Leu Ser Cys Ile Ala Leu Ser
        1           5           10
ctt gca ctt gtc aca aac agt gca cct act tca agt tct aca aag 90
Leu Ala Leu Val Thr Asn Ser Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys
      15           20           25
aaa aca cag cta caa ctg gag cat tta ctg ctg gat tta cag atg 135
Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met
      30           35           40
att ttg aat gga att aat aat tac aag aat ccc aaa ctc acc agg 180
Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg
      45           50           55
atg ctc aca ttt aag ttt tac atg ccc aag aag gcc aca gaa ctg 225
Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu
      60           65           70
aaa cat ctt cag tgt cta gaa gaa gaa ctc aaa cct ctg gag gaa 270
Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu
      75           80           85
gtg cta aat tta gct caa agc aaa aac ttt cac tta aga ccc agg 315
Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg
      90           95           100
gac tta atc agc aat atc aac gta ata gtt ctg gaa cta aag gga 360
Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly
      105          110          115
tct gaa aca aca ttc atg tgt gaa tat gct gat gag aca gca acc 405
Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr
      120          125          130
att gta gaa ttt ctg aac aga tgg att acc ttt tgt caa agc atc 450
Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile
      135          140          145
atc tca aca ctg act gga tcc tac atc tgg gcg ccc ttg gcc ggg 495
Ile Ser Thr Leu Thr Gly Ser Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly
      150          155          160
act tgt ggg gtc ctt ctc ctg tca ctg gtt atc acc ctt tac tgc 540
Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys
      165          170          175

```

**taa gcg gcc gc 548**

\*

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt;

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; IL-12CD8

&lt;220&gt;

&lt;221&gt;

&lt;222&gt; (7)...(843)

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 13

```

gct agc atg tgg ccc cct ggg tca gcc tcc cag cca ccg ccc tca 45
      Met Trp Pro Pro Gly Ser Ala Ser Gln Pro Pro Pro Ser
      1           5           10
cct gcc gcg gcc aca ggt ctg cat cca gcg gct cgc cct gtg tcc 90
Pro Ala Ala Ala Thr Gly Leu His Pro Ala Ala Arg Pro Val Ser
      15           20           25
ctg cag tgc cgg ctc agc atg tgt cca gcg cgc agc ctc ctc ctt 135
Leu Gln Cys Arg Leu Ser Met Cys Pro Ala Arg Ser Leu Leu Leu
      30           35           40
gtg gct acc ctg gtc ctc ctg gac cac ctc agt ttg gcc aga aac 180
Val Ala Thr Leu Val Leu Leu Asp His Leu Ser Leu Ala Arg Asn
      45           50           55
ctc ccc gtg gcc act cca gac cca gga atg ttc cca tgc ctt cac 225
Leu Pro Val Ala Thr Pro Asp Pro Gly Met Phe Pro Cys Leu His
      60           65           70
cac tcc caa aac ctg ctg agg gcc gtc agc aac atg ctc cag aag 270
His Ser Gln Asn Leu Leu Arg Ala Val Ser Asn Met Leu Gln Lys
      75           80           85
gcc aga caa act cta gaa ttt tac cct tgc act tct gaa gag att 315
Ala Arg Gln Thr Leu Glu Phe Tyr Pro Cys Thr Ser Glu Glu Ile
      90           95           100
gat cat gaa gat atc aca aaa gat aaa acc agc aca gtg gag gcc 360
Asp His Glu Asp Ile Thr Lys Asp Lys Thr Ser Thr Val Glu Ala
      105           110           115
tgt tta cca ttg gaa tta acc aag aat gag agt tgc cta aat tcc 405
Cys Leu Pro Leu Glu Leu Thr Lys Asn Glu Ser Cys Leu Asn Ser
      120           125           130
aga gag acc tct ttc ata act aat ggg agt tgc ctg gcc tcc aga 450
Arg Glu Thr Ser Phe Ile Thr Asn Gly Ser Cys Leu Ala Ser Arg
      135           140           145
aag acc tct ttt atg atg gcc ctg tgc ctt agt agt att tat gaa 495
Lys Thr Ser Phe Met Met Ala Leu Cys Leu Ser Ser Ile Tyr Glu
      150           155           160
gac ttg aag atg tac cag gtg gag ttc aag acc atg aat gca aag 540
Asp Leu Lys Met Tyr Gln Val Glu Phe Lys Thr Met Asn Ala Lys
      165           170           175
ctt ctg atg gat cct aag agg cag atc ttt cta gat caa aac atg 585
Leu Leu Met Asp Pro Lys Arg Gln Ile Phe Leu Asp Gln Asn Met
      180           185           190
ctg gca gtt att gat gag ctg atg cag gcc ctg aat ttc aac agt 630
Leu Ala Val Ile Asp Glu Leu Met Gln Ala Leu Asn Phe Asn Ser
      195           200           205
gag act gtg cca caa aaa tcc tcc ctt gaa gaa ccg gat ttt tat 675
Glu Thr Val Pro Gln Lys Ser Ser Leu Glu Glu Pro Asp Phe Tyr
      210           215           220
aaa act aaa atc aag ctc tgc ata ctt ctt cat gct ttc aga att 720

```

Lys Thr Lys Ile Lys Leu Cys Ile Leu Leu His Ala Phe Arg Ile  
 225 230 235  
 cgg gca gtg act att gat aga gtg atg agc tat ctg aat gct tcc 765  
 Arg Ala Val Thr Ile Asp Arg Val Met Ser Tyr Leu Asn Ala Ser  
 240 245 250  
**gga tcc tac atc tgg gcg ccc ttg gcc ggg act tgt ggg gtc ctt 810**  
 Gly Ser Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu  
 255 260 265  
**ctc ctg tca ctg gtt atc acc ctt tac tgc taa gcg gcc gc 851**  
 Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys \*  
 270 275

<210> 14

<211>

<212> DNA

<213> IL-15CD8

<220>

<221>

<222> (7)...(570)

<223>

<400> 14

gct agc atg aga att tcg aaa cca cat ttg aga agt att tcc atc 45  
 Met Arg Ile Ser Lys Pro His Leu Arg Ser Ile Ser Ile  
 1 5 10  
 cag tgc tac ttg tgt tta ctt cta aac agt cat ttt cta act gaa 90  
 Gln Cys Tyr Leu Cys Leu Leu Leu Asn Ser His Phe Leu Thr Glu  
 15 20 25  
 gct ggc att cat gtc ttc att ttg ggc tgt ttc agt gca ggg ctt 135  
 Ala Gly Ile His Val Phe Ile Leu Gly Cys Phe Ser Ala Gly Leu  
 30 35 40  
 cct aaa aca gaa gcc aac tgg gtg aat gta ata agt gat ttg aaa 180  
 Pro Lys Thr Glu Ala Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys  
 45 50 55  
 aaa att gaa gat ctt att caa tct atg cat att gat gct act tta 225  
 Lys Ile Glu Asp Leu Ile Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr Leu  
 60 65 70  
 tat acg gaa agt gat gtt cac ccc agt tgc aaa gta aca gca atg 270  
 Tyr Thr Glu Ser Asp Val His Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met  
 75 80 85  
 aag tgc ttt ctc ttg gag tta caa gtt att tca ctt gag tcc gga 315  
 Lys Cys Phe Leu Leu Glu Leu Gln Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly  
 90 90 100  
 gat gca agt att cat gat aca gta gaa aat ctg atc atc cta gca 360  
 Asp Ala Ser Ile His Asp Thr Val Glu Asn Leu Ile Ile Leu Ala  
 105 110 115  
 aac aac agt ttg tct tct aat ggg aat gta aca gaa tct gga tgc 405  
 Asn Asn Ser Leu Ser Ser Asn Gly Asn Val Thr Glu Ser Gly Cys  
 120 125 130  
 aaa gaa tgt gag gaa ctg gag gaa aaa aat att aaa gaa ttt ttg 450

Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu Glu Lys Asn Ile Lys Glu Phe Leu  
 135 140 145  
 cag agt ttt gta cat att gtc caa atg ttc atc aac act tct **gga 495**  
 Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln Met Phe Ile Asn Thr Ser Gly  
 150 155 160  
**tcc tac atc tgg gcg ccc ttg gcc ggg act tgt ggg gtc ctt ctc 540**  
 Ser Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu  
 165 170 175  
**ctg tca ctg gtt atc acc ctt tac tgc taa gcg gcc gc 578**  
 Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys \*  
 180 185

&lt;210&gt; 15

&lt;211&gt;

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; IL-18CD8

&lt;220&gt;

&lt;221&gt;

&lt;222&gt; (7)...(663)

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 15

gct agc atg gct gct gaa cca gta gaa gac aat tgc atc aac ttt 45  
 Met Ala Ala Glu Pro Val Glu Asp Asn Cys Ile Asn Phe  
 1 5 10  
 gtg gca atg aaa ttt att gac aat acg ctt tac ttt ata gct gaa 90  
 Val Ala Met Lys Phe Ile Asp Asn Thr Leu Tyr Phe Ile Ala Glu  
 15 20 25  
 gat gat gaa aac ctg gaa tca gat tac ttt ggc aag ctt gaa tct 135  
 Asp Asp Glu Asn Leu Glu Ser Asp Tyr Phe Gly Lys Leu Glu Ser  
 30 35 40  
 aaa tta tca gtc ata aga aat ttg aat gac caa gtt ctc ttc att 180  
 Lys Leu Ser Val Ile Arg Asn Leu Asn Asp Gln Val Leu Phe Ile  
 45 50 55  
 gac caa gga aat cgg cct cta ttt gaa gat atg act gat tct gac 225  
 Asp Gln Gly Asn Arg Pro Leu Phe Glu Asp Met Thr Asp Ser Asp  
 60 65 70  
 tgt aga gat aat gca ccc cgg acc ata ttt att ata agt atg tat 270  
 Cys Arg Asp Asn Ala Pro Arg Thr Ile Phe Ile Ile Ser Met Tyr  
 75 80 85  
 aaa gat agc cag cct aga ggt atg gct gta act atc tct gtg aag 315  
 Lys Asp Ser Gln Pro Arg Gly Met Ala Val Thr Ile Ser Val Lys  
 90 95 100  
 tgt gag aaa att tca act ctc tcc tgt gag aac aaa att att tcc 360  
 Cys Glu Lys Ile Ser Thr Leu Ser Cys Glu Asn Lys Ile Ile Ser  
 105 110 115  
 ttt aag gaa atg aat cct cct gat aac atc aag gat aca aaa agt 405  
 Phe Lys Glu Met Asn Pro Pro Asp Asn Ile Lys Asp Thr Lys Ser  
 120 125 130  
 gac atc ata ttc ttt cag aga agt gtc cca gga cat gat aat aag 450

```

Asp Ile Ile Phe Phe Gln Arg Ser Val Pro Gly His Asp Asn Lys
  135                140                145
atg caa ttt gaa tct tca tca tac gaa gga tac ttt cta gct tgt 495
Met Gln Phe Glu Ser Ser Ser Tyr Glu Gly Tyr Phe Leu Ala Cys
  150                155                160
gaa aaa gag aga gac ctt ttt aaa ctc att ttg aaa aaa gag gat 540
Glu Lys Glu Arg Asp Leu Phe Lys Leu Ile Leu Lys Lys Glu Asp
  165                170                175
gaa ttg ggg gat aga tct ata atg ttc act gtt caa aac gaa gac 585
Glu Leu Gly Asp Arg Ser Ile Met Phe Thr Val Gln Asn Glu Asp
  180                185                190
gga tcc tac atc tgg gcg ccc ttg gcc ggg act tgt ggg gtc ctt 630
Gly Ser Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu
  195                200                205
ctc ctg tca ctg gtt atc acc ctt tac tgc taa gcg gcc gc 671
Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys *
  210                215

```

<210> 16

<211>

<212> DNA

<213> 4-1BB-F

<220>

<221>

<222>

<223>

<400> 16

tcgctagcat ggaatacgcc tctgacgctt cac 33

<210> 17

<211>

<212> DNA

<213> 4-1BB-R

<220>

<221>

<222>

<223>

<400> 17

tcggatcctt attccgacct cggtgaaggg ag 32

<210> 18

<211>

<212> DNA

<213> 4-1BB-R

<220>

<221>

<222> (7)...(624)

<223>

<400> 18



```

gct agc atg gaa tac gcc tct gac gct tca ctg gac ccc gaa gcc 45
  Met Glu Tyr Ala Ser Asp Ala Ser Leu Asp Pro Glu Ala
    1           5           10
ccg tgg cct ccc gcg ccc cgc gct cgc gcc tgc cgc gta ctg cct 90
Pro Trp Pro Pro Ala Pro Arg Ala Arg Ala Cys Arg Val Leu Pro
  15           20           25
ccc gac gat ccc gcc ggc ctc ttg gac ctg cgg cag ggc atg ttt 135
Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe
  30           35           40
gcg cag ctg gtg gcc caa aat gtt ctg ctg atc gat ggg ccc ctg 180
Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu
  45           50           55
agc tgg tac agt gac cca ggc ctg gca ggc gtg tcc ctg acg ggg 225
Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly
  60           65           70
ggc ctg agc tac aaa gag gac acg aag gag ctg gtg gtg gcc aag 270
Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val Val Ala Lys
  75           80           85
gct gga gtc tac tat gtc ttc ttt caa cta gag ctg cgg cgc gtg 315
Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val
  90           95           100
gtg gcc ggc gag ggc tca ggc tcc gtt tca ctt gcg ctg cac ctg 360
Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His Leu
  105          110          115
cag cca ctg cgc tct gct gct ggg gcc gcc gcc ctg gct ttg acc 405
Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr
  120          125          130
gtg gac ctg cca ccc gcc tcc tcc gag gct cgg aac tcg gcc ttc 450
Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe
  135          140          145
ggt ttc cag ggc cgc ttg ctg cac ctg agt gcc ggc cag cgc ctg 495
Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu
  150          155          160
ggc gtc cat ctt cac act gag gcc agg gca cgc cat gcc tgg cag 540
Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln
  165          170          175
ctt acc cag ggc gcc aca gtc ttg gga ctc ttc cgg gtg acc ccc 585
Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro
  180          185          190
gaa atc cca gcc gga ctc cct tca ccg agg tcg gaa taa gga tcc 630
Glu Ile Pro Ala Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu *
  195          200          205

```