



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110636851 A

(43)申请公布日 2019.12.31

(21)申请号 201880029848.3

(22)申请日 2018.03.27

(30)优先权数据

62/477,335 2017.03.27 US

62/628,774 2018.02.09 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019.11.05

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2018/024650 2018.03.27

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/183385 EN 2018.10.04

(71)申请人 新加坡国立大学

地址 新加坡新加坡

申请人 恩卡尔塔公司

(72)发明人 梁峻豪 岛崎纪子 萧思文

D·坎帕纳 J·B·特拉格尔

A·L·L·拉泽迪克 郭超

路旋·郭·布伦 S·S·马斯拉尼

(74)专利代理机构 北京三友知识产权代理有限公司 11127

代理人 李栋修 庞东成

(51)Int.Cl.

A61K 35/17(2006.01)

A61K 38/00(2006.01)

A01N 63/00(2006.01)

C07K 14/725(2006.01)

C07K 14/705(2006.01)

C12N 5/0783(2006.01)

权利要求书7页 说明书45页

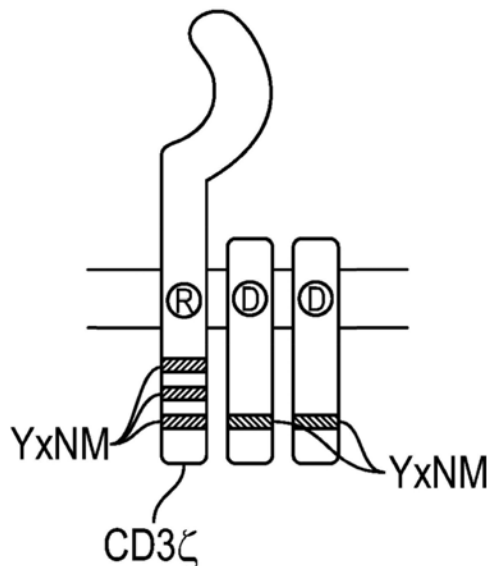
序列表87页 附图44页

(54)发明名称

截短的NKG2D嵌合受体及其在自然杀伤细胞免疫疗法中的用途

(57)摘要

本文披露的若干实施例涉及包含表达嵌合受体的工程改造的自然杀伤(NK)细胞的组合物,该嵌合受体赋予这些NK细胞增强的靶向特定细胞例如癌细胞或受传染病影响的细胞的能力。若干实施例涉及靶向表达NKG2D的天然配体的细胞的NK细胞,其中这些NK细胞包含当这些NK细胞结合靶细胞时导致细胞毒性和/或细胞溶解作用的跨膜和/或信号传导结构域。在若干实施例中还提供了NK细胞组合物用于治疗疾病的用途。



1. 一种编码嵌合受体的多核苷酸,该嵌合受体包含:
 - (a) 胞外受体结构域,
其中所述胞外受体结构域包含与自然杀伤组2成员D (NKG2D) 的天然配体结合的肽,
其中与NKG2D的天然配体结合的该肽是NKG2D片段,
其中该NKG2D片段由包含SEQ ID NO.2的多核苷酸编码;以及
 - (b) 包含跨膜区和胞内信号传导结构域的效应子结构域,
其中该胞内信号传导结构域包含CD3 ζ , 并且
其中该CD3 ζ 由包含SEQ ID NO.13的多核苷酸编码。
2. 如权利要求1所述的多核苷酸,其中该效应子结构域的跨膜区包含CD8a跨膜结构域。
3. 如权利要求1所述的多核苷酸,其中该效应子结构域的跨膜区还包含CD8a铰链区。
4. 如权利要求3所述的多核苷酸,其中该CD8a铰链区由包含SEQ ID NO:5的多核苷酸编码。
5. 如权利要求1所述的多核苷酸,其中该胞内信号传导结构域还包含4-1BB。
6. 如权利要求5所述的多核苷酸,其中该4-1BB由包含SEQ ID NO.12的多核苷酸编码。
7. 如权利要求1所述的多核苷酸,其中该嵌合受体包含与CD8a偶联的NKG2D片段、4-1BB和CD3 ζ 。
8. 如权利要求7所述的多核苷酸,其中该嵌合受体由SEQ ID NO.18的核酸序列编码。
9. 如权利要求7所述的多核苷酸,其中该嵌合受体由SEQ ID NO.108的核酸序列编码。
10. 如权利要求7所述的多核苷酸,其中该嵌合受体包含SEQ ID NO.19的氨基酸序列。
11. 一种治疗癌症的方法,该方法包括向患有癌症的受试者给予组合物,该组合物包含表达由如权利要求1至10中任一项所述的多核苷酸编码的嵌合受体的自然杀伤(NK) 细胞。
12. 如权利要求11所述的方法,其中所述NK细胞是从患有癌症或传染病的患者分离的自体细胞。
13. 如权利要求11所述的方法,其中所述NK细胞是从供体分离的同种异体细胞。
14. 如权利要求1-10中任一项所述的多核苷酸在制备用于增强有需要的哺乳动物中NK细胞细胞毒性的药物中的用途。
15. 如权利要求1-10中任一项所述的多核苷酸在制备用于治疗或预防有需要的哺乳动物中的癌症或传染病的药物中的用途。
16. 一种编码由细胞表达的嵌合受体的多核苷酸,该嵌合受体包含:
 - (a) 胞外受体结构域,
其中所述胞外受体结构域包含与自然杀伤组2成员D (NKG2D) 的天然配体结合的肽,
其中与NKG2D的天然配体结合的该肽是NKG2D片段,
其中该NKG2D片段由包含SEQ ID NO.2的多核苷酸编码,以及
 - (b) 包含跨膜区和胞内信号传导结构域的效应子结构域,
其中该胞内信号传导结构域包含CD3 ζ ,
其中该CD3 ζ 由包含SEQ ID NO.13的多核苷酸编码并且
其中该细胞还包含膜结合的白细胞介素15 (mbIL15) 。
17. 如权利要求16所述的多核苷酸,其中该效应子结构域的跨膜区包含CD8a跨膜结构域。

18. 如权利要求16所述的多核苷酸,其中该效应子结构域的跨膜区还包含CD8a铰链区。
19. 如权利要求18所述的多核苷酸,其中该CD8a铰链区由包含SEQ ID NO:5的多核苷酸编码。
20. 如权利要求16所述的多核苷酸,其中该mbIL15由包含SEQ ID NO.16的多核苷酸编码。
21. 如权利要求20所述的多核苷酸,其中该mbIL15在与该嵌合受体相同的多核苷酸上双顺反子表达。
22. 如权利要求20所述的多核苷酸,其中mbIL15包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列。
23. 如权利要求20所述的多核苷酸,其中该效应子结构域还包含OX-40结构域。
24. 如权利要求23所述的多核苷酸,其中该嵌合受体包含与CD8a铰链偶联的NKG2D片段、CD8a跨膜结构域、该OX-40结构域、该CD3 ζ 。
25. 如权利要求24所述的多核苷酸,其中该嵌合受体由SEQ ID NO:90的核酸序列编码,该核酸序列与由SEQ ID NO.16编码的mbIL15偶联。
26. 如权利要求25所述的多核苷酸,其中该嵌合受体包含SEQ ID NO:91的氨基酸序列,该氨基酸序列与包含SEQ ID NO.17的氨基酸序列的mbIL15偶联。
27. 如权利要求23所述的多核苷酸,其中该嵌合受体包含与IgG4铰链偶联的NKG2D片段、CD8a跨膜结构域、该OX-40结构域、该CD3 ζ 。
28. 如权利要求27所述的多核苷酸,其中该嵌合受体由SEQ ID NO:100的核酸序列编码,该核酸序列与由SEQ ID NO.16编码的mbIL15偶联。
29. 如权利要求28所述的多核苷酸,其中该嵌合受体包含SEQ ID NO:101的氨基酸序列,该氨基酸序列与包含SEQ ID NO.17的氨基酸序列的mbIL15偶联。
30. 一种治疗癌症的方法,该方法包括向患有癌症的受试者给予组合物,该组合物包含表达由如权利要求15至29中任一项所述的多核苷酸编码的嵌合受体的自然杀伤(NK)细胞。
31. 如权利要求30所述的方法,其中所述NK细胞是从患有癌症的患者分离的自体细胞。
32. 如权利要求30所述的方法,其中所述NK细胞是从供体分离的同种异体细胞。
33. 如权利要求15-29中任一项所述的多核苷酸在制备用于增强有需要的哺乳动物中NK细胞细胞毒性的药物中的用途。
34. 如权利要求15-29中任一项所述的多核苷酸在制备用于治疗或预防有需要的哺乳动物中的癌症或传染病的药物中的用途。
35. 一种编码嵌合受体的多核苷酸,该嵌合受体包含:
 - (a) 胞外受体结构域,
其中所述胞外受体结构域包含与自然杀伤组2成员D(NKG2D)的天然配体结合的肽,
其中与NKG2D的天然配体结合的该肽是NKG2D片段,
其中该NKG2D片段由多核苷酸编码,该多核苷酸包含:(i) SEQ ID NO:1的片段,(ii) SEQ ID NO.2,或(iii) SEQ ID NO.3;以及
 - (b) 包含跨膜区和胞内信号传导结构域的效应子结构域。
36. 如权利要求35所述的多核苷酸,其中该效应子结构域包含CD16。
37. 如权利要求35所述的多核苷酸,其中该效应子结构域包含天然细胞毒性触发受体1(NCR1)。

38. 如权利要求35所述的多核苷酸,其中该效应子结构域包含天然细胞毒性触发受体2 (NCR2) 或天然细胞毒性触发受体3 (NCR3)。

39. 如权利要求35-38中任一项所述的多核苷酸,其中该效应子结构域还包含4-1BB。

40. 如权利要求36所述的多核苷酸,其中该嵌合受体包含与CD16偶联的NKG2D片段。

41. 如权利要求40所述的多核苷酸,其中该嵌合受体由SEQ ID NO:23的核酸序列编码。

42. 如权利要求40所述的多核苷酸,其中该嵌合受体包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列。

43. 如权利要求40所述的多核苷酸,其中该嵌合受体包含与NCR1偶联的NKG2D片段。

44. 如权利要求43所述的多核苷酸,其中该嵌合受体由SEQ ID NO:27的核酸序列编码。

45. 如权利要求43所述的多核苷酸,其中该嵌合受体包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列。

46. 如权利要求38所述的多核苷酸,其中该嵌合受体包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列的至少一部分。

47. 如权利要求36所述的多核苷酸,其中该嵌合受体包含与NCR3偶联的NKG2D片段。

48. 如权利要求47所述的多核苷酸,其中该嵌合受体由SEQ ID NO.29的核酸序列编码。

49. 如权利要求47所述的多核苷酸,其中该嵌合受体包含SEQ ID NO.30的氨基酸序列。

50. 如权利要求39所述的多核苷酸,其中该嵌合受体包含与CD16跨膜/胞内结构域偶联的NKG2D片段和4-1BB。

51. 如权利要求39所述的多核苷酸,其中该嵌合受体包含与CD8a铰链偶联的NKG2D片段、CD16跨膜/胞内结构域和4-1BB。

52. 如权利要求51所述的多核苷酸,其中该嵌合受体由SEQ ID NO:25的核酸序列编码。

53. 如权利要求51所述的多核苷酸,其中该嵌合受体包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列。

54. 如权利要求39所述的多核苷酸,其中该嵌合受体包含与NCR1偶联的NKG2D片段和4-1BB。

55. 如权利要求54所述的多核苷酸,其中该嵌合受体包含SEQ ID NO:20的NCR1氨基酸序列。

56. 如权利要求39所述的多核苷酸,其中该嵌合受体包含与CD8a偶联的NKG2D片段、4-1BB和CD3 ζ 。

57. 如权利要求56所述的多核苷酸,其中该嵌合受体由SEQ ID NO.18的核酸序列编码。

58. 如权利要求56所述的多核苷酸,其中该嵌合受体包含SEQ ID NO.19的氨基酸序列。

59. 如权利要求39所述的多核苷酸,其中该嵌合受体包含与NCR3偶联的NKG2D片段和4-1BB,并且其中该NCR3包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列。

60. 如权利要求39所述的多核苷酸,其中该嵌合受体包含SEQ ID NO:20的NCR1跨膜/胞内结构域或SEQ ID NO:22的NCR3跨膜/胞内结构域中的一个或多个。

61. 如权利要求39所述的多核苷酸,其中该效应子结构域包含4-1BB与CD16、NCR1、NCR3、2B4或NKp80之一之间的GS接头。

62. 如权利要求35-61中任一项所述的多核苷酸,其中该嵌合受体结构域包含铰链区。

63. 如权利要求62所述的多核苷酸,其中该铰链区由SEQ ID NO:5的核酸序列编码。

64. 如权利要求62所述的多核苷酸,其中该铰链区由SEQ ID NO:5的核酸序列的片段编码。

65. 如权利要求62所述的多核苷酸,其中该铰链区包含具有SEQ ID NO:31的氨基酸序

列的甘氨酸-丝氨酸重复基序。

66. 如权利要求62所述的多核苷酸,其中该铰链区包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列。
67. 如权利要求62所述的多核苷酸,其中该铰链区包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列。
68. 如权利要求62所述的多核苷酸,其中该铰链区由SEQ ID NO:34的核酸序列编码。
69. 如权利要求62所述的多核苷酸,其中该铰链区包含 β -肾上腺素能受体的一部分。
70. 如权利要求69所述的多核苷酸,其中该铰链区由SEQ ID NO:40的核酸序列编码。
71. 如权利要求69所述的多核苷酸,其中该铰链区由SEQ ID NO:42的核酸序列编码。
72. 如权利要求35-71中任一项所述的多核苷酸,其中该胞外受体结构域还包含CD8a信号肽,其中该信号肽包含SEQ ID NO.4的核酸序列。
73. 如权利要求35-72中任一项所述的多核苷酸,其中该效应子结构域包含一个或多个半-ITAM序列。
74. 如权利要求72所述的多核苷酸,其中该半-ITAM包含SEQ ID NO.14的氨基酸序列。
75. 如权利要求72所述的多核苷酸,其中该半-ITAM包含SEQ ID NO.37的氨基酸序列。
76. 如权利要求35-75中任一项所述的多核苷酸,其中该效应子结构域包含一个或多个ITSM序列。
77. 如权利要求76所述的多核苷酸,其中该ITSM包含SEQ ID NO.15的氨基酸序列。
78. 如权利要求76所述的多核苷酸,其中该ITSM包含SEQ ID NO.35的氨基酸序列。
79. 如权利要求76所述的多核苷酸,其中该效应子结构域包含2B4结构域。
80. 如权利要求35所述的多核苷酸,其中该嵌合受体包含与GS3接头偶联的NKG2D片段、CD8a铰链、CD16跨膜/胞内结构域和4-1BB。
81. 如权利要求80所述的多核苷酸,其中该嵌合受体由SEQ ID NO:43的核酸序列编码。
82. 如权利要求35所述的多核苷酸,其中该嵌合受体包含与GS3接头偶联的NKG2D片段、CD16跨膜/胞内结构域和4-1BB。
83. 如权利要求82所述的多核苷酸,其中该嵌合受体由SEQ ID NO:44的核酸序列编码。
84. 如权利要求35所述的多核苷酸,其中该嵌合受体包含与CD16跨膜/胞内结构域偶联的NKG2D片段和4-1BB。
85. 如权利要求84所述的多核苷酸,其中该嵌合受体由SEQ ID NO:45的核酸序列编码。
86. 如权利要求35所述的多核苷酸,其中该嵌合受体包含与CD8a铰链偶联的NKG2D片段、CD8a跨膜结构域、4-1BB和2B4。
87. 如权利要求86所述的多核苷酸,其中该嵌合受体由SEQ ID NO:46的核酸序列编码。
88. 如权利要求35所述的多核苷酸,其中该嵌合受体包含与 β -肾上腺素能胞外结构域偶联的NKG2D片段、 β -肾上腺素能跨膜结构域、4-1BB和2B4。
89. 如权利要求88所述的多核苷酸,其中该嵌合受体由SEQ ID NO:47的核酸序列编码。
90. 如权利要求35所述的多核苷酸,其中该嵌合受体包含与CD8a铰链偶联的NKG2D片段、CD8a跨膜结构域、4-1BB、2B4、GS3接头和NKp80。
91. 如权利要求90所述的多核苷酸,其中该嵌合受体由SEQ ID NO:48的核酸序列编码。
92. 如权利要求35所述的多核苷酸,其中该嵌合受体包含与CD8a铰链偶联的NKG2D片段、CD8a跨膜结构域、4-1BB、GS3接头和NKp80。
93. 如权利要求92所述的多核苷酸,其中该嵌合受体由SEQ ID NO:49的核酸序列编码。

94. 如权利要求35所述的多核苷酸,其中该嵌合受体包含经密码子优化的与GS3接头偶联的NKG2D片段、另外的NKG2D片段、 β -肾上腺素能胞外结构域、 β -肾上腺素能跨膜结构域、4-1BB、另外的GS3接头和NKp80。

95. 如权利要求94所述的多核苷酸,其中该嵌合受体由SEQ ID NO:50的核酸序列编码。

96. 如权利要求35所述的多核苷酸,其中该嵌合受体包含经密码子优化的与GS3接头偶联的NKG2D片段、另外的NKG2D片段、CD8a铰链、CD8a跨膜结构域、4-1BB、另外的GS3接头和NKp80。

97. 如权利要求96所述的多核苷酸,其中该嵌合受体由SEQ ID NO:51的核酸序列编码。

98. 如权利要求35所述的多核苷酸,其中该嵌合受体包含经密码子优化的与GS3接头偶联的NKG2D片段、另外的NKG2D片段、cd8a铰链、CD16跨膜/胞内结构域和4-1BB。

99. 如权利要求98所述的多核苷酸,其中该嵌合受体由SEQ ID NO:52的核酸序列编码。

100. 如权利要求35所述的多核苷酸,其中该嵌合受体包含与CD8a铰链偶联的NKG2D片段、CD16跨膜/胞内结构域、4-1BB和2B4。

101. 如权利要求100所述的多核苷酸,其中该嵌合受体由SEQ ID NO:53的核酸序列编码。

102. 如权利要求35所述的多核苷酸,其中该嵌合受体包含与CD8a铰链偶联的NKG2D片段、CD16跨膜/胞内结构域、4-1BB、GS3接头和NKp80。

103. 如权利要求102所述的多核苷酸,其中该嵌合受体由SEQ ID NO:54的核酸序列编码。

104. 如权利要求35-103中任一项所述的多核苷酸,其中该嵌合受体不包含DNAX活化蛋白10(DAP10)。

105. 如权利要求35-55和60-104中任一项所述的多核苷酸,其中该嵌合受体不包含ITAM基序。

106. 一种编码嵌合受体的多核苷酸,该嵌合受体包含:

(a) 胞外受体结构域,其中所述胞外受体结构域包含与自然杀伤组2成员D(NKG2D)的天然配体结合的肽,其中与NKG2D的天然配体结合的该肽是NKG2D片段,

(b) 跨膜区,其中所述跨膜区包含CD8a,以及

(c) 效应子结构域,其中所述效应子结构域包含4-1BB和CD3 ζ ,

其中该多核苷酸与另外的编码膜结合白细胞介素15(mbIL15)的构建体共表达。

107. 一种编码嵌合受体的多核苷酸,该嵌合受体包含:

(a) 胞外受体结构域,其中所述胞外受体结构域包含与自然杀伤组2成员D(NKG2D)的天然配体结合的肽,其中与NKG2D的天然配体结合的该肽是NKG2D片段,

(b) 跨膜区,其中所述跨膜区包含CD8a,以及

(c) 效应子结构域,其中所述效应子结构域包含4-1BB,和2B4或DAP10的胞内结构域。

108. 如权利要求106或107中任一项所述的多核苷酸,其中该多核苷酸与另外的编码膜结合白细胞介素15(mbIL15)的构建体共表达。

109. 一种编码嵌合受体的多核苷酸,该嵌合受体包含:

(a) 胞外受体结构域,其中所述胞外受体结构域包含与自然杀伤组2成员D(NKG2D)的天然配体结合的肽,其中与NKG2D的天然配体结合的该肽是NKG2D片段,其中该NKG2D片段由多

核苷酸编码,该多核苷酸包含:(i) SEQ ID NO:1的序列的片段、(ii) SEQ ID NO.2的序列、(iii) SEQ ID NO.3的序列或(iv) SEQ ID NO.68的序列,

(b) 跨膜区,其中所述跨膜区包含CD3 ζ 跨膜区,以及

(c) 效应子结构域。

110. 如权利要求109所述的多核苷酸,其中该多核苷酸与膜结合白细胞介素15(mbIL15)共表达。

111. 一种编码嵌合受体的多核苷酸,该嵌合受体包含:

(a) 胞外受体结构域,

其中所述胞外受体结构域包含与自然杀伤组2成员D(NKG2D)的天然配体结合的肽,

其中与NKG2D的天然配体结合的该肽是NKG2D片段,

其中该NKG2D片段由多核苷酸编码,该多核苷酸包含:(i) SEQ ID NO:1的序列的片段、(ii) SEQ ID NO.2的序列、(iii) SEQ ID NO.3的序列或(iv) SEQ ID NO.68的序列;以及

(b) 包含跨膜区和胞内信号传导结构域的效应子结构域。

112. 如权利要求35-111中任一项所述的多核苷酸,其中该多核苷酸与至少一个用于表达该嵌合受体的调节元件可操作地连接。

113. 一种载体,其包含如权利要求35-112中任一项所述的多核苷酸,其中该多核苷酸与至少一个用于表达该嵌合受体的调节元件可操作地连接。

114. 如权利要求113所述的载体,其中该载体是逆转录病毒。

115. 一种基因工程改造的自然杀伤细胞,其包含如权利要求35-112中任一项所述的多核苷酸。

116. 如权利要求115所述的分离的基因工程改造的自然杀伤细胞,其是从患者分离的自体细胞。

117. 如权利要求115所述的分离的基因工程改造的自然杀伤细胞,其是从供体分离的同种异体细胞。

118. 一种增强有需要的哺乳动物中NK细胞细胞毒性的方法,所述方法包括向所述哺乳动物给予NK细胞,其中所述NK细胞表达由如权利要求35-112中任一项所述的多核苷酸编码的嵌合受体。

119. 如权利要求118所述的方法,其中所述NK细胞是从患者分离的自体细胞。

120. 如权利要求118所述的方法,其中所述NK细胞是从供体分离的同种异体细胞。

121. 一种治疗或预防有需要的哺乳动物中癌症或传染病的方法,所述方法包括向所述哺乳动物给予治疗有效量的NK细胞,其中所述NK细胞表达由如权利要求35-112中任一项所述的多核苷酸编码的嵌合受体。

122. 如权利要求121所述的方法,其中所述NK细胞是从患有癌症或传染病的患者分离的自体细胞。

123. 如权利要求121所述的方法,其中所述NK细胞是从供体分离的同种异体细胞。

124. 如权利要求35-112中任一项所述的多核苷酸在制备用于增强有需要的哺乳动物中NK细胞细胞毒性的药物中的用途。

125. 如权利要求35-112中任一项所述的多核苷酸在制备用于治疗或预防有需要的哺乳动物中的癌症或传染病的药物中的用途。

126. 如权利要求114或115所述的载体在制备用于增强有需要的哺乳动物中NK细胞细胞毒性的药物中的用途。

127. 如权利要求114或115所述的载体在制备用于治疗或预防有需要的哺乳动物中癌症或传染病的药物中的用途。

128. 如权利要求115-117中任一项所述的分离的基因工程改造的自然杀伤细胞用于增强有需要的哺乳动物中NK细胞细胞毒性的用途。

129. 如权利要求116-117中任一项所述的分离的基因工程改造的自然杀伤细胞用于治疗或预防有需要的哺乳动物中癌症或传染病的用途。

130. 一种编码嵌合受体的多核苷酸, 该嵌合受体包含:

(a) 胞外受体结构域,

其中所述胞外受体结构域包含与自然杀伤组2成员D (NKG2D) 的天然配体结合的肽,

其中与NKG2D的天然配体结合的该肽是NKG2D片段,

其中该NKG2D片段由多核苷酸编码, 该多核苷酸包含: (i) SEQ ID NO:1的片段, (ii) SEQ ID NO.2, (iii) SEQ ID NO.3; 或 (iv) SEQ ID NO.68; 以及

(b) 包含跨膜区和胞内信号传导结构域的效应子结构域。

131. 一种转基因细胞, 其包含:

a) 包含嵌合受体的免疫细胞, 该嵌合受体包含:

(i) 包含与自然杀伤组2成员D (NKG2D) 的天然配体结合的肽的胞外受体结构域, 其中与NKG2D的天然配体结合的该肽是NKG2D片段; 以及

(ii) 包含跨膜区和胞内信号传导结构域的效应子结构域, 其中该胞内信号传导结构域包含CD3 ζ ;

b) 膜结合白细胞介素15 (mbIL15)。

132. 一种治疗癌症的方法, 该方法包括向患有癌症的受试者给予组合物, 该组合物包含表达以下的自然杀伤 (NK) 细胞:

a) 包含嵌合受体的免疫细胞, 该嵌合受体包含:

(i) 包含与自然杀伤组2成员D (NKG2D) 的天然配体结合的肽的胞外受体结构域, 其中与NKG2D的天然配体结合的该肽是NKG2D片段; 以及

(ii) 包含跨膜区和胞内信号传导结构域的效应子结构域, 其中该胞内信号传导结构域包含CD3 ζ ;

b) 膜结合白细胞介素15 (mbIL15)。

截短的NKG2D嵌合受体及其在自然杀伤细胞免疫疗法中的用途

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2017年3月27日提交的美国临时申请号62/477,335以及于2018年2月9日提交的美国临时申请号62/628,774的权益。将以上列出的每个申请的全部内容通过引用结合在此。

[0003] ASCII文本文件中的材料通过引用结合在此。

[0004] 本申请将包含在以下ASCII文本文件中的序列列表通过引用结合,该序列列表在此同时提交:

[0005] a) 文件名称:44591144002SequenceListing.txt;2018年3月27日创建,186KB大小。

背景技术

[0006] 许多疾病的出现和持续存在的特征是对异常细胞(包括恶性的和病毒感染的细胞)的免疫应答不足。免疫疗法是使用和操纵患者的免疫系统来治疗各种疾病。

发明内容

[0007] 免疫疗法在疾病的治疗中呈现出新的技术进步,其中免疫细胞被工程改造以表达特定的靶向和/或效应分子,其特异性识别患病的或受损的细胞并与之反应。这代表了有希望的进步,至少部分是由于针对特异性靶向患病的或受损的细胞的潜力,这与更传统的方法(例如化学治疗)相反,所述更传统的方法中所有细胞都受到影响,而期望的结果是足够的健康细胞存活以容许患者生存。一种免疫疗法是在免疫细胞中重组表达嵌合受体,以实现靶向识别和破坏目标异常细胞。

[0008] 为了解决针对特异性靶向和破坏患病的或感染的细胞、使其失效或以其他方式致其惰性的这种需要,本文提供了编码嵌合受体的多核苷酸、氨基酸和载体,这些嵌合受体赋予细胞(例如自然杀伤细胞)增强的靶向和细胞毒性。还提供了用于产生这些细胞的方法,以及使用这些细胞靶向和破坏患病的或受损的细胞的方法。在若干实施例中,提供了编码嵌合受体的多核苷酸,该嵌合受体包含胞外受体结构域和含有跨膜区和胞内信号传导结构域的效应子结构域,其中该胞外受体结构域包含与自然杀伤组2成员D(NKG2D)的天然配体结合的肽,其中与NKG2D天然配体结合的肽是NKG2D片段。

[0009] 在若干实施例中,提供了编码嵌合受体的多核苷酸,该嵌合受体包含以下一种或两种:(a)胞外受体结构域和(b)包含跨膜区和胞内信号传导结构域的效应子结构域。在若干实施例中,胞外受体结构域包含与自然杀伤组2成员D(NKG2D)的天然配体结合的肽。在若干实施例中,与NKG2D的天然配体结合的肽是NKG2D片段,例如,NKG2D片段由包含SEQ ID NO.2的多核苷酸编码。如本文所披露的,取决于实施例,还使用了另外的NKG2D片段。在若干实施例中,胞内信号传导结构域包含CD3 ζ 。在一个实施例中,CD3 ζ 由包含SEQ ID NO.13的多核苷酸编码,但是,如本文所披露的,取决于实施例,还可以使用与CD3 ζ 不同但具有相似功

能的序列。

[0010] 在若干实施例中,效应子结构域的跨膜区包含CD8a跨膜结构域。在一个实施例中,效应子结构域的跨膜区还包含CD8a铰链区。在若干实施例中,CD8a铰链区由包含SEQ ID NO:5的多核苷酸编码。在若干实施例中,胞内信号传导结构域还包含4-1BB。在一个实施例中,4-1BB由包含SEQ ID NO:12的多核苷酸编码,但是,如本文所披露的,取决于实施例,还可以使用与4-1BB不同但具有相似功能的序列。

[0011] 在若干实施例中,嵌合受体包含与CD8a偶联的NKG2D片段、4-1BB和CD3 ζ 。在若干实施例中,这种嵌合受体由SEQ ID NO:18的核酸序列编码。在另外的实施例中,嵌合受体由SEQ ID NO:108的核酸序列编码,但是,如本文所披露的,取决于实施例,也可以使用与SEQ ID NO:108不同但具有相似功能的序列。在若干实施例中,该嵌合受体包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列。

[0012] 在若干实施例中,本文披露的任一嵌合受体也可与膜结合白细胞介素15(mbIL15)共表达。在一些实施例中,mbIL15由包含SEQ ID NO:16的多核苷酸编码。在一些实施例中,mbIL15包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列。取决于实施例,也可以使用mbIL15的其他序列。在一些实施例中,mbIL15在与嵌合受体相同的多核苷酸上双顺反子表达。在其他实施例中,mbIL15在单独的构建体上共表达。在若干实施例中,通过将胞内信号传导结构域的表达与膜结合白细胞介素15(mbIL15)的表达偶联,进一步使胞内信号传导结构域增强。

[0013] 在若干实施例中,效应子结构域还包含OX-40结构域。在若干实施例中,OX-40结构域代替mbIL15或者是除了mbIL15之外另有的。在若干实施例中,嵌合受体包含与CD8a铰链偶联的NKG2D片段、CD8a跨膜结构域、OX-40结构域和CD3 ζ 。在一些实施例中,将多核苷酸构建体配置为双顺反子地共表达mbIL15。在一些此类实施例中,多核苷酸构建体包含由例如细胞基质蛋白酶识别和切割的一个或多个切割位点(例如,T2A、P2A、E2A和/或F2A切割位点)。在一些实施例中,mbIL15通过细胞基质蛋白酶切割位点与嵌合受体偶联。在一些实施例中,嵌合受体由SEQ ID NO:90的核酸序列编码,所述核酸序列通过细胞基质蛋白酶切割位点与SEQ ID NO:16编码的mbIL15偶联。在一些实施例中,嵌合受体由SEQ ID NO:109的核酸序列编码,所述核酸序列通过细胞基质蛋白酶切割位点与SEQ ID NO:16编码的mbIL15偶联。在若干实施例中,嵌合受体包含SEQ ID NO:91的氨基酸序列,并与包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列的mbIL15共表达。如本文所公开的,取决于实施例,也可以使用与SEQ ID NO:90、91、109、16和/或16不同但具有相似功能的序列。

[0014] 在若干实施例中,嵌合受体包含与IgG4铰链偶联的NKG2D片段、CD8a跨膜结构域、OX-40结构域和CD3 ζ 。在一些实施例中,将多核苷酸构建体配置为与嵌合受体双顺反子地共表达mbIL15。在一些此类实施例中,多核苷酸构建体包含由细胞基质蛋白酶识别和切割的一个或多个切割位点(例如,T2A、P2A、E2A和/或F2A切割位点)。在一些实施例中,mbIL15通过细胞基质蛋白酶切割位点与嵌合受体偶联。在一些实施例中,嵌合受体由SEQ ID NO:100的核酸序列编码,所述核酸序列通过细胞基质蛋白酶切割位点与SEQ ID NO:16编码的mbIL15偶联。在若干实施例中,嵌合受体包含SEQ ID NO:101的氨基酸序列,并与包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列的mbIL15共表达。如本文所公开的,取决于实施例,也可以使用与SEQ ID NO:100、101和/或16不同但具有相似功能的序列。

[0015] 在若干实施例中,提供了用于治疗癌症的方法,该方法包括向患有癌症的受试者

给予组合物,该组合物包含自然杀伤(NK)细胞,该自然杀伤细胞表达由以上或或本文其他地方所述的多核苷酸编码的嵌合受体。

[0016] 在一个实施例中,NK细胞是从患有癌症或传染病的患者中分离的自体细胞。在另外的实施例中,NK细胞是从供体分离的同种异体细胞。

[0017] 本文还提供了如以上或本文其他地方所述的多核苷酸在制备用于增强有需要的哺乳动物中NK细胞的细胞毒性的药物中的用途。在若干实施例中,提供了如以上或本文其他地方所述的多核苷酸在制备药物中的用途,该药物用于治疗或预防有需要的哺乳动物的癌症或传染病。

[0018] 根据若干实施例,提供了编码嵌合受体的多核苷酸,该嵌合受体包含胞外受体结构域、包含跨膜区和胞内信号传导结构域的效应子结构域。如本文更详细讨论的,胞外受体结构域用于识别和结合靶细胞上的配体。效应子结构域用于传递信号(在由胞外结构域结合靶细胞后),所述信号使信号级联运作,该导致针对靶细胞的细胞毒活性。根据若干实施例,多核苷酸编码嵌合受体,与非工程改造的NK细胞相比,该嵌合受体提供了出人意料地增强的细胞毒性。

[0019] 在若干实施例中,胞外受体结构域包含与自然杀伤组2成员D(NKG2D)的天然配体结合的肽。根据若干实施例,与NKG2D的天然配体结合的肽是NKG2D的功能片段(例如,全长NKG2D的截短、片段或部分)。如本文所用,术语“片段”、“截短”和“部分”应给出它们的普遍含义,并且也应可彼此互换。例如,在若干实施例中,NKG2D片段由包含SEQ ID NO:1序列的片段的多核苷酸编码。在若干实施例中,NKG2D片段包含SEQ ID NO:2的序列,而在另外的实施例中,编码NKG2D的片段是经密码子优化的,并且包含例如SEQ ID NO:3的序列。在另外的实施例中,编码NKG2D的片段是经密码子优化的,并且包含例如SEQ ID NO:68的序列。

[0020] 在若干实施例中,效应子结构域包含CD16、NCR1、NCR2、NCR3、4-1BB、NKp80、CD3 ζ 和2B4中的一个或多个。在若干实施例中,这些效应子结构域与CD8 α 偶联。

[0021] 在若干实施例中,嵌合受体包含与CD16偶联的NKG2D片段。如本文所用,偶联应给出其普遍含义,并且还指核苷酸序列的直接(例如,第一核苷酸接着直接是第二核苷酸)或间接(例如,序列彼此在读框内但通过插入的核苷酸分开)连接,所述连接以一种容许在例如体外转录/翻译系统、宿主细胞(例如,体外和/或体内)中表达核苷酸序列的方式。如本文所用,“连接”和“偶联”可互换使用。在若干实施例中,NKG2D/CD16嵌合受体由SEQ ID NO:23的核酸序列编码。在若干实施例中,NKG2D/CD16嵌合受体包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列。在若干实施例中,嵌合受体包含与NCR1偶联的NKG2D片段。在若干实施例中,这种嵌合受体由SEQ ID NO.27的核酸序列编码。在若干实施例中,嵌合受体包含SEQ ID NO.28的氨基酸序列。

[0022] 如上文所讨论的,在若干实施例中,NKG2D片段与NCR2偶联,并且所得嵌合受体包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列的至少一部分。若干实施例提供嵌合受体,其包含与NCR3偶联的NKG2D片段。在若干实施例中,嵌合受体由SEQ ID NO.29的核酸序列编码,并且嵌合受体包含SEQ ID NO.30的氨基酸序列。

[0023] 如下文更详细讨论的,将跨膜结构域和胞内结构域的组合用于若干实施例中,其提供嵌合受体组分之间的协同相互作用并产生增强的细胞毒性作用。在若干实施例中,嵌合受体包含与CD16跨膜/胞内结构域偶联的NKG2D片段和4-1BB。在若干实施例中,嵌合受体

包含与CD8a铰链偶联的NKG2D片段、CD16跨膜/胞内结构域和4-1BB。在若干实施例中,这种嵌合受体由SEQ ID NO:25的核酸序列编码。在若干实施例中,所得嵌合受体包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列。

[0024] 在若干实施例中,将NCR1与NKG2D片段结合使用。在若干实施例中,NKG2D片段仅与NCR1连接。在另外的实施例中,嵌合受体包含与NCR1偶联的NKG2D片段和4-1BB。在一些这样的实施例中,嵌合受体包含SEQ ID NO:20的NCR1氨基酸序列。

[0025] 在若干实施例中,嵌合受体包含与CD8a偶联的NKG2D片段、4-1BB和CD3 ζ 。在若干实施例中,这种NKG2D/CD8a/4-1bb/CD3 ζ 嵌合受体由SEQ ID NO.18的核酸序列编码。在若干实施例中,该嵌合受体包含SEQ ID NO.19的氨基酸序列。

[0026] 在若干实施例中,NCR3包含在嵌合受体中。例如,在若干实施例中提供了NKG2D/NCR3构建体。由此所得的嵌合受体包含SEQ ID NO:22的NCR3氨基酸序列。在若干实施例中,嵌合受体包含NKG2D/NCR2/4-1BB构建体或NKG2D/NCR3/4-1BB构建体。

[0027] 在若干实施例中,在嵌合受体构建体中提供了接头、铰链或其他“间隔”元件。例如,在若干实施例中,效应子结构域包含接头。在若干实施例中,多核苷酸编码构建体的各部分之间(例如在4-1BB、CD16、NCR1、NCR3、2B4或NKp80中的任意两个之间)的GS接头。在若干实施例中,提供一个或多个GS接头,例如,1、2、3、4、5、6或更多个。在若干实施例中,提供了包含铰链区的嵌合受体。根据在特定构建体内的位置,铰链区可以与接头区同义,反之亦然。在若干实施例中,铰链区由SEQ ID NO:5的核酸序列编码。在一些实施例中,可以将铰链区截短至所需长度,因此其由SEQ ID NO:5的核酸序列的片段编码。在若干实施例中,使用甘氨酸-丝氨酸基序作为铰链。在若干实施例中,铰链区包含甘氨酸-丝氨酸重复基序,其具有(GGGGS)_n(SEQ ID NO:31)的氨基酸序列,其中n是重复数。在若干实施例中,使用9个重复,产生包含SEQ ID NO:33氨基酸序列的铰链区。在若干实施例中,使用3个重复,产生包含SEQ ID NO:34氨基酸序列的铰链区。

[0028] 在若干实施例中,可以使用两个单独的分子作为铰链或接头,例如SEQ ID NO:32的氨基酸序列(CD8a/GS3)。在若干实施例中,使用 β 肾上腺素能受体的部分作为铰链或接头。在若干实施例中,使用 β -2肾上腺素能受体的部分。在一个实施例中,使用 β -2肾上腺素能受体的胞外结构域,其由SEQ ID NO:40的核酸序列编码。在一些实施例中,使用 β -2肾上腺素能受体的第一跨膜螺旋,其由SEQ ID NO:42的核酸序列编码。根据实施例,在嵌合受体中将这两个 β -2肾上腺素能受体的部分一起使用。在若干实施例中,胞外受体结构域还包含CD8a信号肽,其中信号肽包含SEQ ID NO.4的核酸序列。取决于实施例,任选地使用其他信号肽。根据一些实施例,可以以多聚体形式使用信号肽。

[0029] 在若干实施例中,效应子结构域包含一个或多个半-ITAM序列。在一些这样的实施例中,半-ITAM包含氨基酸基序DGYXXL(其中X是任何氨基酸;SEQ ID NO:14)。在一些实施例中,使用多个半-ITAM。在若干实施例中,半-ITAM包含NKp80。在若干实施例中,效应子结构域包含一个或多个ITSM序列。在若干实施例中,将ITSM序列与半-ITAM基序结合使用。在若干实施例中,ITSM包含氨基酸基序S/TXYXXL/I(其中X是任何氨基酸;SEQ ID NO.15)。在若干实施例中,效应子包含2B4结构域。

[0030] 在若干实施例中,嵌合受体包含与GS3接头偶联的NKG2D片段、CD8a铰链、CD16跨膜/胞内结构域和4-1BB。在若干实施例中,嵌合受体包含与GS3接头偶联的NKG2D片段、CD16

跨膜/胞内结构域和4-1BB。在若干实施例中,嵌合受体包含与CD16跨膜/胞内结构域偶联的NKG2D片段和4-1BB。在若干实施例中,嵌合受体包含与CD8a铰链偶联的NKG2D片段、CD8a跨膜结构域、4-1BB和2B4。在若干实施例中,嵌合受体包含与 β -肾上腺素能胞外结构域偶联的NKG2D片段、 β -肾上腺素能跨膜结构域、4-1BB和2B4。在若干实施例中,嵌合受体包含与CD8a铰链偶联的NKG2D片段、CD8a跨膜结构域、4-1BB、2B4、GS3接头和NKp80。在若干实施例中,嵌合受体包含与CD8a铰链偶联的NKG2D片段、CD8a跨膜结构域、4-1BB、GS3接头和NKp80。在若干实施例中,嵌合受体包含与GS3接头偶联NKG2D片段(其中该片段由经密码子优化的序列编码)、另外的NKG2D片段、 β -肾上腺素能胞外结构域、 β -肾上腺素能跨膜结构域、4-1BB、另外的GS3接头和NKp80。在若干实施例中,嵌合受体包含与GS3接头偶联的NKG2D片段(其经密码子优化)、另外的NKG2D片段、CD8a铰链、CD8a跨膜结构域、4-1BB、另外的GS3接头和NKp80。在若干实施例中,嵌合受体包含经密码子优化的与GS3接头偶联的NKG2D片段、另外的NKG2D片段、CD8a铰链、CD16跨膜/胞内结构域和4-1BB。在若干实施例中,嵌合受体包含与CD8a铰链偶联的NKG2D片段、CD16跨膜/胞内结构域、4-1BB和2B4。在若干实施例中,嵌合受体包含与CD8a铰链偶联的NKG2D片段、CD16跨膜/胞内结构域、4-1BB、GS3接头和NKp80。在若干实施例中,嵌合受体包含与CD8a铰链偶联的NKG2D片段和CD8a跨膜结构域。在若干实施例中,效应子包含4-1BB。在一些这样的实施例中,效应子包含任选地与NKp80、2B4、CD3 ζ 、Dap10、Dap12、CD28或本文提供的其他信号传导结构域中的一个或多个结合的4-1BB。在若干实施例中,效应子结构域还包含CD3 ζ 。在若干实施例中,效应子结构域包含2B4的胞内结构域。在若干实施例中,效应子结构域还包含DAP10的胞内结构域。

[0031] 在若干实施例中,嵌合受体包含与CD8a铰链偶联的NKG2D片段、CD8a跨膜结构域、4-1BB、2B4和CD3 ζ 。在若干实施例中,嵌合受体由SEQ ID NO:58的核酸序列编码。在若干实施例中,嵌合受体包含SEQ ID NO.59的氨基酸序列。

[0032] 另外,本文披露的任一嵌合受体也可与膜结合白细胞介素15(mbIL15)共表达。例如,在若干实施例中提供了编码包含胞外受体结构域的嵌合受体的多核苷酸,其中该胞外受体结构域包含与NKG2D的天然配体结合的肽,其中与NKG2D天然配体结合的肽是NKG2D片段、跨膜区、效应子结构域,该多核苷酸与另外的编码膜结合白细胞介素15(mbIL15)的构建体共表达。在若干实施例中,如本文所讨论的嵌合受体与mbIL-15共表达。在若干实施例中,效应子结构域包含4-1BB和CD3 ζ ,并且跨膜区包含CD8a。

[0033] 在若干实施例中,对嵌合受体进行工程改造使得它们不包含DNAX活化蛋白10(DAP10)。另外,在若干实施例中,对嵌合受体进行工程改造使得它们不包含ITAM基序。

[0034] 在若干实施例中,提供了编码嵌合受体的多核苷酸,该嵌合受体包含以下一种、两种或全部:(a)胞外受体结构域,其包含与NKG2D的天然配体结合的NKG2D片段,(b)跨膜区,其中该跨膜区包含CD8a,和(c)效应子结构域,其中该效应子结构域包含4-1BB和2B4或DAP10的胞内结构域。在若干实施例中,效应子结构域包含2B4,其后是4-1BB。在另外的实施例中,效应子结构域包含4-1BB,其后是2B4。在若干实施例中,效应子结构域包含DAP10,其后是4-1BB。在另外的实施例中,效应子结构域包含4-1BB,其后是DAP10。在若干实施例中,嵌合受体包含与CD8a铰链偶联的NKG2D片段、CD8a跨膜结构域、4-1BB和DAP10。在若干实施例中,嵌合受体由SEQ ID NO:60的核酸序列编码。在若干实施例中,嵌合受体包含SEQ ID NO.61的氨基酸序列。在若干实施例中,嵌合受体包含与CD8a铰链偶联的NKG2D片段、CD8a跨

膜结构域、4-1BB、2B4和DAP10。在若干实施例中，效应子结构域包含4-1BB，其后是DAP10，之后是2B4。在若干实施例中，嵌合受体由SEQ ID NO:62的核酸序列编码。在若干实施例中，嵌合受体包含SEQ ID NO.63的氨基酸序列。在若干实施例中，效应子结构域包含4-1BB，其后是2B4，之后是DAP10。在若干实施例中，嵌合受体由SEQ ID NO:64的核酸序列编码。在若干实施例中，嵌合受体包含SEQ ID NO.65的氨基酸序列。

[0035] 在若干实施例中，嵌合受体包含经密码子优化的与胞内效应子结构域偶联的NKG2D片段。在若干实施例中，使用了NKG2D的多个片段，例如，另外的NKG2D片段(任选地经密码子优化)通过例如GS3接头与第一片段偶联。在若干实施例中，此类嵌合受体还包含CD8a铰链、CD8a跨膜结构域、4-1BB和CD3 ζ 。在若干实施例中，嵌合受体由SEQ ID NO:66的核酸序列编码。在若干实施例中，嵌合受体包含SEQ ID NO.67的氨基酸序列。在若干实施例中，多核苷酸与另外的编码膜结合白细胞介素15 (mbIL15) 的构建体共表达。

[0036] 在若干实施例中，提供了编码嵌合受体的多核苷酸，该嵌合受体包含胞外受体结构域(其包含结合NKG2D天然配体的NKG2D片段并且由SEQ ID NO:1的片段编码)、包含CD3 ζ 跨膜区的跨膜区、和效应子结构域。在若干实施例中，提供了编码嵌合受体的多核苷酸，该嵌合受体包含胞外受体结构域(其包含结合NKG2D天然配体的NKG2D片段并且由SEQ ID NO:2编码)、包含CD3 ζ 跨膜区的跨膜区、和效应子结构域。在若干实施例中，提供了编码嵌合受体的多核苷酸，该嵌合受体包含胞外受体结构域(其包含结合NKG2D天然配体的NKG2D片段并且由SEQ ID NO:3编码)、包含CD3 ζ 跨膜区的跨膜区、和效应子结构域。在若干实施例中，提供了编码嵌合受体的多核苷酸，该嵌合受体包含胞外受体结构域(其包含结合NKG2D天然配体的NKG2D片段并且由SEQ ID NO:68编码)、包含CD3 ζ 跨膜区的跨膜区、和效应子结构域。在若干实施例中，使用了由SEQ ID NO.2、3或68中的任一个编码的NKG2D片段。在若干实施例中，CD3 ζ 跨膜区包含SEQ ID NO:69的氨基酸序列。也使用了SEQ ID NO:69序列的片段，在若干实施例中，所述片段保留转导至少约65%、约75%、约85%或约95%的天然CD3 ζ 亚基(包括二聚体)信号转导的能力。在若干实施例中，胞外受体结构域还包含与CD3 ζ 跨膜区相邻的另外的残基。在若干实施例中，另外的氨基酸是天然CD3 ζ 序列的胞外残基。在其他实施例中，随机地选择所述另外的氨基酸。在若干实施例中，存在2、3、4、5、6、8、10、15或20个另外的氨基酸。在若干实施例中，嵌合受体结构域包含铰链区，在若干实施例中，该铰链区是由SEQ ID NO:5的核酸序列编码的CD8a铰链。在若干实施例中，铰链区是由SEQ ID NO:5的核酸序列的片段编码的CD8a铰链。根据实施例，该片段是SEQ ID NO:5的核酸序列长度的约75%、约80%、约85%、约90%、约95%。根据实施例，该片段与SEQ ID NO:5的核酸序列至少约75%、约80%、约85%、约90%、约95%、约98%或约99%同源。在若干实施例中，胞外受体结构域还包含CD8a信号肽，取决于实施例，该CD8a信号肽可包含SEQ ID NO.4的核酸序列。在若干实施例中，效应子结构域包含4-1BB。在若干实施例中，效应子结构域包含CD16胞内结构域。在若干实施例中，效应子结构域包含4-1BB和CD16(在构建体中任一部分作为“第一”相比于“第二”)。在若干实施例中，使用4-1BB和/或CD16的一个或多个的重复。

[0037] 在若干实施例中，嵌合受体包含经密码子优化并与CD8a铰链偶联的NKG2D片段、CD3 ζ 跨膜区和包含4-1BB的效应子结构域。在若干实施例中，嵌合受体由SEQ ID NO:78的核酸序列编码。在若干实施例中，嵌合受体包含SEQ ID NO.79的氨基酸序列。

[0038] 在若干实施例中，嵌合受体包含经密码子优化的与CD8a铰链偶联的NKG2D片段、

CD3 ζ 跨膜区和效应子结构域(包含CD16,其后是4-1BB)。在若干实施例中,嵌合受体包含SEQ ID NO.71的氨基酸序列。在若干实施例中,嵌合受体由SEQ ID NO:70的核酸序列编码。

[0039] 在若干实施例中,嵌合受体包含经密码子优化并与CD8a铰链偶联的NKG2D片段、CD3 ζ 跨膜区、和效应子结构域(包含4-1BB,其后是任选地通过GS3接头偶联的CD16)。在若干实施例中,嵌合受体包含SEQ ID NO.85的氨基酸序列。在若干实施例中,嵌合受体由SEQ ID NO:84的核酸序列编码。

[0040] 在若干实施例中,嵌合受体包含经密码子优化并与GS3接头偶联的NKG2D片段、另外的NKG2D片段、CD8a铰链、CD3 ζ 跨膜区和包含CD16和4-1BB的效应子结构域。在若干实施例中,嵌合受体由SEQ ID NO:72的核酸序列编码。在若干实施例中,嵌合受体包含SEQ ID NO.73的氨基酸序列。

[0041] 在若干实施例中,效应子结构域包括NKp80。在若干实施例中,效应子结构域是NKp80。在若干实施例中,嵌合受体包含与CD8a铰链偶联的NKG2D片段、CD3 ζ 跨膜区和效应子结构域(包含CD16、4-1BB和NKp80,并任选地包括GS3接头)。在若干实施例中,嵌合受体由SEQ ID NO:74的核酸序列编码。在若干实施例中,嵌合受体包含SEQ ID NO.75的氨基酸序列。在若干实施例中,嵌合受体包含经密码子优化并与GS3接头偶联的NKG2D片段、另外的NKG2D片段(任选地经密码子优化)、CD8a铰链、CD3 ζ 跨膜区和效应子结构域(包含CD16、4-1BB和NKp80,并任选地包括GS3接头)。在若干实施例中,嵌合受体由SEQ ID NO:76的核酸序列编码。在若干实施例中,嵌合受体包含SEQ ID NO.77的氨基酸序列。在若干实施例中,嵌合受体包含经密码子优化并与CD8a铰链偶联的NKG2D片段、CD3 ζ 跨膜区和效应子结构域(包含4-1BB和NKp80,并且任选地包括GS3接头)。在若干实施例中,嵌合受体由SEQ ID NO:82的核酸序列编码。在若干实施例中,嵌合受体包含SEQ ID NO.83的氨基酸序列。

[0042] 在若干实施例中,效应子结构域包含CD3 ζ 。在若干实施例中,嵌合受体包含经密码子优化并与CD8a铰链偶联的NKG2D片段、CD3 ζ 跨膜区和包含4-1BB和CD3 ζ 的效应子结构域。在若干实施例中,嵌合受体由SEQ ID NO:80的核酸序列编码。在若干实施例中,嵌合受体包含SEQ ID NO.81的氨基酸序列。

[0043] 在若干实施例中,效应子结构域包含FcR γ 。在若干实施例中,嵌合受体包含与CD8a铰链偶联的NKG2D片段、CD3 ζ 跨膜区和包含4-1BB和FcR γ 的效应子结构域。在若干实施例中,嵌合受体由SEQ ID NO:86的核酸序列编码。在若干实施例中,嵌合受体包含SEQ ID NO.87的氨基酸序列。

[0044] 在若干实施例中,效应子结构域包含CD28。在若干实施例中,嵌合受体包含与CD8a铰链偶联的NKG2D片段、CD3 ζ 跨膜区和包含CD28和CD3 ζ 的效应子结构域。在若干实施例中,嵌合受体由SEQ ID NO:102的核酸序列编码。在若干实施例中,嵌合受体包含SEQ ID NO.103的氨基酸序列。

[0045] 在若干实施例中,效应子结构域包含GS接头。

[0046] 在若干实施例中,本文披露的多核苷酸与膜结合白细胞介素15(mbIL15)共表达。

[0047] 在若干实施例中,多核苷酸编码嵌合受体,该嵌合受体包含胞外受体结构域、包含跨膜区和胞内信号传导结构域的效应子结构域,所述胞外受体结构域包含NKG2D片段,其能够与NKG2D的天然配体结合,并由SEQ ID NO:1、SEQ ID NO.2、SEQ ID NO.3或SEQ ID NO.68中的任一序列的片段编码。在若干实施例中,提供了编码嵌合受体的多核苷酸,该嵌合受体

包含胞外受体结构域、包含跨膜区和胞内信号传导结构域的效应子结构域,所述胞外受体结构域包含NKG2D片段,其能够与NKG2D的天然配体结合,并由(i) SEQ ID NO:1的序列的片段、(ii) SEQ ID NO.2的序列、(iii) SEQ ID NO.3的序列或(iv) SEQ ID NO.68的序列编码。在若干实施例中,多核苷酸编码嵌合受体,该嵌合受体包含胞外受体结构域、包含跨膜区和胞内信号传导结构域的效应子结构域,所述胞外受体结构域包含NKG2D片段,其能够与NKG2D的天然配体结合,并由SEQ ID NO.2的序列编码。在若干实施例中,多核苷酸编码嵌合受体,该嵌合受体包含胞外受体结构域、包含跨膜区和胞内信号传导结构域的效应子结构域,所述胞外受体结构域包含NKG2D片段,其能够与NKG2D的天然配体结合,并由SEQ ID NO.3的序列编码。在若干实施例中,多核苷酸编码嵌合受体,该嵌合受体包含胞外受体结构域、包含跨膜区和胞内信号传导结构域的效应子结构域,所述胞外受体结构域包含NKG2D片段,其能够与NKG2D的天然配体结合,并由SEQ ID NO.68的序列的片段编码。在若干实施例中,胞外受体结构域包含铰链区。在若干实施例中,铰链区是由SEQ ID NO:5的核酸序列或任选地SEQ ID NO:5的核酸序列的片段(例如,与SEQ ID NO:5具有约75%、约85%、约95%的同源性的片段)编码的CD8a铰链。在若干实施例中,铰链区是由SEQ ID NO:104的核酸序列编码的免疫球蛋白G4 (IgG4) 铰链。在若干实施例中,铰链区是由SEQ ID NO:104的核酸序列的片段(例如,与SEQ ID NO:104具有约75%、约85%、约95%同源性的片段)编码的免疫球蛋白G4 (IgG4) 铰链。在若干实施例中,胞外受体结构域还包含CD8a信号肽,其中信号肽包含SEQ ID NO.4的核酸序列。在若干实施例中,效应子结构域包含至少一个选自以下组的信号传导结构域,该组由以下组成:OX40 (CD134)、CD3 ζ 、4-1BB、CD28和DAP12。在若干实施例中,嵌合受体跨膜结构域包含CD8跨膜结构域。在若干实施例中,嵌合受体包含与偶联于CD8a铰链的NKG2D片段连接(任选地通过GS3接头)的IL-15、CD8a跨膜结构域、4-1BB和CD3 ζ 。在若干实施例中,嵌合受体由SEQ ID NO:88的核酸序列编码。在若干实施例中,嵌合受体包含SEQ ID NO.89的氨基酸序列。

[0048] 在若干实施例中,嵌合受体包含与IgG4铰链偶联的NKG2D片段、CD8a跨膜结构域、4-1BB和CD3 ζ 。在若干实施例中,嵌合受体由SEQ ID NO:96的核酸序列编码。在若干实施例中,嵌合受体包含SEQ ID NO.97的氨基酸序列。

[0049] 在若干实施例中,效应子结构域包含OX40。在若干实施例中,嵌合受体包含与CD8a铰链偶联的NKG2D片段、CD8a跨膜结构域、OX40和CD3 ζ 。在若干实施例中,嵌合受体由SEQ ID NO:90的核酸序列编码。在若干实施例中,嵌合受体由SEQ ID NO:109的核酸序列编码。在若干实施例中,嵌合受体包含SEQ ID NO.91的氨基酸序列。在若干实施例中,嵌合受体包含与IgG4铰链偶联的NKG2D片段、CD8a跨膜结构域、OX40和CD3 ζ 。在若干实施例中,嵌合受体由SEQ ID NO:100的核酸序列编码。在若干实施例中,嵌合受体包含SEQ ID NO.101的氨基酸序列。

[0050] 在若干实施例中,嵌合受体包含CD28跨膜/胞内结构域。在若干实施例中,嵌合受体包含与CD8a铰链偶联的NKG2D片段、CD28跨膜/胞内结构域和CD3 ζ 。在若干实施例中,嵌合受体由SEQ ID NO:92的核酸序列编码。在若干实施例中,嵌合受体包含SEQ ID NO.93的氨基酸序列。

[0051] 在若干实施例中,嵌合受体包含与CD8a铰链偶联的NKG2D片段、CD28跨膜/胞内结构域、4-1BB和CD3 ζ 。在若干实施例中,嵌合受体由SEQ ID NO:94的核酸序列编码。在若干实

施例中,嵌合受体包含SEQ ID NO.95的氨基酸序列。

[0052] 在若干实施例中,嵌合受体包含与IgG4铰链偶联的NKG2D片段、CD28跨膜/胞内结构域和CD3 ζ 。在若干实施例中,嵌合受体由SEQ ID NO:98的核酸序列编码。在若干实施例中,嵌合受体包含SEQ ID NO.99的氨基酸序列。

[0053] 在若干实施例中,效应子结构域包含GS接头。在若干实施例中,本文披露的多核苷酸被配置为与膜结合白细胞介素15(mbIL15)共表达(在同一多核苷酸或另一多核苷酸上)。

[0054] 任何嵌合受体可任选地包括胞外受体结构域,其包含与NKG2D的天然配体结合的第二肽。在若干实施例中,第二肽与NKG2D是同源的,而在其他实施例中,第二肽相对于NKG2D是异源的。无论嵌合受体是否包含二聚化的胞外受体结构域,胞外受体结构域都能至少识别以下的NKG2D的天然配体:MICA、MICB、ULBP1、ULBP2、ULBP3、ULBP4、ULBP5或ULBP6。

[0055] 如下文更详细讨论的,在若干实施例中使用了NKG2D配体结合结构域的功能性变体。例如,在若干实施例中,与NKG2D的天然配体结合的肽与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:68具有至少80%的同源性。在若干实施例中,与NKG2D的天然配体结合的肽与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:68具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%的同源性。

[0056] 本文在若干实施例中另外提供的是用于表达嵌合受体的载体。在若干实施例中,本文提供的多核苷酸是mRNA,并且可包括与至少一种调节元件的可操作连接以表达嵌合受体。在若干实施例中,多核苷酸还包含一个或多个内部核糖体进入位点(IRES)。在若干实施例中,载体是逆转录病毒。

[0057] 在若干实施例中,还提供了工程改造的自然杀伤细胞,其表达本文披露的任何嵌合受体构建体,所述工程改造的NK细胞表现出针对靶细胞的增强的细胞毒性作用。增强的细胞毒性作用包括但不限于,与正常(例如,非癌)细胞相比对靶(例如,癌)细胞的更高亲和力、针对靶细胞的更大杀伤作用、降低的脱靶效应、增加的细胞毒性作用持续时间、更有效的细胞毒性等。可以通过使用各种体外细胞毒性测定(例如,细胞因子产生的测量等)、靶细胞死亡的测量、或通过各种临床结果(例如,肿瘤负荷减少)来鉴定这种增强的作用。在若干实施例中,工程改造的NK细胞是从患者分离的自体细胞。在另外的实施例中,工程改造的NK细胞由分离自供体的同种异体细胞产生。在若干实施例中,如本文所披露的此类工程改造的NK细胞用于通过给予所述NK细胞来增强有需要的哺乳动物中的NK细胞细胞毒性。在若干实施例中,这些工程改造的NK细胞用于治疗或预防哺乳动物中的癌症或传染病。在一些实施例中,编码本文披露的各种嵌合受体的多肽、运载其的载体和表达其的NK细胞也可以用于制备用以增强NK细胞细胞毒性的药物(例如,用于治疗或预防癌症或传染病)。在若干实施例中,本文披露的嵌合受体构建体不显著增加工程改造的NK细胞对正常细胞的细胞毒性,并且如本文所述,与非工程改造的NK细胞相比其有利地得到改善。在若干实施例中,提供了编码嵌合受体的多核苷酸,该嵌合受体包含胞外受体结构域、跨膜区和效应子结构域。在若干实施例中,胞外受体结构域包含与自然杀伤组2成员D(NKG2D)的天然配体结合的肽,其中与NKG2D的天然配体结合的肽是NKG2D片段。若干实施例涉及编码嵌合受体的多核苷酸,该嵌合受体包含:(a)胞外受体结构域,其中所述胞外受体结构域包含与自然杀伤组2成员D(NKG2D)的天然配体结合的肽,其中与NKG2D的天然配体结合的该肽是NKG2D片段,其中该NKG2D片段由多核苷酸编码,该多核苷酸包含:(i)SEQ ID NO:1的序列的片段、(ii)SEQ

ID NO.2的序列、(iii) SEQ ID NO.3的序列或(iv) SEQ ID NO.68的序列, (b) 跨膜区, 和(c) 效应子结构域。

[0058] 在若干实施例中, 提供了编码嵌合受体的多核苷酸, 该嵌合受体包含: (a) 胞外受体结构域, 其中所述胞外受体结构域包含与自然杀伤组2成员D (NKG2D) 的天然配体结合的肽, 其中与NKG2D的天然配体结合的该肽是NKG2D片段, 其中该NKG2D片段由多核苷酸编码, 该多核苷酸包含: (i) SEQ ID NO:1的序列的片段、(ii) SEQ ID NO.2的序列、(iii) SEQ ID NO.3的序列、(iv) 或SEQ ID NO.68的序列; 和 (b) 包含跨膜区和胞内信号传导结构域的效应子结构域。

[0059] 在若干实施例中, 跨膜区包含CD3 ζ 跨膜区。在若干实施例中, CD3 ζ 跨膜区包含SEQ ID NO:69的氨基酸序列。在若干实施例中, 跨膜区包含CD8a。在若干实施例中, 效应子结构域包含4-1BB、2B4的胞内结构域、NKp80、CD16胞内结构域、自然细胞毒性触发受体1 (NCR1)、自然细胞毒性触发受体2 (NCR2)、自然细胞毒性触发受体3 (NCR3) 和/或DAP10的胞内结构域。在一个实施例中, 效应子结构域包含4-1BB和CD16。在若干实施例中, 效应子结构域包含4-1BB和CD3 ζ 。在若干实施例中, 效应子结构域包含4-1BB以及2B4或DAP10的胞内结构域。在若干实施例中, 效应子结构域包含2B4, 其后是4-1BB, 而在其他实施例中, 效应子结构域包含4-1BB, 其后是2B4。在若干实施例中, 效应子结构域包含DAP10, 其后是4-1BB。在若干实施例中, 效应子结构域包含4-1BB, 其后是DAP10。在若干实施例中, 效应子结构域还包含CD3 ζ 。在若干实施例中, 效应子结构域包含至少一个选自以下组的信号传导结构域, 该组由以下组成: OX40 (CD134)、CD3 ζ 、4-1BB、CD28和DAP12。在若干实施例中, 效应子结构域包含一个或多个半-ITAM序列。在若干实施例中, 半-ITAM包含SEQ ID NO.14的氨基酸序列。在若干实施例中, 半-ITAM包含SEQ ID NO.37的氨基酸序列。在若干实施例中, 效应子结构域包含一个或多个ITSM序列。在若干实施例中, ITSM包含SEQ ID NO.15的氨基酸序列或SEQ ID NO.35的氨基酸序列

[0060] 在若干实施例中, 嵌合受体包含与CD8a铰链偶联的NKG2D片段、CD8a跨膜结构域、4-1BB、2B4和CD3 ζ 。在一个实施例中, 嵌合受体由SEQ ID NO:58的核酸序列编码。在一个实施例中, 嵌合受体包含SEQ ID NO:59的氨基酸序列。在若干实施例中, 嵌合受体包含与CD8a铰链偶联的NKG2D片段、CD8a跨膜结构域、4-1BB和DAP10。在若干实施例中, 嵌合受体由SEQ ID NO:60的核酸序列编码, 并包含SEQ ID NO:61的氨基酸序列。

[0061] 在若干实施例中, 嵌合受体包含与CD8a铰链偶联的NKG2D片段、CD8a跨膜结构域、4-1BB、2B4和DAP10。在若干实施例中, 效应子结构域包含4-1BB, 其后是DAP10, 之后是2B4。在一些实施例中, 嵌合受体由SEQ ID NO.62的核酸序列编码, 并且嵌合受体包含SEQ ID NO.63的氨基酸序列。在若干实施例中, 效应子结构域包含4-1BB, 其后是2B4, 之后是DAP10。在若干实施例中, 嵌合受体由SEQ ID NO:64的核酸序列编码, 并且嵌合受体包含SEQ ID NO:65的氨基酸序列。

[0062] 在若干实施例中, 嵌合受体包含经密码子优化的与GS3接头偶联的NKG2D片段、另外的NKG2D片段、CD8a铰链、CD8a跨膜结构域、4-1BB和CD3 ζ 。在一个实施例中, 嵌合受体由SEQ ID NO:66的核酸序列编码。在若干实施例中, 嵌合受体包含SEQ ID NO.67的氨基酸序列。

[0063] 在若干实施例中, 嵌合受体包含经密码子优化的与CD8a铰链偶联的NKG2D片段、

CD3 ζ 跨膜区和包含4-1BB的效应子结构域,由SEQ ID NO:78的核酸序列编码和/或包含SEQ ID NO:79的氨基酸序列。

[0064] 在若干实施例中,嵌合受体包含经密码子优化的与CD8a铰链偶联的NKG2D片段、CD3 ζ 跨膜区和效应子结构域(包含CD16,其后是4-1BB)。在若干实施例中,嵌合受体由SEQ ID NO:70的核酸序列编码,和/或包含SEQ ID NO:71的氨基酸序列。

[0065] 在若干实施例中,嵌合受体包含经密码子优化的与CD8a铰链偶联的NKG2D片段、CD3 ζ 跨膜区和效应子结构域(包含4-1BB,其后是GS3接头和CD16)。在一个实施例中,嵌合受体包含SEQ ID NO:85的氨基酸序列和/或由SEQ ID NO:84的核酸序列编码。

[0066] 在若干实施例中,嵌合受体包含经密码子优化的与GS3接头偶联的NKG2D片段、外的NKG2D片段、CD8a铰链、CD3 ζ 跨膜区和包含CD16和4-1BB的效应子结构域。在一个实施例中,嵌合受体由SEQ ID NO:72的核酸序列编码和/或包含SEQ ID NO:73的氨基酸序列。

[0067] 在若干实施例中,嵌合受体包含通过GS3接头与偶联至CD8a铰链的NKG2D片段连接的IL-15、CD8a跨膜结构域、4-1BB和CD3 ζ ,由SEQ ID NO:88的核酸序列编码和/或包含SEQ ID NO:89的氨基酸序列。

[0068] 在若干实施例中,嵌合受体包含与IgG4铰链偶联的NKG2D片段、CD8a跨膜结构域、4-1BB和CD3 ζ ,由SEQ ID NO:96的核酸序列编码,和/或包含SEQ ID NO:97的氨基酸序列。

[0069] 在若干实施例中,嵌合受体包含与CD8a铰链偶联的NKG2D片段、CD8a跨膜结构域、OX40和CD3 ζ ,由SEQ ID NO:90的核酸序列编码,和/或包含SEQ ID NO:91的氨基酸序列。

[0070] 在若干实施例中,嵌合受体包含与IgG4铰链偶联的NKG2D片段、CD8a跨膜结构域、OX40和CD3 ζ ,由SEQ ID NO:100的核酸序列编码,和/或包含SEQ ID NO:101的氨基酸序列。

[0071] 在若干实施例中,嵌合受体包含与CD8a铰链偶联的NKG2D片段、CD28跨膜/胞内结构域和CD3 ζ ,由SEQ ID NO:92的核酸序列编码,和/或包含SEQ ID NO:93的氨基酸序列。

[0072] 在若干实施例中,嵌合受体包含与CD8a铰链偶联的NKG2D片段、CD28跨膜/胞内结构域、4-1BB和CD3 ζ ,由SEQ ID NO:94的核酸序列编码,和/或包含SEQ ID NO:95的氨基酸序列。

[0073] 在若干实施例中,嵌合受体包含与IgG4铰链偶联的NKG2D片段、CD28跨膜/胞内结构域和CD3 ζ ,由SEQ ID NO:98的核酸序列编码,和/或包含SEQ ID NO:99的氨基酸序列。

[0074] 在若干实施例中,嵌合受体包含与CD8a铰链偶联的NKG2D片段、CD3 ζ 跨膜区和包含CD16、4-1BB、GS3接头和NKp80的效应子结构域。在一个实施例中,嵌合受体由SEQ ID NO:74的核酸序列编码和/或包含SEQ ID NO:75的氨基酸序列。

[0075] 在若干实施例中,嵌合受体包含经密码子优化的与GS3接头偶联的NKG2D片段、另外的NKG2D片段、CD8a铰链、CD3 ζ 跨膜区和包含CD16、4-1BB、GS3和NKp80的效应子结构域。在一个实施例中,嵌合受体由SEQ ID NO:76的核酸序列编码和/或包含SEQ ID NO:77的氨基酸序列。在若干实施例中,嵌合受体包含经密码子优化的与CD8a铰链偶联的NKG2D片段、CD3 ζ 跨膜区和包含4-1BB、GS3接头和NKp80的效应子结构域。在一个实施例中,嵌合受体由SEQ ID NO:82的核酸序列编码和/或包含SEQ ID NO:83的氨基酸序列。

[0076] 在若干实施例中,嵌合受体包含经密码子优化的与CD8a铰链偶联的NKG2D片段、CD3 ζ 跨膜区和包含4-1BB和CD3 ζ 的效应子结构域。在一个实施例中,嵌合受体由SEQ ID NO:80的核酸序列编码和/或包含SEQ ID NO:81的氨基酸序列。

[0077] 根据实施例,效应子结构域还可包含FcR γ 。例如,在若干实施例中,嵌合受体包含与CD8a铰链偶联的NKG2D片段、CD3 ζ 跨膜区和包含4-1BB和FcR γ 的效应子结构域。在一个实施例中,嵌合受体由SEQ ID NO:86的核酸序列编码和/或包含SEQ ID NO:87的氨基酸序列。

[0078] 根据实施例,效应子结构域还可包含CD28。例如,在若干实施例中,嵌合受体包含与CD8a铰链偶联的NKG2D片段、CD3 ζ 跨膜区和包含CD28和CD3 ζ 的效应子结构域。在若干实施例中,嵌合受体由SEQ ID NO:102的核酸序列编码,和/或包含SEQ ID NO:103的氨基酸序列。

[0079] 在若干实施例中,效应子结构域包含GS接头。

[0080] 在若干实施例中,胞外受体结构域还包含CD8a信号肽,其中信号肽包含SEQ ID NO.4的核酸序列。在若干实施例中,胞外受体结构域还包含与CD3 ζ 跨膜区直接相邻的CD3 ζ 的2个胞外残基。在若干实施例中,胞外受体结构域包含CD8a信号肽,其中信号肽包含SEQ ID NO.4的核酸序列。

[0081] 在若干实施例中,嵌合受体包含一个或多个GS3接头。在若干实施例中,嵌合受体结构域包含铰链区。在若干实施例中,铰链区由SEQ ID NO:5的核酸序列编码,而在一些实施例中,铰链区由SEQ ID NO:5的核酸序列的片段编码。在若干实施例中,铰链区是CD8a铰链。在若干实施例中,铰链区包含具有SEQ ID NO:31的氨基酸序列的甘氨酸-丝氨酸重复基序。在若干实施例中,铰链区包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列,并且在一些实施例中,铰链区包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列。在另外的实施例中,铰链区由SEQ ID NO:34的核酸序列编码。在若干实施例中,铰链区包含 β -肾上腺素能受体的一部分。在一些这样的实施例中,铰链区由SEQ ID NO:40的核酸序列编码。在另外的实施例中,铰链区由SEQ ID NO:42的核酸序列编码。在若干实施例中,铰链区是由SEQ ID NO:104的核酸序列编码的免疫球蛋白G4(IgG4)铰链。在若干实施例中,铰链区是由SEQ ID NO:104的核酸序列的片段编码的免疫球蛋白G4(IgG4)铰链。在若干实施例中,嵌合受体包含与CD8a铰链偶联的NKG2D片段和CD8a跨膜结构域。

[0082] 在一个实施例中,嵌合受体包含与CD16偶联的NKG2D片段,由SEQ ID NO:23的核酸序列编码,和/或包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列。在一个实施例中,嵌合受体包含与NCR1偶联的NKG2D片段。在一些这样的实施例中,嵌合受体由SEQ ID NO:27的核酸序列编码和/或包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列。在若干实施例中,嵌合受体包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列的至少一部分。在若干实施例中,嵌合受体包含与NCR3偶联的NKG2D片段,在若干实施例中由SEQ ID NO.29的核酸序列编码和/或包含SEQ ID NO.30的氨基酸序列。

[0083] 在若干实施例中,嵌合受体包含与CD16跨膜/胞内结构域偶联的NKG2D片段和4-1BB。在若干实施例中,嵌合受体包含与CD8a铰链偶联的NKG2D片段、CD16跨膜/胞内结构域和4-1BB,由SEQ ID NO:25的核酸序列编码,和/或包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列。

[0084] 在若干实施例中,嵌合受体包含与NCR1偶联的NKG2D片段和4-1BB,其中嵌合受体包含SEQ ID NO:20的NCR1氨基酸序列。

[0085] 在若干实施例中,嵌合受体包含与CD8a偶联的NKG2D片段、4-1BB和CD3 ζ ,由SEQ ID NO.18的核酸序列编码和/或包含SEQ ID NO.19的氨基酸序列。

[0086] 在若干实施例中,嵌合受体包含与NCR3偶联的NKG2D片段和4-1BB,并且其中NCR3包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列。在一个实施例中,嵌合受体包含SEQ ID NO:20的NCR1跨

膜/胞内结构域或SEQ ID NO:22的NCR3跨膜/胞内结构域中的一个或多个。

[0087] 在若干实施例中,嵌合受体包含与GS3接头偶联的NKG2D片段、CD8a铰链、CD16跨膜/胞内结构域和4-1BB。在若干实施例中,嵌合受体由SEQ ID NO:43的核酸序列编码。在若干实施例中,嵌合受体包含与GS3接头偶联的NKG2D片段、CD16跨膜/胞内结构域和4-1BB。在一个实施例中,嵌合受体由SEQ ID NO:44的核酸序列编码。

[0088] 在若干实施例中,嵌合受体包含与CD16跨膜/胞内结构域偶联的NKG2D片段和4-1BB,并由SEQ ID NO:45的核酸序列编码。

[0089] 在若干实施例中,嵌合受体包含与CD8a铰链偶联的NKG2D片段、CD8a跨膜结构域、4-1BB和2B4,并由SEQ ID NO:46的核酸序列编码。

[0090] 在若干实施例中,嵌合受体包含与 β -肾上腺素能胞外结构域偶联的NKG2D片段、 β -肾上腺素能跨膜结构域、4-1BB和2B4,并由SEQ ID NO:47的核酸序列编码。

[0091] 在一些实施例中,嵌合受体包含与CD8a铰链偶联的NKG2D片段、CD8a跨膜结构域、4-1BB、2B4、GS3接头和NKp80,并由SEQ ID NO:48的核酸序列编码。

[0092] 在若干实施例中,嵌合受体包含与CD8a铰链偶联的NKG2D片段、CD8a跨膜结构域、4-1BB、GS3接头和NKp80,并由SEQ ID NO:49的核酸序列编码。

[0093] 在若干实施例中,嵌合受体包含经密码子优化的与GS3接头偶联的NKG2D片段、另外的NKG2D片段、 β -肾上腺素能胞外结构域、 β -肾上腺素能跨膜结构域、4-1BB、另外的GS3接头和NKp80并由SEQ ID NO:50的核酸序列编码。

[0094] 在若干实施例中,嵌合受体包含经密码子优化的与GS3接头偶联的NKG2D片段、另外的NKG2D片段、CD8a铰链、CD8a跨膜结构域、4-1BB、另外的GS3接头和NKp80并由SEQ ID NO:51的核酸序列编码。

[0095] 在若干实施例中,嵌合受体包含经密码子优化的与GS3接头偶联的NKG2D片段、另外的NKG2D片段、CD8a铰链、CD16跨膜/胞内结构域和4-1BB并由SEQ ID NO:52的核酸序列编码。

[0096] 在若干实施例中,嵌合受体包含与CD8a铰链偶联的NKG2D片段、CD16跨膜/胞内结构域、4-1BB和2B4,并由SEQ ID NO:53的核酸序列编码。

[0097] 在若干实施例中,嵌合受体包含与CD8a铰链偶联的NKG2D片段、CD16跨膜/胞内结构域、4-1BB、GS3接头和NKp80,并由SEQ ID NO:54的核酸序列编码。

[0098] 在若干实施例中,嵌合受体构建体由编码嵌合受体的多核苷酸编码,其中胞外受体结构域包含与NKG2D的天然配体结合的第二肽(例如,MICA、MICB、ULBP1、ULBP2、ULBP3、ULBP4、ULBP5或ULBP6中的一种或多种)。根据实施例,与NKG2D的天然配体结合的肽与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3具有至少80%的同源性。

[0099] 在若干实施例中,多核苷酸与另外的编码膜结合白细胞介素15(mbIL15)的构建体共表达。在若干实施例中,嵌合受体由SEQ ID NO:18的核酸序列编码。在若干实施例中,嵌合受体由SEQ ID NO:19的氨基酸序列编码。

[0100] 根据若干实施例,嵌合受体不包含DNAX活化蛋白10(DAP10)和/或嵌合受体不编码基于免疫受体酪氨酸的活化(ITAM)基序。

[0101] 在若干实施例中,本文披露的多核苷酸是mRNA。另外,在若干实施例中,本文披露的多核苷酸与至少一种调节元件可操作地连接以表达嵌合受体。

[0102] 本文还提供了包含本文披露的多核苷酸的载体。在若干实施例中，多核苷酸与至少一个用于表达嵌合受体的调节元件可操作地连接。在若干实施例中，载体是逆转录病毒。

[0103] 本文还提供了基因工程改造的自然杀伤细胞，其包含本文披露的任何一种或多种多核苷酸。在若干实施例中，自然杀伤细胞用于自体使用，而在一些实施例中，它们用于同种异体用途。

[0104] 本文还提供了增强有需要的哺乳动物中NK细胞细胞毒性的方法，该方法包括向哺乳动物给予NK细胞，其中所述NK细胞表达由本文披露的多核苷酸编码的嵌合受体。

[0105] 另外，提供了治疗或预防有需要的哺乳动物中癌症或传染病的方法，所述方法包括向所述哺乳动物给予治疗有效量的NK细胞，其中所述NK细胞表达由本文所披露的多核苷酸编码的嵌合受体。如上所述，NK细胞可以是同种异体的或自体的。

[0106] 提供了本文披露的多核苷酸在制备用于增强有需要的哺乳动物中NK细胞细胞毒性的药物中的用途。此外，提供了多核苷酸在制备用于治疗或预防有需要的哺乳动物中癌症或传染病的药物中的用途。

[0107] 还提供了包含本文披露的多核苷酸的载体在制备用于增强有需要的哺乳动物中NK细胞细胞毒性的药物中的用途。还提供了包含本文披露的多核苷酸的载体在制备用于治疗或预防有需要的哺乳动物中癌症或传染病的药物中的用途。

[0108] 还提供了分离的、基因工程改造的、表达本文披露的嵌合受体的自然杀伤细胞用于增强有需要的哺乳动物中NK细胞细胞毒性的用途。还提供了分离的、基因工程改造的、表达本文披露的嵌合受体的自然杀伤细胞用于治疗或预防有需要的哺乳动物中癌症或传染病的用途。

[0109] 以上概述并在下面进一步详细阐述的组合物和相关方法描述了专业人员采取的某些行为；但是，应该理解的是，它们还可以包括另一方对这些行为的指示。因此，例如“给予表达嵌合受体的NK细胞群”的行为包括“指示给予表达嵌合受体的NK细胞群”。

附图说明

[0110] 以下附图的描述涉及代表本文披露的发明的非限制性实施例的实验和结果。

[0111] 图1A-图1C描绘根据本文披露的若干实施例的嵌合受体的示意图。图1A描绘内源性NKG2D，图1B描绘NKG2D-DAP10-CD3 ζ ，及图1C描绘NKG2D-41BB-CD3 ζ 。

[0112] 图2A-图2B描绘根据本文披露的若干实施例的嵌合受体的示意图。图2A描绘NKG2D-CD16及图2B描绘NKG2D-CD16-41BB。

[0113] 图3A-图3B描绘质粒图，其说明了根据若干实施例的某些构建体插入质粒中的点，示出了鼠干细胞病毒(MSCV)质粒。图3A显示NKG2D-DAP10-CD3 ζ 和NKG2D-41BB-CD3 ζ 的基因构建体，它们插入载体中的EcoRI和NotI限制性位点，同时去除IRES-GFP序列。图3B描绘NKG2D-CD16和NKG2D-CD16-41BB的质粒，它们插入位于多克隆位点(MCS)中的EcoRI和XhoI限制性位点。载体中的IRES-GFP序列允许追踪转导效率。

[0114] 图4A-图4C描绘数据，该数据涉及NK细胞中NKG2D-DAP10-CD3 ζ 和NKG2D-41BB-CD3 ζ 的表达。图4A显示流式细胞术数据，示出转导后NKG2D阳性NK细胞的百分比。图4B显示概述NKG2D阳性NK细胞百分比的点图。图4C显示数据，该数据涉及转导后不同NK细胞组中的平均荧光强度(MFI)。

[0115] 图5A-图5C描绘数据,该数据涉及各种构建体的从供体1、供体2和供体3(分别为图5A、图5B和图5C)的NK细胞产生的针对培养的REH细胞的细胞毒性。

[0116] 图6A-图6C描绘数据,该数据涉及各种构建体的从供体1、供体2和供体3(分别为图6A、图6B和图6C)的NK细胞产生的针对培养的U-2OS细胞的细胞毒性。

[0117] 图7A-图7B描绘数据,该数据涉及在存在和不存在用REH细胞刺激的情况下,表达各种NKG2D构建体的NK细胞的干扰素- γ 产生。图7A描绘在有或没有REH细胞刺激的情况下,不同NK细胞组中IFN γ 的相对量。图7B描绘了刺激后不同NK细胞组之间IFN γ 的水平(中值表示)。

[0118] 图8A-图8C描绘数据,该数据涉及NK细胞中NKG2D-DAP10-CD3 ζ 和NKG2D-CD16的表达。图8A显示流式细胞术数据,示出转导后NKG2D阳性NK细胞的百分比。图8B显示概述NKG2D阳性NK细胞百分比的点图。图8C显示数据,该数据涉及转导后不同NK细胞组中的平均荧光强度(MFI)。

[0119] 图9A-图9C描绘数据,该数据涉及各种构建体的从3个供体(分别为图9A、图9B和图9C)的NK细胞产生的针对培养的REH细胞的细胞毒性。

[0120] 图10A-图10C描绘数据,该数据涉及各种构建体的从3个供体(分别为图10A、图10B和图10C)的NK细胞产生的针对培养的U-2OS细胞的细胞毒性。

[0121] 图11描绘数据,该数据涉及在存在和不存在用REH细胞刺激的情况下,表达各种NKG2D构建体的NK细胞的干扰素- γ 产生。

[0122] 图12A-图12B描绘数据,该数据涉及NK细胞中NKG2D-DAP10-CD3 ζ 和NKG2D-CD16-41BB的表达。图12A显示流式细胞术数据,示出转导后NKG2D阳性NK细胞的百分比。图12B显示直方图,该直方图涉及NK细胞上各种构建体的表面表达的相对量。

[0123] 图13A-图13B描绘数据,该数据涉及各种NKG2d构建体的细胞毒性程度。图13A描绘针对培养的REH细胞的细胞毒性程度。图13B描绘针对培养的U2OS细胞的细胞毒性程度。

[0124] 图14示意性地描绘了根据本文披露的一些实施例的若干种NKG2D构建体的构建图。

[0125] 图15示意性地描绘了根据本文披露的一些实施例的另外NKG2D构建体的构建图。

[0126] 图16A-图16C描绘数据,该数据涉及NK细胞中各种NKG2D构建体的表达。图16A显示数据,该数据涉及NK细胞中各种NKG2D构建体的平均荧光强度(MFI)。图16B显示流式细胞术数据,示出将各种NKG2D构建体转导入两个供体的NK细胞(505和870)后,NKG2D阳性和CD56阳性NK细胞的百分比。图16C显示数据,该数据涉及转导后七天来自2个供体的NK细胞中的平均荧光强度(MFI)。

[0127] 图17描绘数据,该数据涉及在以1:1的E:T比率下转导入NK细胞后14天,各种NKG2D构建体的细胞毒性。

[0128] 图18A-图18B描绘数据,该数据涉及转导入NK细胞后,各种NKG2D构建体的表达。图18A显示数据,该数据涉及转导后七天NK细胞中的平均荧光强度(MFI)。图18B显示数据,该数据涉及各种NKG2D构建体相对于空白转导的NK细胞的MFI倍数变化。

[0129] 图19A-图19B描绘数据,该数据涉及各种NKG2D构建体的细胞毒性。图19A显示数据,该数据涉及在1:1的E:T比率下,转导入NK细胞的各种NKG2D构建体的细胞毒性。图19B显示数据,该数据涉及各种NKG2D构建体相对于空白转导的NK细胞的细胞毒性百分比变化。

[0130] 图20描绘数据,该数据涉及在以1:1的E:T比率下转导入NK细胞后14天,各种NKG2D构建体的细胞毒性。在分析之前,将NK细胞在补充有40IU IL-2/mL的培养基中培养。

[0131] 图21描绘数据,该数据涉及在转导进入供体238NK细胞10天(其中在每2天以40IU IL-2/mL进行补充的培养基中培养4天)后,在1:1和1:2的E:T比率进行两小时的情况下,各种NKG2D构建体针对培养的REH细胞的细胞毒性。

[0132] 图22示意性地描绘了根据本文披露的实施例的另外NKG2D构建体的构建图。

[0133] 图23A-图23B描绘数据,该数据涉及各种NKG2D构建体的从两个不同供体(供体61和供体103,分别于图23A和图23B中)的NK细胞产生的持久性。在补充有40IU IL-2/mL的培养基中培养NK细胞。

[0134] 图24描绘数据,该数据涉及各种NKG2D构建体的表达。从4个健康供体(224、225、362和363)的外周血单核细胞(PBMC)扩增NK细胞,并用指导所示构建体表达的病毒进行转导。转导后3天,用荧光标记的抗-NKG2D抗体对NK细胞染色,并使用流式细胞仪分析。通过经标记的细胞的平均荧光强度(MFI)评估相对的NKG2D表达。

[0135] 图25A-图25B描绘数据,该数据涉及用各种NKG2D构建体转导的NK细胞的细胞毒性。NK细胞从4个供体的PBMC扩增;转导后8天,在1:1的E:T比率下测量针对培养的REH和HL60细胞(分别为图25A和图25B)的NK细胞毒性。在分析之前,将NK细胞在补充有40IU IL-2/mL的培养基中培养。

[0136] 图26A-图26C描绘数据,该数据涉及在使用REH肿瘤细胞过夜刺激后,表达各种NKG2D构建体的NK细胞的干扰素- γ (IFN γ)、肿瘤坏死因子- α (TNF α)和粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)的产生。在用指定的构建体转导后8天,在96孔圆底板的各个孔中用 1×10^5 个REH细胞刺激 1×10^5 个NK细胞;过夜孵育后,收获上清液,并使用Meso Scale Discovery装置参照相关标准对细胞因子水平进行测量。图26A描绘刺激后不同NK细胞组中IFN γ 的累积水平,图26B描绘刺激后不同NK细胞组中TNF α 的水平,以及图26C描绘刺激后不同NK细胞组中GM-CSF的水平。在分析之前,将NK细胞在补充有40IU IL-2/mL的培养基中培养。

[0137] 图27A-图27B描绘数据,该数据涉及转导后7、14和21天,表达各种NKG2D构建体的来自两个供体(供体224和225,分别于图27A和27B中)的NK细胞的持久性。在分析之前,将NK细胞在补充有40IU IL-2/mL的培养基中培养。

[0138] 图28A-图28B描绘数据,该数据涉及用所述指定的NKG2D构建体转导的NK细胞的细胞毒性。测量了针对稳定转导以表达红色荧光蛋白的U2OS细胞得NK细胞毒性;将U2OS细胞与NK细胞以1:4和1:2(分别为图28A和图28B)的E:T比率进行培养。使用Incucyte S3活细胞分析系统(Live-Cell Analysis System)在72小时中每60分钟对活U2OS细胞计数。在分析之前,将NK细胞在补充有40IU IL-2/mL的培养基中培养。

具体实施方式

[0139] 概述

[0140] 许多疾病的异常细胞(包括病毒感染的细胞和恶性细胞)的出现和持续是通过对所述异常细胞的免疫应答不足而达到的。免疫疗法的目标是启动或增强患者的免疫系统应答,例如,增强免疫细胞(例如自然杀伤(NK)细胞)破坏、杀伤或以其他方式抑制受损细胞或

患病细胞的能力。一种免疫疗法是在免疫细胞中重组用于靶向识别和破坏异常细胞表达嵌合受体。通常,嵌合受体包含识别靶细胞上的配体的胞外受体结构域、锚定跨膜结构域和在配体结合后转导活化信号的效应子结构域。本文公开的一些实施例利用具有该一般结构的嵌合受体,或具有该一般结构的变体的嵌合受体。另外,在若干实施例中,跨膜结构域和效应子结构域是单独的肽,其融合在一起。在若干其他实施例中,跨膜结构域和效应子结构域衍生自相同的肽。在一些这样的实施例中,跨膜结构域和效应子结构域包含单个肽(例如,一个肽,其穿过膜并且还准备启动信号级联)。如下面更详细讨论的,使用截短、突变、额外的连接子/间隔子元件、二聚体等产生嵌合受体构建体,其在免疫细胞(例如,NK细胞)中表现出所需程度的表达,诱导来自NK细胞的细胞毒性活性,与一定程度的靶标亲和力平衡(这避免对非靶细胞的不利影响)。本文披露的嵌合受体在免疫细胞表面上的重组表达可以将免疫细胞的靶向重定向至目标异常细胞,并且在接合后增强免疫活化。

[0141] 用于免疫疗法的NK细胞

[0142] 一种免疫疗法包括向患者给予工程改造以表达嵌合受体的T细胞以引发阳性免疫应答。然而,该方法的缺点是其需要使用自体细胞来预防患者中移植物抗宿主病的诱导。如本文披露的若干实施例中所提供,包含工程改造的NK细胞的组合物具有若干优点。例如,自体或供体衍生的同种异体细胞可以与NK细胞方法一起使用。另外,根据若干实施例,如本文提供的工程改造的NK细胞不显著增加针对正常细胞的细胞毒性。此外,NK细胞一旦被活化,就具有显著的细胞毒性作用。鉴于此,出人意料的是,本文提供的工程改造的NK细胞能够进一步提高细胞毒性作用,从而提供选择性杀死患病靶细胞的更有效的手段。因此,在若干实施例中,提供了治疗或预防癌症或传染病的方法,其包括给予治疗有效量的表达本文嵌合受体的NK细胞。在一个实施例中,给予的NK细胞是自体细胞。在进一步的实施例中,给予的NK细胞是供体衍生的(同种异体的)细胞。

[0143] 在若干实施例中,表达嵌合受体的重组NK细胞的接合和活化(例如,通过结合靶细胞上的配体)导致通过细胞溶解直接杀伤应激细胞和/或异常细胞(例如,肿瘤细胞、病毒感染的细胞等)。因此,在若干实施例中,提供了增强NK细胞细胞毒性的方法,该方法包括给予经工程改造以表达本文所述的嵌合受体的NK细胞。在一个实施例中,给予的NK细胞是自体细胞。在进一步的实施例中,所述NK细胞是供体衍生的(同种异体的)细胞。在若干实施例中,工程改造的NK细胞导致应激细胞和/或异常细胞(例如,肿瘤细胞、病毒感染的细胞等)的间接破坏或抑制。

[0144] 配体结合结构域

[0145] 如上所述,在若干实施例中,NK细胞识别并破坏异常细胞(包括肿瘤细胞和病毒感染的细胞)。这些先天免疫细胞的细胞毒活性分别受抑制受体和活化受体(位于细胞表面)的信号传导平衡调节。前者结合健康细胞表面上表达的自身分子,而后者结合异常细胞上表达的配体。活化受体相对于抑制受体的接合增加导致NK细胞活化和靶细胞裂解。自然杀伤组2成员D(NKG2D)是一种重要的NK细胞活化受体,其识别在应激细胞和异常细胞上表达的许多配体。各种NKG2D配体的表面表达在健康细胞中通常较低,但在恶性转化或病毒感染时上调。NKG2D识别的配体的非限制性实例包括但不限于:MICA、MICB、ULBP1、ULBP2、ULBP3、ULBP4、ULBP5和ULBP6、以及在靶细胞上表达的控制NK细胞细胞溶解或细胞毒性功能的其他分子。

[0146] NKG2D识别细胞应激和感染的多种表面标志物的能力使其成为基于嵌合受体的免疫疗法的潜在有用组分。然而,使NKG2D用作嵌合受体复杂化的是其与伴侣DAP10的关系。NKG2D是II型跨膜糖蛋白,其形成同二聚体并与DNAX活化蛋白10(DAP10)的两个同二聚体组装,以在膜表面上产生六聚体复合物。该NKG2D-DAP10缔合对于内源性NKG2D的表面膜表达以及在配体结合后活化信号的转导都是必需的。在若干实施例中,使用全长NKG2D。在一个实施例中,全长NKG2D具有SEQ ID NO.1的核酸序列。根据本文披露的若干实施例,提供了编码嵌合受体的多核苷酸,其中胞外受体结构域是NKG2D片段,其缺乏其天然跨膜结构域或胞内结构域,但仍有利地保留其与NKG2D的天然配体结合、以及在配体结合后转导活化信号的能力。因此,在若干实施例中,由本文披露的多肽编码的嵌合受体不包含DAP10。在若干实施例中,NKG2D片段由SEQ ID NO.2编码。在若干实施例中,NKG2D片段与全长野生型NKG2D具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%的同源性。在若干实施例中,片段可具有来自SEQ ID NO.2的一个或多个另外的突变,但保留配体结合功能、或在一些实施例中具有增强的配体结合功能。在若干实施例中,NKG2D片段以二聚体、三聚体或其他多联体形式提供,这些实施例提供增强的配体结合活性。在若干实施例中,编码NKG2D片段的序列任选地完全或部分经密码子优化。在一个实施例中,编码经密码子优化的NKG2D片段的序列包含SEQ ID NO.3的序列。另外,在若干实施例中,使用信号肽。信号肽的种类或序列可随构建体而变化。然而,在若干实施例中,使用衍生自CD8的信号肽。在一个实施例中,信号肽来自CD8a并具有SEQ ID NO.4的序列。在一个实施例中,编码经密码子优化的NKG2D片段的序列包含SEQ ID NO.68的序列。在若干实施例中,片段可具有来自SEQ ID NO.68的一个或多个另外的突变,但保留配体结合功能。在若干实施例中,片段可具有来自SEQ ID NO.68的一个或多个另外的突变,但具有改善的配体结合功能。

[0147] 跨膜结构域、信号传导结构域和组合结构域

[0148] 如上所述,一般的嵌合抗原受体结构包含至少一个跨膜结构域,将配体结合结构域连接至一个或多个信号结构域。然而,在若干实施例中,跨膜结构域还可用于提供信号传导功能。

[0149] 在若干实施例中,NKG2D片段保留其正常跨膜结构域的至少一部分。在若干实施例中,跨膜结构域包含CD8的至少一部分,CD8是通常在T细胞和NK细胞上表达的跨膜糖蛋白。在若干实施例中,跨膜结构域包含CD8 α ,而在一些实施例中,使用CD8 β 。在若干实施例中,CD8 α 的“铰链”具有SEQ ID NO.5的序列。在一些实施例中,CD8 α 可以被截短或修饰,使得其与具有SEQ ID NO.5的序列的CD8 α 具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%的同源性。在若干实施例中,CD8 β 具有SEQ ID NO.6的序列。在一些实施例中,CD8 β 可以被截短或修饰,使得其与具有SEQ ID NO.6的序列的CD8 β 具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%的同源性。在若干实施例中,使用CD8 α 和CD8 β 的二聚体。

[0150] 在若干实施例中,跨膜结构域包含CD16,其也用作信号传导结构域。CD16以两种同种型存在,a和b(也分别称为Fc γ 受体IIIa和IIIb)。这些受体通常与IgG抗体的Fc部分结合,转而活化NK细胞。因此,在若干实施例中,跨膜结构域包含CD16a,而在一些实施例中,使用CD16b。在若干实施例中,CD16a具有SEQ ID NO.7的序列。在一些实施例中,CD16a可以被截短或修饰,使得其与具有SEQ ID NO.7的序列的CD16a具有至少70%、至少75%、至少

80%、至少85%、至少90%、至少95%的同源性。在若干实施例中,CD16b具有SEQ ID NO.8的序列。在一些实施例中,CD16b可以被截短或修饰,使得其与具有SEQ ID NO.8的序列的CD16b具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%的同源性。在若干实施例中,使用CD16a和CD16b的二聚体。在若干实施例中,对CD16跨膜结构域的修饰包含额外的核酸残基以增加该结构域的长度。可替代地,可以缩短CD16。对CD16长度的修饰可以有利地促进增强的配体-受体相互作用。

[0151] 在若干实施例中,嵌合受体包含自然杀伤受体2B4结构域(在本文中称为“2B4”,也称为CD244),其也用作信号传导结构域。2B4在NK细胞上表达,并通过该受体与其靶细胞上的配体之间的相互作用调节非主要组织相容性复合物(MHC)限制性杀伤。在若干实施例中,跨膜结构域包含2B4,而在若干实施例中,2B4结构域是胞内信号传导结构域。在若干实施例中,2B4具有SEQ ID NO.9的序列。在一些实施例中,2B4可以被截短或修饰,使得其与具有SEQ ID NO.9的序列的2B4具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%的同源性。在若干实施例中,2B4用作构建体中的唯一跨膜/信号传导结构域,然而,在若干实施例中,2B4可与一个或多个其他结构域一起使用。例如,在一些实施例中使用CD16、4-1BB和/或2B4的组合。

[0152] 在一些实施例中,如上所述,通过DAP10实现信号传导。在若干实施例中,NKG2D片段与DAP10缔合以向NK细胞提供前细胞毒性信号。在若干实施例中,使用DAP10的二聚体。在若干实施例中,跨膜结构域包含DAP10。在若干实施例中,DAP10具有SEQ ID NO.10的序列。在一些实施例中,DAP10可以被截短或修饰,使得其与具有SEQ ID NO.10的序列的DAP10具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%的同源性。类似地,在一些实施例中,可以使用DAP12,因为它也可以转导这些信号。在若干实施例中,DAP12具有SEQ ID NO.11的序列。在一些实施例中,DAP12可以被截短或修饰,使得其与具有SEQ ID NO.11的序列的DAP12具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%的同源性。在若干实施例中,使用DAP10和DAP12的异二聚体。

[0153] 在若干实施例中,通过4-1BB(也称为CD137和肿瘤坏死因子受体超家族成员9(TNFRSF 9))提供信号传导。4-1BB是共刺激免疫检查点分子,通常用作活化的T细胞的刺激分子(例如,4-1BB的交联增强T细胞增殖和细胞溶解活性)。然而,在若干实施例中,4-1BB的功能有利地与NK细胞结合使用。在若干实施例中,4-1BB具有SEQ ID NO.12的序列。在一些实施例中,4-1BB可以被截短或修饰,使得其与具有SEQ ID NO.12的序列的4-1BB具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%的同源性。在若干实施例中,4-1BB是唯一的信号传导结构域,但如上所述,在若干实施例中,4-1BB与本文披露的一种或多种其他跨膜结构域/信号传导结构域组合时出人意料地作用良好。例如,在若干实施例中,CD16与4-1BB结合提供协同刺激作用,产生特别有效(例如细胞毒性)的NK细胞。在若干实施例中,DAP10与4-1BB结合提供协同刺激作用,产生特别有效(例如细胞毒性)的NK细胞。在若干实施例中,DAP10与4-1BB和/或2B4结合提供协同刺激作用,产生特别有效(例如细胞毒性)的NK细胞。在若干实施例中,其他改善的特性导致诸如改善的表达、改善的持久性等。

[0154] 在若干实施例中,信号传导结构域包含CD3 T细胞受体复合物的至少一部分。T细胞受体复合物包含多个亚基,包括 ζ 、 α 、 β 、 γ 、 δ 和 ϵ 亚基。在若干实施例中,根据本文披露的若干实施例工程改造的NK细胞包含这些亚基中的至少一个(或其片段)。在若干实施例中,

信号传导结构域包含CD3 ζ 亚基。在若干实施例中,CD3 ζ 具有SEQ ID NO.13的序列。在一些实施例中,CD3 ζ 可以被截短或修饰,使得其与具有SEQ ID NO.13的序列的CD3 ζ 具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%的同源性。在若干实施例中,CD3 ζ 突变(例如,氨基酸突变、插入或缺失),使得该结构域不再与基于经典免疫受体酪氨酸的活化基序或ITAM基序一致。因此,在若干实施例中,NK细胞包含不含有ITAM基序的工程改造的受体。在一些实施例中,所得的工程改造的NK细胞对靶细胞表现出特别增强的细胞毒性,同时具有有限的或减少的不良副作用。在若干实施例中,这是由在给定实施例中使用的嵌合受体的各个部分的协同相互作用造成。在若干实施例中,CD3 ζ 与4-1BB结合提供协同刺激作用,产生特别有效(例如细胞毒性)的NK细胞。在若干实施例中,CD3 ζ 与2B4结合提供协同刺激作用,产生特别有效(例如细胞毒性)的NK细胞。在若干实施例中,CD3 ζ 与2B4和4-1BB组合提供协同刺激作用,产生特别有效(例如细胞毒性)的NK细胞。在若干实施例中,嵌合受体利用通过其跨膜结构域的CD3 ζ 二聚化。因此,在若干实施例中,跨膜结构域包含CD3 ζ 跨膜结构域(或其片段)。在一些实施例中,1、2、3、4、5、6或更多个胞外CD3 ζ 残基(所述“近膜部分”)与CD3 ζ 跨膜结构域直接相邻。在一些实施例中,CD3 ζ 跨膜结构域具有SEQ ID NO.69的序列。在一些实施例中,CD3 ζ 跨膜结构域可以被截短或修饰,使得其与具有SEQ ID NO.69的序列的CD3 ζ 跨膜结构域具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%的同源性。在若干实施例中,对CD3 ζ 跨膜结构域的修饰包含额外的核酸残基以增加该结构域的长度。在若干实施例中,CD3 ζ 跨膜结构域和CD3 ζ 近膜部分将全长CD3 ζ 分子募集至突触。在若干实施例中,取决于实施例,天然CD3 ζ 向工程改造的受体的募集(与不具有CD3 ζ 跨膜结构域的受体相比)增加约20%、约30%、约40%、约50%或更多。在若干实施例中,CD3 ζ 跨膜结构域与效应子结构域偶联,效应子结构域包含CD16、NCR1、NCR2、NCR3、4-1BB、Nkp80、FcR γ 、CD3 ζ 和2B4中的一个或多个。

[0155] 在若干实施例中,嵌合受体包含CD28结构域。在若干实施例中,跨膜结构域包含CD28,而在一些实施例中,CD28结构域是胞内信号传导结构域,而在一些实施例中,CD28结构域是跨膜/胞内信号传导结构域。在若干实施例中,CD28跨膜结构域具有SEQ ID NO.105的序列。在一些实施例中,CD28跨膜结构域可以被截短或修饰,使得其与具有SEQ ID NO.105的序列的CD28具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%的同源性。在若干实施例中,CD28胞内信号传导结构域具有SEQ ID NO.106的序列。在一些实施例中,CD28胞内信号传导结构域可以被截短或修饰,使得其与具有SEQ ID NO.106的序列的CD28具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%的同源性。在若干实施例中,CD28用作构建体中的唯一跨膜/信号传导结构域,然而,在若干实施例中,CD28可与一个或多个其他结构域一起使用。例如,在一些实施例中使用CD28、OX40、4-1BB和/或CD3 ζ 的组合。

[0156] 在若干实施例中,嵌合受体包含OX40结构域。在若干实施例中,OX40结构域是胞内信号传导结构域。在若干实施例中,OX40胞内信号传导结构域具有SEQ ID NO.107的序列。在一些实施例中,OX40胞内信号传导结构域可以被截短或修饰,使得其与具有SEQ ID NO.107的序列的OX40具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%的同源性。在若干实施例中,OX40用作构建体中的唯一跨膜/信号传导结构域,然而,在若干实施例中,OX40可与一个或多个其他结构域一起使用。例如,在一些实施例中使用CD28、OX40、

4-1BB和/或CD3 ζ 的组合。

[0157] 在更进一步的实施例中,嵌合受体的信号传导部分包含ITAM的部分,例如半-tam。在若干实施例中,这些部分不构成经典的ITAM序列,但是包含仍然可以传递NK细胞细胞毒性所需信号的部分。在若干实施例中,半-tam具有SEQ ID NO.14的序列(其中X可以是任何残基)。在一些实施例中,半-tam可以被截短或修饰,使得其与具有SEQ ID NO.14的序列的半-tam具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%的同源性。在一些实施例中,嵌合受体构建体包含SEQ ID NO.14的半-tam。在若干实施例中,可以使用多个半-tam,例如以头对尾、尾对头、头对头或尾对尾的配置。在一些实施例中,至少一个半-tam的存在使得包含使用至少一个半-tam的嵌合受体的NK细胞的信号传导和细胞毒性增强。如下文更详细讨论的,在若干嵌合受体中包含NKp80,其是半-tam的一个非限制性实例。

[0158] 在若干实施例中,使用另外的信号传导区域,包括例如衍生自信号传导淋巴细胞活化分子(SLAM)家族的受体的信号传导区域。这些受体包括但不限于2B4(如上所述)。SLAM家族的受体在其细胞质尾部中具有基于酪氨酸的共有基序。该基序是S/TxYxxL/I,其被称为基于免疫受体酪氨酸的开关基序(ITSM)(SEQ ID NO.15)。这些受体通过SLAM相关蛋白(SAP,由基因SH2D1A编码)传递活化信号,SAP募集酪氨酸激酶Fyn。因此,根据若干实施例,信号传导区域包含含有ITSM基序的多肽序列(或编码其的核酸)。在若干实施例中,ITSM基序不需要完全编码,但信号传导区域能够通过SAP(或另一种类似途径)传递活化信号。在若干实施例中,ITSM基序具有SEQ ID NO.15的序列(其中X可以是任何氨基酸残基)。在若干实施例中,ITSM基序可被截短或修饰,使得其与具有SEQ ID NO.15的序列的ITSM基序具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%的同源性。在若干实施例中,ITSM基序包含SEQ ID NO.15的序列。

[0159] 除了NKG2D受体、跨膜结构域和信号传导结构域(和组合跨膜/信号传导结构域)的这些变异之外,在一些实施例中,还可以提供另外的共活化分子。例如,在若干实施例中,NK细胞经工程改造以表达膜结合的白细胞介素15(mbIL15)。在此类实施例中,NK细胞上mbIL15的存在通过协同增强NK细胞的增殖和寿命而进一步增强NK细胞的细胞毒性作用。在若干实施例中,mbIL15具有SEQ ID NO.16的核酸序列。在一些实施例中,mbIL15可以被截短或修饰,使得其与SEQ ID NO.16的序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%的同源性。在若干实施例中,mbIL15具有SEQ ID NO.17的氨基酸序列。结合本文公开的嵌合受体,这些实施例提供了特别有效的NK细胞组合物,用于靶向和破坏特定的靶细胞。

[0160] 嵌合受体构建体

[0161] 鉴于本文提供的披露,存在多种嵌合受体,其可以在NK细胞中产生和表达,以靶向和破坏特定的靶细胞,例如患病细胞或癌细胞。下文更详细地讨论了此类嵌合受体的非限制性实例。

[0162] 如上所述,T细胞受体复合物的部分,特别是CD3 ζ ,充当免疫信号级联的有效活化剂。同样,受体4-1BB(肿瘤坏死因子超家族成员)在配体结合后活化NK细胞。在若干实施例中,这两种信号传导组分在配体与嵌合受体结合后以协同方式起作用活化NK细胞。因此,在若干实施例中,提供了编码NKG2D/CD8a/4-1BB/CD3 ζ 嵌合受体的多核苷酸,该嵌合受体包含与NKG2D的天然配体结合的NKG2D片段胞外受体结构域、CD8跨膜区和包含4-1BB和CD3 ζ 的信

号传导结构域的效应子结构域。在一个实施例中,该嵌合受体由SEQ ID NO:18的核酸序列编码。在一个实施例中,该嵌合受体由SEQ ID NO:108的核酸序列编码。在另一个实施例中,NKG2D-CD8a-4-1BB-CD3 ζ 嵌合受体包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列。在若干实施例中,当NK细胞同时表达mbIL15时,该构建体特别有效,mbIL15对NK细胞的活化和细胞毒性提供进一步的协同效应。在一些实施例中,嵌合受体的序列可以不同于SEQ ID NO.18(例如,SEQ ID NO:108),但取决于实施例,与SEQ ID NO.18保留至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%同源。在若干实施例中,嵌合受体可以不同于SEQ ID NO.18(例如,SEQ ID NO:108),嵌合受体保留NK细胞活化和/或细胞毒性功能或在一些实施例中具有增强的NK细胞活化和/或细胞毒性功能。

[0163] 受体2B4具有若干种基于免疫受体酪氨酸的开关基序(ITSM),并具有转导活化信号的潜力。同样,通过受体4-1BB(肿瘤坏死因子超家族成员)的信号传导也在配体结合后活化NK细胞。因此,在一些实施例中,利用这些信号传导分子协同产生出人意料地有效的细胞毒性NK细胞的能力,提供了编码NKG2D/CD8a/2B4/4-1BB嵌合受体的多核苷酸,该嵌合受体包含与NKG2D的天然配体结合的NKG2D片段胞外受体结构域、CD8a跨膜区和包含4-1BB和2B4的信号传导结构域的效应子结构域。另外,在若干实施例中,该构建体可任选地与mbIL15共表达。

[0164] 在若干实施例中,2B4与CD3 ζ 的组合与NK细胞一起使用以产生针对靶细胞的增强的细胞毒性。因此,在若干实施例中,提供了编码NKG2D/CD8a/2B4/CD3 ζ 嵌合受体的多核苷酸,该嵌合受体包含与NKG2D的天然配体结合的NKG2D片段胞外受体结构域、CD8a跨膜区和包含CD3 ζ 和2B4的信号传导结构域的效应子结构域。另外,在若干实施例中,该构建体可任选地与mbIL15共表达。如上所述,4-1BB与CD3 ζ 和2B4一样可以作为免疫信号级联的有效活化剂起作用。在若干实施例中,这三种信号传导组分在配体与嵌合受体结合后以协同方式起作用活化NK细胞。因此,在若干实施例中,提供了编码NKG2D/CD8a/4-1BB/2B4/CD3 ζ 嵌合受体的多核苷酸,该嵌合受体包含与NKG2D的天然配体结合的NKG2D片段胞外受体结构域、CD8跨膜区和包含4-1BB、2B4和CD3 ζ 的信号传导结构域的效应子结构域。在一个实施例中,该嵌合受体由SEQ ID NO:58的核酸序列编码。在另一个实施例中,NKG2D-CD8a-4-1BB-CD3 ζ 嵌合受体包含SEQ ID NO:59的氨基酸序列。在若干实施例中,当NK细胞同时表达mbIL15时,该构建体特别有效,mbIL15对NK细胞的活化和/或细胞毒性提供进一步的协同效应。在一些实施例中,嵌合受体的序列可以不同于SEQ ID NO.58,但取决于实施例,与SEQ ID NO.58保留至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%同源。在若干实施例中,嵌合受体可以不同于SEQ ID NO.58,嵌合受体保留NK细胞活化和/或细胞毒性功能或在一些实施例中具有增强的NK细胞活化和/或细胞毒性功能。

[0165] 在若干可替代的实施例中,提供了编码NKG2D/CD8a/DAP10/4-1BB嵌合受体的多核苷酸,该嵌合受体包含与NKG2D的天然配体结合的NKG2D片段胞外受体结构域、CD8a跨膜区和包含4-1BB和DAP10的信号传导结构域的效应子结构域。在一个实施例中,该嵌合受体由SEQ ID NO:60的核酸序列编码。在另一个实施例中,NKG2D-CD8a-4-1BB-DAP10嵌合受体包含SEQ ID NO:61的氨基酸序列。另外,在若干实施例中,该构建体可任选地与mbIL15共表达。在若干实施例中,当NK细胞同时表达mbIL15时,该构建体特别有效,mbIL15对NK细胞的活化和细胞毒性提供进一步的协同效应。在一些实施例中,嵌合受体的序列可以不同于SEQ

ID NO.60,但取决于实施例,与SEQ ID NO.60保留至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%同源。在若干实施例中,嵌合受体可以不同于SEQ ID NO.60,嵌合受体保留NK细胞活化和/或细胞毒性功能或在一些实施例中具有增强的NK细胞活化和/或细胞毒性功能。此外,如上所述,2B4与DAP10和4-1BB一样是免疫信号级联的有效活化剂。在若干实施例中,这三种信号传导组分在配体与嵌合受体结合后以协同方式起作用活化NK细胞。因此,在若干实施例中,提供了编码NKG2D/CD8a/4-1BB/DAP10/2B4嵌合受体的多核苷酸,该嵌合受体包含与NKG2D的天然配体结合的NKG2D片段胞外受体结构域、CD8跨膜区和包含4-1BB、2B4和DAP10的信号传导结构域的效应子结构域,其中4-1BB之后是DAP10,DAP10之后是2B4。在一个实施例中,该嵌合受体由SEQ ID NO:62的核酸序列编码。在另一个实施例中,NKG2D-CD8a-4-1BB-CD3 ζ 嵌合受体包含SEQ ID NO:63的氨基酸序列。在若干实施例中,当NK细胞同时表达mbIL15时,该构建体特别有效,mbIL15对NK细胞的活化和细胞毒性提供进一步的协同效应。在一些实施例中,嵌合受体的序列可以不同于SEQ ID NO.62,但取决于实施例,与SEQ ID NO.62保留至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%同源。在若干实施例中,嵌合受体可以不同于SEQ ID NO.62,嵌合受体保留NK细胞活化和/或细胞毒性功能或在一些实施例中具有增强的NK细胞活化和/或细胞毒性功能。在若干其他实施例中,提供了编码NKG2D/CD8a/4-1BB/2B4/DAP10嵌合受体的多核苷酸,该嵌合受体包含与NKG2D的天然配体结合的NKG2D片段胞外受体结构域、CD8跨膜区和包含4-1BB、2B4和DAP10的信号传导结构域的效应子结构域,其中4-1BB之后是2B4,2B4之后是DAP10。在一个实施例中,该嵌合受体由SEQ ID NO:64的核酸序列编码。在另一个实施例中,NKG2D-CD8a-4-1BB-CD3 ζ 嵌合受体包含SEQ ID NO:65的氨基酸序列。在若干实施例中,当NK细胞同时表达mbIL15时,该构建体特别有效,mbIL15对NK细胞的活化和细胞毒性提供进一步的协同效应。在一些实施例中,嵌合受体的序列可以不同于SEQ ID NO.64,但取决于实施例,与SEQ ID NO.64保留至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%同源。在若干实施例中,嵌合受体可以不同于SEQ ID NO.64,嵌合受体保留NK细胞活化和/或细胞毒性功能或在一些实施例中具有增强的NK细胞活化和/或细胞毒性功能。

[0166] 在若干另外的实施例中,嵌合受体的跨膜和效应子结构域(和相关功能)衍生自相同的肽。CD16是在NK细胞表面上表达的有效活化受体。因此,在若干实施例中,提供了编码NKG2D/CD16嵌合受体的多核苷酸,该嵌合受体包含与NKG2D的天然配体结合的NKG2D片段胞外受体结构域和包含跨膜区和胞内效应子结构域的CD16肽。在一个实施例中,该嵌合受体包含SEQ ID NO:23的核酸序列。在另一个实施例中,该嵌合受体由SEQ ID NO:24的氨基酸序列编码。在一些实施例中,嵌合受体的序列可以不同于SEQ ID NO.23,但取决于实施例,与SEQ ID NO.23保留至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%同源。在若干实施例中,嵌合受体可以不同于SEQ ID NO.23,嵌合受体保留NK细胞活化和/或细胞毒性功能或在一些实施例中具有增强的NK细胞活化和/或细胞毒性功能。另外,在若干实施例中,该构建体可任选地与mbIL15共表达。

[0167] 在若干另外的实施例中,提供了编码NKG2D/CD16/4-1BB嵌合受体的多核苷酸,其中4-1BB的信号传导结构域作为效应子结构域中活化信号的第二传感器。另外,在若干实施例中,该构建体可任选地与mbIL15共表达。

[0168] CD3 ζ 通过其跨膜结构域二聚化。因此,在若干实施例中,提供了嵌合受体,其中CD3

ζ跨膜结构域将全长CD3ζ分子募集至突触。在若干实施例中,提供了编码嵌合受体的多核苷酸,该嵌合受体包含与NKG2D的天然配体结合的NKG2D片段,CD8a铰链,与CD3ζ跨膜结构域直接相邻的0、1、2、3、4、5、6或更多个胞外CD3ζ残基(“近膜部分”),和包含CD16、NCR1、NCR2、NCR3、4-1BB、NKp80、FcR γ、CD3ζ和2B4中的一个或多个的效应子结构域。

[0169] 在若干实施例中,提供了嵌合受体,其中CD3ζ跨膜结构域与包含4-1BB和CD16中的一者或两者的效应子结构域偶联。因此,在若干实施例中,提供了编码NKG2D/CD3ζTM/4-1BB嵌合受体的多核苷酸,其包含密码子优化的与CD8a铰链偶联的NKG2D片段、CD3ζ跨膜区和包含4-1BB的效应子结构域。在一个实施例中,该嵌合受体包含SEQ ID NO:78的核酸序列。在另一个实施例中,该嵌合受体由SEQ ID NO:79的氨基酸序列编码。在一些实施例中,嵌合受体的序列可以不同于SEQ ID NO.78,但取决于实施例,与SEQ ID NO.78保留至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%同源。在若干实施例中,嵌合受体可以不同于SEQ ID NO.78,嵌合受体保留NK细胞活化和/或细胞毒性功能或在一些实施例中具有增强的NK细胞活化和/或细胞毒性功能。另外,在若干实施例中,该构建体可任选地与mbIL15共表达。

[0170] 在若干实施例中,提供了编码NKG2D/CD3ζTM/CD16/4-1BB嵌合受体的多核苷酸,其包含密码子优化的与CD8a铰链偶联的NKG2D片段、CD3ζ跨膜区和包含CD16随后是4-1BB的效应子结构域。在一个实施例中,该嵌合受体包含SEQ ID NO:70的核酸序列。在另一个实施例中,该嵌合受体由SEQ ID NO:71的氨基酸序列编码。在一些实施例中,嵌合受体的序列可以不同于SEQ ID NO.70,但取决于实施例,与SEQ ID NO.70保留至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%同源。在若干实施例中,嵌合受体可以不同于SEQ ID NO.70,嵌合受体保留NK细胞活化和/或细胞毒性功能或在一些实施例中具有增强的NK细胞活化和/或细胞毒性功能。另外,在若干实施例中,该构建体可任选地与mbIL15共表达。此外,在若干实施例中,提供了编码NKG2D/CD3ζTM/4-1BB/CD16嵌合受体的多核苷酸,其包含密码子优化的与CD8a铰链偶联的NKG2D片段、CD3ζ跨膜区和包含4-1BB随后是CD16的效应子结构域。在一些实施例中,效应子结构域还包含GS3接头。在一些实施例中,GS3接头位于4-1BB和CD16之间。在一个实施例中,该嵌合受体包含SEQ ID NO:84的核酸序列。在另一个实施例中,该嵌合受体由SEQ ID NO:85的氨基酸序列编码。在一些实施例中,嵌合受体的序列可以不同于SEQ ID NO.84,但取决于实施例,与SEQ ID NO.84保留至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%同源。在若干实施例中,嵌合受体可以不同于SEQ ID NO.84,嵌合受体保留NK细胞活化和/或细胞毒性功能或在一些实施例中具有增强的NK细胞活化和/或细胞毒性功能。另外,在若干实施例中,该构建体可任选地与mbIL15共表达。此外,在若干实施例中,提供了编码NKG2Dx2/CD3ζTM/CD16/4-1BB嵌合受体的多核苷酸,其包含密码子优化的与GS3接头偶联的NKG2D片段、另外的NKG2D片段、CD8a铰链、CD3ζ跨膜区和包含CD16和4-1BB的效应子结构域。在一个实施例中,该嵌合受体包含SEQ ID NO:72的核酸序列。在另一个实施例中,该嵌合受体由SEQ ID NO:73的氨基酸序列编码。在一些实施例中,嵌合受体的序列可以不同于SEQ ID NO.72,但取决于实施例,与SEQ ID NO.72保留至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%同源。在若干实施例中,嵌合受体可以不同于SEQ ID NO.72,嵌合受体保留NK细胞活化和/或细胞毒性功能或在一些实施例中具有增强的NK细胞活化和/或细胞毒性功能。另外,在若干实施例中,该构建体可任选

地与mbIL15共表达。

[0171] 在若干实施例中,提供了嵌合受体,其中CD3 ζ 跨膜结构域与包含NKp80的效应子结构域偶联。因此,在若干实施例中,提供了编码NKG2D/CD3 ζ TM/CD16/4-1BB/NKp80嵌合受体的多核苷酸,该嵌合受体包含与CD8a铰链偶联的NKG2D片段、CD3 ζ 跨膜区和包含CD16、4-1BB和NKp80的效应子结构域。在一些实施例中,效应子结构域还包含GS3接头。在一些实施例中,GS3接头位于4-1BB和NKp80之间。在一个实施例中,该嵌合受体包含SEQ ID NO:74的核酸序列。在另一个实施例中,该嵌合受体由SEQ ID NO:75的氨基酸序列编码。在一些实施例中,嵌合受体的序列可以不同于SEQ ID NO.74,但取决于实施例,与SEQ ID NO.74保留至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%同源。在若干实施例中,嵌合受体可以不同于SEQ ID NO.74,嵌合受体保留NK细胞活化和/或细胞毒性功能或在一些实施例中具有增强的NK细胞活化和/或细胞毒性功能。另外,在若干实施例中,该构建体可任选地与mbIL15共表达。此外,在若干实施例中,提供了编码2xNKG2D/CD3 ζ TM/CD16/4-1BB/NKp80嵌合受体的多核苷酸,其包含密码子优化的与GS3接头偶联的NKG2D片段、另外的NKG2D片段、CD8a铰链、CD3 ζ 跨膜区和包含CD16、4-1BB和NKp80的效应子结构域。在一些实施例中,效应子结构域还包含GS3接头。在一些实施例中,GS3接头位于4-1BB和NKp80之间。在一个实施例中,该嵌合受体包含SEQ ID NO:76的核酸序列。在另一个实施例中,该嵌合受体由SEQ ID NO:77的氨基酸序列编码。在一些实施例中,嵌合受体的序列可以不同于SEQ ID NO.76,但取决于实施例,与SEQ ID NO.76保留至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%同源。在若干实施例中,嵌合受体可以不同于SEQ ID NO.76,嵌合受体保留NK细胞活化和/或细胞毒性功能或在一些实施例中具有增强的NK细胞活化和/或细胞毒性功能。另外,在若干实施例中,该构建体可任选地与mbIL15共表达。此外,在若干实施例中,提供了编码NKG2D/CD3 ζ TM/4-1BB/NKp80嵌合受体的多核苷酸,其包含密码子优化的与CD8a铰链偶联的NKG2D片段、CD3 ζ 跨膜区和包含4-1BB和NKp80的效应子结构域。在一些实施例中,效应子结构域还包含GS3接头。在一些实施例中,GS3接头位于4-1BB和NKp80之间。在一个实施例中,该嵌合受体包含SEQ ID NO:82的核酸序列。在另一个实施例中,该嵌合受体由SEQ ID NO:83的氨基酸序列编码。在一些实施例中,嵌合受体的序列可以不同于SEQ ID NO.82,但取决于实施例,与SEQ ID NO.82保留至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%同源。在若干实施例中,嵌合受体可以不同于SEQ ID NO.82,嵌合受体保留NK细胞活化和/或细胞毒性功能或在一些实施例中具有增强的NK细胞活化和/或细胞毒性功能。另外,在若干实施例中,该构建体可任选地与mbIL15共表达。

[0172] 在若干实施例中,提供了嵌合受体,其中CD3 ζ 跨膜结构域与包含CD3 ζ 的效应子结构域偶联。因此,在若干实施例中,提供了编码NKG2D/CD3 ζ TM/4-1BB/CD3 ζ 嵌合受体的多核苷酸,其包含密码子优化的与CD8a铰链偶联的NKG2D片段、CD3 ζ 跨膜区和包含4-1BB和CD3 ζ 的效应子结构域。在一个实施例中,该嵌合受体包含SEQ ID NO:80的核酸序列。在另一个实施例中,该嵌合受体由SEQ ID NO:81的氨基酸序列编码。在一些实施例中,嵌合受体的序列可以不同于SEQ ID NO.80,但取决于实施例,与SEQ ID NO.80保留至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%同源。在若干实施例中,嵌合受体可以不同于SEQ ID NO.80,嵌合受体保留NK细胞活化和/或细胞毒性功能或在一些实施例中具有增强的NK细胞活化和/或细胞毒性功能。另外,在若干实施例中,该构建体可任选地与mbIL15共表达。

[0173] 在若干实施例中,提供了嵌合受体,其中CD3 ζ 跨膜结构域与包含FcR γ 的效应子结构域偶联。因此,在若干实施例中,提供了编码NKG2D/CD3 ζ TM/4-1BB/FcR γ 嵌合受体的多核苷酸,其包含与CD8a铰链偶联的NKG2D片段、CD3 ζ 跨膜区和包含4-1BB和FcR γ 的效应子结构域。在一个实施例中,该嵌合受体包含SEQ ID NO:86的核酸序列。在另一个实施例中,该嵌合受体由SEQ ID NO:87的氨基酸序列编码。在一些实施例中,嵌合受体的序列可以不同于SEQ ID NO.86,但取决于实施例,与SEQ ID NO.86保留至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%同源。在若干实施例中,嵌合受体可以不同于SEQ ID NO.86,嵌合受体保留NK细胞活化和/或细胞毒性功能或在一些实施例中具有增强的NK细胞活化和/或细胞毒性功能。另外,在若干实施例中,该构建体可任选地与mbIL15共表达。

[0174] 在若干实施例中,提供了嵌合受体,其中CD3 ζ 跨膜结构域与包含CD28的效应子结构域偶联。因此,在若干实施例中,提供了编码NKG2D/CD3 ζ TM/CD28/CD3 ζ 嵌合受体的多核苷酸,该嵌合受体包含与NKG2D的天然配体结合的NKG2D片段胞外受体结构域、CD8a铰链、CD3 ζ 跨膜区和包含CD28和CD3 ζ 的胞内效应子结构域。在一个实施例中,该嵌合受体包含SEQ ID NO:102的核酸序列。在另一个实施例中,该嵌合受体由SEQ ID NO:103的氨基酸序列编码。在一些实施例中,嵌合受体的序列可以不同于SEQ ID NO.102,但取决于实施例,与SEQ ID NO.102保留至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%同源。在若干实施例中,嵌合受体可以不同于SEQ ID NO.102,嵌合受体保留NK细胞活化和/或细胞毒性功能或在一些实施例中具有增强的NK细胞活化和/或细胞毒性功能。另外,在若干实施例中,该构建体可任选地与mbIL15共表达。

[0175] 在若干实施例中,提供了嵌合受体,其中胞外结构域包含偶联IL15的NKG2D片段。因此,在若干实施例中,提供了编码IL15/NKG2D/CD8a/4-1BB/CD3 ζ 嵌合受体的多核苷酸,该嵌合受体包含与NKG2D的天然配体(其与IL-15连接)结合的NKG2D片段胞外受体结构域、CD8a铰链、CD8a跨膜结构域、和包含4-1BB和CD3 ζ 的胞内效应子结构域。在一些实施例中,胞外结构域还包含GS3接头。在一些实施例中,GS3接头位于IL15和NKG2D片段胞外受体结构域之间。在一个实施例中,该嵌合受体包含SEQ ID NO:88的核酸序列。在另一个实施例中,该嵌合受体由SEQ ID NO:89的氨基酸序列编码。在一些实施例中,嵌合受体的序列可以不同于SEQ ID NO.88,但取决于实施例,与SEQ ID NO.88保留至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%同源。在若干实施例中,嵌合受体可以不同于SEQ ID NO.88,嵌合受体保留NK细胞活化和/或细胞毒性功能或在一些实施例中具有增强的NK细胞活化和/或细胞毒性功能。

[0176] 在若干实施例中,提供了嵌合受体,其中胞外结构域包含偶联IgG4短铰链的NKG2D片段。因此,在若干实施例中,提供了编码NKG2D/IgG4/CD8a/4-1BB/CD3 ζ 嵌合受体的多核苷酸,该嵌合受体包含与NKG2D的天然配体结合的NKG2D片段胞外受体结构域、IgG4短铰链、CD8a跨膜结构域和包含4-1BB和CD3 ζ 的胞内效应子结构域。在一个实施例中,该嵌合受体包含SEQ ID NO:96的核酸序列。在另一个实施例中,该嵌合受体由SEQ ID NO:97的氨基酸序列编码。在一些实施例中,嵌合受体的序列可以不同于SEQ ID NO.96,但取决于实施例,与SEQ ID NO.96保留至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%同源。在若干实施例中,嵌合受体可以不同于SEQ ID NO.96,嵌合受体保留NK细胞活化和/或细胞毒性功能或在一些实施例中具有增强的NK细胞活化和/或细胞毒性功能。另外,在若干实施例

中,该构建体可任选地与mbIL15共表达。

[0177] 在若干实施例中,提供了嵌合受体,其中效应子结构域包含OX40。因此,在若干实施例中,提供了编码NKG2D/CD8a/OX40/CD3 ζ 嵌合受体的多核苷酸,该嵌合受体包含与NKG2D的天然配体结合的NKG2D片段胞外受体结构域、CD8a铰链、CD8a跨膜结构域和包含OX40和CD3 ζ 的胞内效应子结构域。在一个实施例中,该嵌合受体包含SEQ ID NO:90的核酸序列。在另一个实施例中,该嵌合受体由SEQ ID NO:91的氨基酸序列编码。在一些实施例中,嵌合受体的序列可以不同于SEQ ID NO.90,但取决于实施例,与SEQ ID NO.90保留至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%同源。在若干实施例中,嵌合受体可以不同于SEQ ID NO.90,嵌合受体保留NK细胞活化和/或细胞毒性功能或在一些实施例中具有增强的NK细胞活化和/或细胞毒性功能。另外,在若干实施例中,该构建体可任选地与mbIL15共表达。在若干实施例中,提供了编码NKG2D/IgG4/CD8a/OX40/CD3 ζ 嵌合受体的多核苷酸,该嵌合受体包含与NKG2D的天然配体结合的NKG2D片段胞外受体结构域、IgG4铰链、CD8a跨膜结构域和包含OX40和CD3 ζ 的胞内效应子结构域。在一个实施例中,该嵌合受体包含SEQ ID NO:100的核酸序列。在另一个实施例中,该嵌合受体由SEQ ID NO:101的氨基酸序列编码。在一些实施例中,嵌合受体的序列可以不同于SEQ ID NO.100,但取决于实施例,与SEQ ID NO.100保留至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%同源。在若干实施例中,嵌合受体可以不同于SEQ ID NO.100,嵌合受体保留NK细胞活化和/或细胞毒性功能或在一些实施例中具有增强的NK细胞活化和/或细胞毒性功能。另外,在若干实施例中,该构建体可任选地与mbIL15共表达。

[0178] 在若干实施例中,提供了包含CD28肽的嵌合受体,该CD28肽包含跨膜区和胞内效应子结构域。因此,在若干实施例中,提供了编码NKG2D/CD28/CD3 ζ 嵌合受体的多核苷酸,该嵌合受体包含与NKG2D的天然配体结合的NKG2D片段胞外受体结构域、CD8a铰链、CD28跨膜/胞内结构域和CD3 ζ 。在一个实施例中,该嵌合受体包含SEQ ID NO:92的核酸序列。在另一个实施例中,该嵌合受体由SEQ ID NO:93的氨基酸序列编码。在一些实施例中,嵌合受体的序列可以不同于SEQ ID NO.92,但取决于实施例,与SEQ ID NO.92保留至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%同源。在若干实施例中,嵌合受体可以不同于SEQ ID NO.92,嵌合受体保留NK细胞活化和/或细胞毒性功能或在一些实施例中具有增强的NK细胞活化和/或细胞毒性功能。另外,在若干实施例中,该构建体可任选地与mbIL15共表达。在进一步的实施例中,提供了编码NKG2D/CD28/CD3 ζ /4-1BB嵌合受体的多核苷酸,该嵌合受体包含与NKG2D的天然配体结合的NKG2D片段胞外受体结构域、CD8a铰链、CD28跨膜/胞内结构域和4-1BB与CD3 ζ 。在一个实施例中,该嵌合受体包含SEQ ID NO:94的核酸序列。在另一个实施例中,该嵌合受体由SEQ ID NO:95的氨基酸序列编码。在一些实施例中,嵌合受体的序列可以不同于SEQ ID NO.94,但取决于实施例,与SEQ ID NO.94保留至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%同源。在若干实施例中,嵌合受体可以不同于SEQ ID NO.94,嵌合受体保留NK细胞活化和/或细胞毒性功能或在一些实施例中具有增强的NK细胞活化和/或细胞毒性功能。另外,在若干实施例中,该构建体可任选地与mbIL15共表达。在进一步的实施例中,提供了编码NKG2D/IgG4/CD28/CD3 ζ 嵌合受体的多核苷酸,该嵌合受体包含与NKG2D的天然配体结合的NKG2D片段胞外受体结构域、IgG4铰链、CD28跨膜/胞内结构域和CD3 ζ 。在一个实施例中,该嵌合受体包含SEQ ID NO:98的核酸序列。在另一个

实施例中,该嵌合受体由SEQ ID NO:99的氨基酸序列编码。在一些实施例中,嵌合受体的序列可以不同于SEQ ID NO.98,但取决于实施例,与SEQ ID NO.98保留至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%同源。在若干实施例中,嵌合受体可以不同于SEQ ID NO.98,嵌合受体保留NK细胞活化和/或细胞毒性功能或在一些实施例中具有增强的NK细胞活化和/或细胞毒性功能。另外,在若干实施例中,该构建体可任选地与mbIL15共表达。

[0179] NCR1 (NKp46)、NCR2 (NKp44) 和NCR3 (NKp30) 是NK细胞上的受体,其在配体结合后转导活化信号。因此,在若干实施例中,提供了编码NKG2D/NCR1嵌合受体的多核苷酸,该嵌合受体包含与NKG2D的天然配体结合的NKG2D片段胞外受体结构域和包含跨膜区和胞内效应子结构域的NCR1肽。在一个实施例中,该嵌合受体包含SEQ ID NO:27的核酸序列。在另一个实施例中,该嵌合受体由SEQ ID NO:28的氨基酸序列编码。在一些实施例中,嵌合受体的序列可以不同于SEQ ID NO.30,但取决于实施例,与SEQ ID NO.27保留至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%同源。在若干实施例中,嵌合受体可以不同于SEQ ID NO.27,嵌合受体保留NK细胞活化和/或细胞毒性功能或在一些实施例中具有增强的NK细胞活化和/或细胞毒性功能。另外,在若干实施例中,该构建体可任选地与mbIL15共表达。

[0180] 在若干另外的实施例中,提供了编码NKG2D/NCR1/4-1BB嵌合受体的多核苷酸,其中4-1BB的信号传导结构域作为效应子结构域中活化信号的第二传感器,导致协同增强的NK细胞活化和细胞毒性。在若干另外的实施例中,提供了编码NKG2D/NCR2嵌合受体的多核苷酸,该嵌合受体包含与NKG2D的天然配体结合的NKG2D片段胞外受体结构域和包含跨膜区和胞内效应子结构域的NCR2肽。如具有NCR1一样,在若干实施例中,这些构建体特别适用于产生表达嵌合受体的NK细胞,因为它们的序列相对较小且简单。然而,在若干实施例中,它们保留了产生高效NK细胞的能力,尽管构建体明显简单。另外,在若干实施例中,这些构建体可任选地与mbIL15共表达。

[0181] 在若干另外的实施例中,提供了编码NKG2D/NCR3嵌合受体的多核苷酸,该嵌合受体包含与NKG2D的天然配体结合的NKG2D片段胞外受体结构域和包含跨膜区和胞内效应子结构域的NCR3肽。如具有NCR1和/或NCR2一样,在若干实施例中,这些构建体特别适用于产生表达嵌合受体的NK细胞,因为它们的序列相对较小且简单。然而,在若干实施例中,它们保留了产生高效NK细胞的能力,尽管构建体明显简单。在一个实施例中,该嵌合受体包含SEQ ID NO:29的核酸序列。在另一个实施例中,该嵌合受体由SEQ ID NO:30的氨基酸序列编码。在一些实施例中,嵌合受体的序列可以不同于SEQ ID NO.29,但取决于实施例,与SEQ ID NO.29保留至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%同源。在若干实施例中,嵌合受体可以不同于SEQ ID NO.29,嵌合受体保留NK细胞活化和/或细胞毒性功能或在一些实施例中具有增强的NK细胞活化和/或细胞毒性功能。另外,在若干实施例中,该构建体可任选地与mbIL15共表达。

[0182] 在若干另外的实施例中,提供了编码NKG2D/NCR2/4-1BB嵌合受体的多核苷酸,其中4-1BB的信号传导结构域作为效应子结构域中活化信号的第二传感器,从而导致信号传导结构域之间的协同效应,并出乎意料地有效地导致细胞毒性NK细胞。另外,在若干实施例中,该构建体可任选地与mbIL15共表达。

[0183] 在若干另外的实施例中,提供了编码NKG2D/NCR3/4-1BB嵌合受体的多核苷酸,其中4-1BB的信号传导结构域作为效应子结构域中活化信号的第二传感器,从而导致信号传

导结构域之间的协同效应,并出乎意料地有效地导致细胞毒性NK细胞。另外,在若干实施例中,该构建体可任选地与mbIL15共表达。

[0184] 在一些实施例中,本文披露的嵌合受体的表面表达和功效通过间隔区(铰链)的变化而增强,该隔区(铰链)在一些实施例中位于NKG2D片段和跨膜结构域之间的胞外结构域中。在一些实施例中,铰链区可以包含在嵌合受体的其他部分之间(例如,在胞内结构域和跨膜结构域之间,或在多个胞内结构域之间)。在一些实施例中,用于本文其他地方披露的某些目的的结构域可以提供额外的功能。例如,在若干实施例中,CD8a被重新目的化以用作铰链区(在若干实施例中,由SEQ ID NO:5的核酸序列编码)。在另一个实施例中,铰链区包含N末端截短形式的CD8a和/或C末端截短形式的CD8a。取决于实施例,这些截短可以与SEQ ID NO.5编码的铰链至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%或至少约90%同源。在若干另外的实施例中,铰链包含甘氨酸和丝氨酸残基的跨度(本文称为“GS接头”),其中GS_n代表序列(Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)_n(SEQ ID NO.42)。在一个实施例中,铰链包含CD8a和GS3,并且由SEQ ID NO:32的氨基酸序列编码,例如,其中n=3。在另外的实施例中,取决于实施例,n的值可以等于1、2、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15或更大。在若干实施例中,铰链也可以构造为GS_n/CD8a。或者,GS接头可包含整个铰链区。在一个这样的实施例中,铰链区由SEQ ID NO:33的核酸序列编码。在另一个这样的实施例中,铰链区由SEQ ID NO:34的核酸序列编码。在若干实施例中,IgG4被重新目的化用作铰链区(在若干实施例中,由SEQ ID NO:104的核酸序列编码)。在另一个实施例中,铰链区包含N末端截短形式的IgG4和/或C末端截短形式的IgG4。取决于实施例,这些截短可以与SEQ ID NO.104编码的铰链至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%或至少约90%同源。

[0185] 在若干实施例中,嵌合受体构建体使用2B4胞内信号传导结构域。在若干实施例中,该结构域由SEQ ID NO.35的氨基酸序列编码。在一些实施例中,2B4结构域由SEQ ID NO.36的核酸序列编码。在一些实施例中,嵌合受体中使用的2B4胞内结构域的序列可以不同于SEQ ID NO.36,但取决于实施例,与SEQ ID NO.36保留至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%同源。在若干实施例中,虽然嵌合受体的信号传导结构域可以不同于SEQ ID NO.36,但嵌合受体保留NK细胞活化和/或细胞毒性功能或在一些实施例中具有增强的NK细胞活化和/或细胞毒性功能。同样地,在若干实施例中,在若干实施例中使用NKp80胞内结构域。在一些实施例中,NKp80结构域是唯一的胞内信号传导结构域,而在一些实施例中,该结构域与一个或多个另外的结构域结合使用。在若干实施例中,NKp80由SEQ ID NO.37的氨基酸序列编码。在一些实施例中,NKp80结构域由SEQ ID NO.38的核酸序列编码。在一些实施例中,嵌合受体中使用的NKp80胞内结构域的序列可以不同于SEQ ID NO.38,但取决于实施例,与SEQ ID NO.38保留至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%同源。在若干实施例中,虽然嵌合受体的信号传导结构域可以不同于SEQ ID NO.38,但嵌合受体保留NK细胞活化和/或细胞毒性功能或在一些实施例中具有增强的NK细胞活化和/或细胞毒性功能。

[0186] 在一些实施例中,嵌合受体使用β-肾上腺素能受体的一部分作为跨膜结构域。在若干实施例中,该部分包含β-肾上腺素能胞外结构域的一部分。在若干实施例中,该部分是β-肾上腺素能受体跨膜结构域的一部分。在若干实施例中,使用β肾上腺素能受体的胞外结构域和跨膜结构域的组合。根据实施例,所述部分来自β-1和/或β-2肾上腺素能受体。在若

干实施例中,使用 β -2肾上腺素能受体的N-末端胞外区域的一部分。在若干实施例中,该部分具有SEQ ID NO.39的氨基酸序列。在一些实施例中,胞外 β -2肾上腺素能结构域由SEQ ID NO.40的核酸序列编码。在一些实施例中,嵌合受体中使用的胞外 β -2肾上腺素能结构域的序列可以不同于SEQ ID NO.39,但取决于实施例,与SEQ ID NO.39保留至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%同源。在若干实施例中,使用 β -2肾上腺素能受体的第一跨膜螺旋,任选地与胞外 β -2肾上腺素能结构域结合。在若干实施例中, β -2肾上腺素能受体的第一跨膜螺旋具有SEQ ID NO.41的氨基酸序列。在一些实施例中, β -2肾上腺素能受体的第一跨膜螺旋由SEQ ID NO.42的核酸序列编码。在一些实施例中,嵌合受体中使用的 β -2肾上腺素能受体的第一跨膜螺旋的序列可以不同于SEQ ID NO.41,但取决于实施例,与SEQ ID NO.41保留至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%同源。

[0187] 在一个实施例中,嵌合受体包含CD8、截短的NKG2D、CD8a、跨膜结构域、CD16胞内结构域和作为共刺激分子的4-1BB。在若干实施例中,此类构建体由SEQ ID NO.25编码。在一些实施例中,嵌合受体可以不同于SEQ ID NO.25,但取决于实施例,与SEQ ID NO.25保留至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%同源。在若干实施例中,通过非限制性实例通过添加GS接头(本文披露的),例如GS3,增加了围绕CD8的铰链区。在此类实施例中,构建体由SEQ ID NO.43的核酸编码。在一些实施例中,嵌合受体可以不同于SEQ ID NO.43,但取决于实施例,与SEQ ID NO.43保留至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%同源。在若干实施例中,通过添加更长的GS接头,例如GS12或其他接头,增加了围绕CD8的铰链区。在若干实施例中,通过截短CD8减少铰链区。例如,在若干实施例中,CD8a的N-末端区域截短至少20%、至少30%、至少40%或至少50%。在若干实施例中,CD8铰链被GS接头替代。例如,在若干实施例中,铰链区包含GS3接头,由此构建体包含NKG2D-GS3-CD16-4-1BB。在一个实施例中,此类构建体由SEQ ID NO.44的核酸编码。在一些实施例中,嵌合受体可以不同于SEQ ID NO.44,但取决于实施例,与SEQ ID NO.44保留至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%同源。在若干实施例中,既不使用CD8也不使用GSn。在一个实施例中,这种构建体由SEQ ID NO.45的核酸编码。在一些实施例中,嵌合受体可以不同于SEQ ID NO.45,但取决于实施例,与SEQ ID NO.45保留至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%同源。

[0188] 如上所述,在若干实施例中,使用密码子优化的序列。例如,在若干实施例中,对嵌合受体的NKG2D结构域进行密码子优化(完全或部分)。然而,在若干实施例中,不进行密码子优化。在若干实施例中,向嵌合受体构建体提供未优化的NKG2D胞外结构域、CD8a铰链和4-1BB信号传导结构域。在若干实施例中,向嵌合受体构建体提供未优化的NKG2D胞外结构域、CD8a铰链和跨膜结构域、和4-1BB信号传导结构域。在若干实施例中,向嵌合受体构建体提供未优化的NKG2D胞外结构域、CD8a铰链和跨膜结构域、4-1BB信号传导结构域和2B4信号传导结构域。在若干实施例中,此类构建体具有SEQ ID NO.46的核酸序列。在一些实施例中,嵌合受体可以不同于SEQ ID NO.46,但取决于实施例,与SEQ ID NO.46保留至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%同源。

[0189] 在若干实施例中,向嵌合受体构建体提供未优化的NKG2D胞外结构域、 β -肾上腺素能衍生的跨膜结构域、和4-1BB信号传导结构域。在一些实施例中,嵌合受体构建体具有未

优化的NKG2D胞外结构域、 β -肾上腺素能衍生的跨膜结构域(由 β -2肾上腺素能受体的胞外区和 β -2肾上腺素能受体的第一跨膜螺旋构成)和4-1BB信号传导结构域。在一些实施例中,嵌合受体构建体具有未优化的NKG2D胞外结构域、 β -肾上腺素能衍生的跨膜结构域(由 β -2肾上腺素能受体的胞外区和 β -2肾上腺素能受体的第一跨膜螺旋构成)、4-1BB信号传导结构域和2B4信号传导结构域。在若干实施例中,此类构建体具有SEQ ID NO.47的核酸序列。在一些实施例中,嵌合受体可以不同于SEQ ID NO.47,但取决于实施例,与SEQ ID NO.47保留至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%同源。

[0190] 在若干实施例中,向嵌合受体构建体提供未优化的NKG2D胞外结构域、CD8a铰链和2B4信号传导结构域。在若干实施例中,向嵌合受体构建体提供未优化的NKG2D胞外结构域、CD8a铰链和跨膜结构域、以及2B4和4-1BB信号传导结构域。在若干实施例中,向嵌合受体构建体提供未优化的NKG2D胞外结构域、CD8a铰链和跨膜结构域、4-1BB信号传导结构域和2B4信号传导结构域,以及NKp80结构域。在若干实施例中,GS接头(例如GS3接头)连接2B4和NKp80结构域。在若干实施例中,此类构建体具有SEQ ID NO.48的核酸序列。在一些实施例中,嵌合受体可以不同于SEQ ID NO.48,但取决于实施例,与SEQ ID NO.48保留至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%同源。

[0191] 在若干实施例中,向嵌合受体构建体提供未优化的NKG2D胞外结构域、CD8a铰链和NKp80信号传导结构域。在若干实施例中,向嵌合受体构建体提供未优化的NKG2D胞外结构域、CD8a铰链和跨膜结构域、和NKp80信号传导结构域。在若干实施例中,向嵌合受体构建体提供未优化的NKG2D胞外结构域、CD8a铰链和跨膜结构域、4-1BB信号传导结构域和NKp80结构域。在若干实施例中,GS接头(例如GS3接头)连接4-1BB和NKp80结构域。在若干实施例中,此类构建体具有SEQ ID NO.49的核酸序列。在一些实施例中,嵌合受体可以不同于SEQ ID NO.49,但取决于实施例,与SEQ ID NO.49保留至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%同源。

[0192] 在若干实施例中,CD8跨膜结构域与2B4胞内结构域偶联。在若干实施例中,CD8跨膜结构域被跨膜和胞内的2B4结构域替代。在若干实施例中,CD8跨膜结构域被2B4替代,并且4-1BB以近端构型表达。

[0193] 在若干实施例中,CD16胞内信号传导结构域与CD3 ζ 或 γ 亚基偶联,所述CD3 ζ 或 γ 亚基相对于本文所述的嵌合受体反式地外源表达。如上所述,此类构建体可导致意外增强的信号转导,并因此导致NK细胞的细胞毒性作用的出人意料地增加。

[0194] 在若干实施例中,嵌合受体被配置为二聚化,如本文另外详细讨论的。在若干实施例中,根据本文披露的若干实施例的截短的NKG2D受体任选地二聚化。取决于实施例,二聚化可包括同源二聚体或异二聚体。在一些实施例中,二聚化导致嵌合受体(以及因此表达受体的NK细胞)的亲合力转变为在协调平衡减少(或缺乏)不利毒性作用情况下更好的配体识别。在更进一步的实施例中,胞外受体结构域还包含CD8a信号肽。在若干实施例中,嵌合受体使用内部二聚体或一个或多个组分亚基的重复。例如,在若干实施例中,嵌合受体包含与第二NKG2D胞外结构域偶联的NKG2D胞外结构域,和跨膜/信号传导区(或单独的跨膜区连同单独的信号传导区)。在若干实施例中,NKG2D胞外结构域中的一个或多个是密码子优化的。在若干实施例中,两个NKG2D胞外结构域通过接头(例如GSn接头)分开。在一个实施例中,使用GS3接头。在若干实施例中,跨膜结构域包含 β -肾上腺素能受体的胞外区域。在一些实施

例中,跨膜结构域跨膜结构域包含 β -2肾上腺素能受体的胞外区域,并且还包含 β -2肾上腺素能受体的第一跨膜结构域。在若干实施例中,信号传导区包含4-1BB。在若干实施例中,信号传导区包含NKp80。在一些实施例中,信号传导区包含CD16跨膜-胞内结构域。在若干实施例中,信号传导区包含4-1BB结合NKp80或CD16跨膜-胞内结构域。在一些实施例中,嵌合受体具有SEQ ID NO.50的核酸序列。在一些实施例中,嵌合受体可以不同于SEQ ID NO.50,但取决于实施例,与SEQ ID NO.50保留至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%同源。在一些实施例中,嵌合受体具有SEQ ID NO.51的核酸序列。在一些实施例中,嵌合受体可以不同于SEQ ID NO.51,但取决于实施例,与SEQ ID NO.51保留至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%同源。在一些实施例中,嵌合受体具有SEQ ID NO.52的核酸序列。在一些实施例中,嵌合受体可以不同于SEQ ID NO.52,但取决于实施例,与SEQ ID NO.52保留至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%同源。在若干实施例中,嵌合受体包含铰链区。在若干实施例中,CD8a被重新目的化以用作铰链区(在若干实施例中,由SEQ ID NO:5的核酸序列编码)。在若干实施例中,嵌合受体包含CD8a跨膜结构域。在若干实施例中,信号传导区包含4-1BB结合2B4和CD3 ζ 。在一些实施例中,嵌合受体包含密码子优化的与GS3接头偶联的NKG2D片段、另外的NKG2D片段、CD8a铰链、CD8a跨膜结构域和包含4-1BB和CD3 ζ 的效应子结构域。在一些实施例中,嵌合受体具有SEQ ID NO.66的核酸序列。在一些实施例中,嵌合受体可以不同于SEQ ID NO.66,但取决于实施例,与SEQ ID NO.50保留至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%同源。在若干实施例中,嵌合受体嵌合受体包含SEQ ID NO:67的氨基酸序列。在一些实施例中,嵌合受体可以不同于SEQ ID NO.66,但取决于实施例,与SEQ ID NO.50保留至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%同源。

[0195] 在若干实施例中,嵌合受体被配置为双特异性的,如本文另外详细讨论的。在若干实施例中,根据本文披露的若干实施例的截短的NKG2D受体由于第二肽(例如非-NKG2D配体)结合而是双特异性的。在一些实施例中,双特异性导致嵌合受体(以及因此表达受体的NK细胞)的靶向转变为在协调平衡减少(或缺乏)不利毒性作用情况下更好的靶细胞识别。在更进一步的实施例中,胞外受体结构域还包含CD8a信号肽。例如,在若干实施例中,嵌合受体包含与结合其他(非NKG2D)配体的第二胞外结构域偶联的NKG2D胞外结构域,和跨膜/信号传导区(或单独的跨膜区连同单独的信号传导区)。在若干实施例中,两个胞外结构域通过接头(例如GSn接头)分开。在一个实施例中,使用GS3接头。

[0196] 根据本文披露的若干实施例,提供了使用密码子优化的NKG2D结构域的另外的嵌合受体(任选地,这些构建体也可以用非优化的或部分优化的结构域进行重复)。例如,在若干实施例中,密码子优化的胞外结构域与铰链和至少两个跨膜/信号传导结构域偶联。在若干实施例中,多个信号传导结构域提供NK细胞的增强的细胞毒性功效,因为多个非冗余信号级联在运作。虽然在一些实施例中,这些多个途径可以会聚在单个信号传导分子(例如,IFN γ)上,但由于驱动细胞毒性终点的信号分子的总体量级,总体细胞毒性效应出乎意料地增加。作为非限制性实例,在若干实施例中,NKG2D与CD8a铰链偶联,CD8a之后是CD16跨膜-胞内信号传导结构域和4-1BB信号传导结构域。在若干实施例中,该构建体还包含2B4信号传导结构域。在一些实施例中,此类嵌合受体具有SEQ ID NO.53的核酸序列。在一些实施例中,嵌合受体可以不同于SEQ ID NO.53,但取决于实施例,与SEQ ID NO.53保留至少

70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%同源。在另外的实施例中，NKG2D-CD8a-CD16IC/TM构建体还包含NKp80信号传导结构域。在若干实施例中，此类构建体还包含4-1BB和NKp80结构域之间的GS3接头。在一些实施例中，此类嵌合受体具有SEQ ID NO.54的核酸序列。在一些实施例中，嵌合受体可以不同于SEQ ID NO.54，但取决于实施例，与SEQ ID NO.54保留至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%同源。

[0197] 在另外的实施例中，嵌合受体的某些组分可以被一个或多个另外的亚基替代，这些亚基导致增强的功效（例如，NK细胞的活化或细胞毒性）。例如，在一个实施例中，CD16胞内信号传导结构域可以用DAP10的四重复序列（例如，4xDAP10）替代。在另外的实施例中，CD16胞内信号传导结构域可以用Zap70亚基替代。某些此类实施例导致出人意料地增强的NK细胞细胞毒性。

[0198] 在若干另外的实施例中，效应子结构域包含一个或多个共有半-ITAM序列，以增强配体结合后活化信号传导的转导。在另外的实施例中，在4-1BB、CD16、NCR1、NCR2和/或NCR3的信号传导结构域之间包含GS接头增强了信号转导。此外，在一些实施例中，CD3 ζ 和FcR γ 中的一者或两者与本文所述的嵌合受体一起（在相同或不同的构建体上）另外表达，这导致出人意料地增强的信号转导，并因此出人意料地增加NK细胞的细胞毒性作用。根据实施例，CD3 ζ 和FcR γ 中的一种或多种的工程化表达补充NK细胞对这些分子的内源表达，从而进一步增强NK细胞的信号传导和最终细胞毒性效力。

[0199] 任选地，取决于实施例，本文披露的任何多核苷酸还可编码嵌合受体的一个或多个组成亚基的截短和/或变体，但仍保留其将NK细胞导向靶细胞的能力，并且在若干实施例中出人意料地增强结合后的细胞毒性。此外，本文披露的任何多核苷酸还可任选地包括编码嵌合受体的各种组成亚基的密码子优化的核苷酸序列。如本文所用，术语“片段”和“截短的”应给出它们的普通含义，并且还应包括蛋白质的N-和C-末端缺失变体。

[0200] 可以将编码本文所述嵌合受体的多核苷酸插入载体中以实现重组蛋白表达。在一个实施例中，多核苷酸与至少一个用于表达嵌合受体的调节元件可操作地连接。在具体的实施例中，与本文公开的肽异源的转录调节元件（例如内部核糖体进入位点（IRES）或增强子元件）用于指导嵌合受体的转录。在一些实施例中，多核苷酸包含一个或多个胞质蛋白酶切割位点。在一些实施例中，切割位点被胞质蛋白酶识别和切割。在一些实施例中，该切割位点选自下组，该组包括T2A切割位点、P2A切割位点、E2A切割位点和F2A切割位点。根据实施例，嵌合受体的各种组成部分可以在单个载体中递送至NK细胞，或者可替代地在多个载体中递送。在一些实施例中，嵌合受体构建体在单一载体中递送，而另一种增强嵌合受体功效的因子（例如mbIL15）在分开的载体中递送。在若干实施例中，嵌合受体和增强嵌合受体功效的因子（例如mbIL15）在单一载体中递送。无论使用多少载体，任何多核苷酸可任选地包括标签序列，该标签序列允许鉴定表达该构建体的NK细胞的存在。例如，在若干实施例中，使用FLAG标签（DYKDDDDK，SEQ ID NO.55）被。还可用其他标签序列，例如多组氨酸标签（His标签）（HHHHHH，SEQ ID NO.56），HA标签或myc标签（EQKLISEEDL；SEQ ID NO:57）。可替代地，使用绿色荧光蛋白或其他荧光部分。还可以使用标签类型的组合来单独识别嵌合受体的亚组分。

[0201] 在若干实施例中，编码嵌合受体的多核苷酸是可以通过电穿孔引入NK细胞的mRNA。在另一个实施例中，载体是病毒，优选逆转录病毒，其可以通过转导引入NK细胞。在若

干实施例中,载体是鼠干细胞病毒(MSCV)。在另外的实施例中,可以使用其他载体,例如可以使用慢病毒、腺病毒、腺相关病毒等。在若干实施例中,使用非HIV衍生的逆转录病毒。选择的载体取决于多种因素,包括但不限于转录调节元件的强度和用于表达蛋白质的细胞。载体可以是质粒、噬菌粒、粘粒、病毒载体、噬菌体、人工染色体等。在另外的实施例中,载体可以是游离载体、非同源地或同源地整合的载体,其可以通过任何合适的方式(转化、转染、接合、原生质体融合、电穿孔、磷酸钙沉淀、直接显微注射等)引入适当的细胞中以转化它们。在若干实施例中使用诱导NK细胞中嵌合受体表达的其他方法,包括例如SV40早期启动子区、劳斯肉瘤病毒的3'长末端重复序列中包含的启动子、疱疹胸苷激酶启动子、金属硫蛋白基因的调控序列、腺病毒(ADV)启动子、巨细胞病毒(CMV)启动子、牛乳头瘤病毒(BPV)启动子、细小病毒B19p6启动子、 β -内酰胺酶启动子、tac启动子、胭脂碱合成酶启动子区或花椰菜花叶病毒35S RNA启动子、核酮糖二磷酸羧化酶启动子、Gal 4启动子、ADC(醇脱氢酶)启动子、PGK(磷酸甘油激酶)启动子、含有修饰MoMuLV LTR的U3区和骨髓增生性肉瘤病毒增强子的合成MND启动子和碱性磷酸酶启动子。

[0202] 可以改造自然杀伤细胞以表达本文披露的嵌合受体。可以使用本领域技术人员已知的任何技术将嵌合受体表达构建体引入NK细胞中。在一个实施例中,嵌合受体在NK细胞中瞬时表达。在另一个实施例中,嵌合受体在NK细胞中稳定表达。在另一个实施例中,NK细胞是自体细胞。在另一个实施例中,NK细胞是供体来源的(同种异体的)细胞。

[0203] 本文进一步提供了治疗患有癌症或传染病的受试者的方法,该方法包括向受试者给予包含经工程改造以表达如本文披露的嵌合受体的NK细胞的组合物,该嵌合受体设计成靶向在受损或患病细胞或组织上差异表达(例如,与正常细胞或组织相比表达程度不同)的标志物或配体。如本文所用,术语“进行表达”,“表达的”和“表达”应给出其普通含义,并且应指允许或使基因或多核苷酸序列中的信息得以表现,例如通过激活与相应基因或DNA序列的转录和翻译有关的细胞功能来产生蛋白质。表达产物本身,例如所得蛋白质,也可以说成是由细胞“表达”的。表达产物可以表征为胞内、胞外或跨膜。术语“胞内”应给出其普通含义,并且应指细胞内部。术语“胞外”应给出其普通含义,并且应指细胞外部。术语“跨膜”应给出其普通含义,并且应指多肽的包埋在细胞膜中的至少一部分。术语“细胞质”应具有其普通含义,并且应指位于细胞核外、细胞膜内。如本文所用,在对受试者给予治疗的背景下,术语“治疗(treat)”、“进行治疗(treating)”和“治疗(treatment)”应给予其普通含义,并且应指受试者源自治疗的有益效果。在某些实施例中,用本文所述的一种或多种基因工程改造的细胞治疗受试者实现以下效果中的一种、两种、三种、四种或更多种,这些效果包括例如:(i)减少或改善疾病或与其相关的症状的严重程度;(ii)减少与疾病相关的症状的持续时间;(iii)防止疾病或与其相关的症状的进展;(iv)疾病或与其相关的症状的消退;(v)防止与疾病相关的症状的发展或发作;(vi)防止与疾病相关的症状再次发生;(vii)减少受试者的住院治疗;(viii)减少住院治疗时长;(ix)患有疾病的受试者的存活增加;(x)减少与疾病相关的症状的数目;(xi)另一种疗法的一个或多个预防效果或治疗效果的增强、改善、补充、互补或增大。可以通过多种途径给药,包括但不限于静脉内、动脉内、皮下、肌肉内、肝内、腹膜内和/或局部递送至受影响的组织。对于给定受试者基于他们的体重、疾病类型和状态以及所需的治疗积极性可以容易地确定的NK细胞剂量,但取决于实施例,范围从约 10^5 个细胞/kg至约 10^{12} 细胞/kg(例如, 10^5 - 10^7 、 10^7 - 10^{10} 、 10^{10} - 10^{12} 及其中的重叠范围)。在

一个实施例中,使用剂量递增方案。在一些实施例中,给予一个范围的NK细胞,例如约 1×10^6 个细胞/kg与约 1×10^8 个细胞/kg之间。根据实施例,可以治疗各种类型的癌症或传染病。本文提供的各种实施例包括治疗或预防癌症的以下非限制性实例,包括但不限于急性淋巴细胞白血病(ALL)、急性髓性白血病(AML)、肾上腺皮质癌、卡波西肉瘤、淋巴瘤、胃肠癌、阑尾癌、中枢神经系统癌、基底细胞癌、胆管癌、膀胱癌、骨癌、脑肿瘤(包括但不限于星形细胞瘤、脊髓肿瘤、脑干胶质瘤、颅咽管瘤、室管膜母细胞瘤、室管膜瘤、成神经管细胞瘤、髓质上皮瘤)、乳腺癌、支气管肿瘤、伯基特淋巴瘤、宫颈癌、结肠癌、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、慢性髓细胞性白血病(CML)、慢性骨髓增生性障碍、导管癌、子宫内膜癌、食道癌、胃癌、霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、毛细胞白血病、肾细胞癌、白血病、口腔癌、鼻咽癌、肝癌、肺癌(包括但不限于非小细胞肺癌(NSCLC)和小细胞肺癌)、胰腺癌、肠癌、淋巴瘤、黑色素瘤、眼癌、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、垂体癌、子宫癌和阴道癌。

[0204] 此外,本文提供的各种实施例包括治疗或预防传染病的以下非限制性实例,包括但不限于细菌来源的感染,该细菌来源的感染可包括例如来自以下一个或多个属的细菌感染:包特菌属(*Bordetella*)、疏螺旋体属(*Borrelia*)、布鲁杆菌属(*Brucella*)、弯曲杆菌属(*Campylobacter*)、衣原体属(*Chlamydia*)和嗜衣原体属(*Chlamydophila*)、梭状芽胞杆菌属(*Clostridium*)、棒状杆菌属(*Corynebacterium*)、肠球菌属(*Enterococcus*)、埃希氏菌属(*Escherichia*)、弗朗西斯氏菌属(*Francisella*)、嗜血杆菌属(*Haemophilus*)、螺杆菌属(*Helicobacter*)、军团菌属(*Legionella*)、钩端螺旋体属(*Leptospira*)、李斯特菌属(*Listeria*)、分枝杆菌属(*Mycobacterium*)、支原体属(*Mycoplasma*)、奈瑟菌属(*Neisseria*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、立克次体属(*Rickettsia*)、沙门菌属(*Salmonella*)、志贺菌属(*Shigella*)、葡萄球菌属(*Staphylococcus*)、链球菌属(*Streptococcus*)、密螺旋体属(*Treponema*)、弧菌属(*Vibrio*)和耶尔森菌属(*Yersinia*),以及突变体或其组合。在一些实施例中,提供了治疗多种病毒感染的方法,这些病毒感染是例如由一种或多种病毒引起的病毒感染,该一种或多种病毒是例如腺病毒、柯萨奇病毒(Coxsackievirus)、爱泼斯坦-巴尔病毒(Epstein-Barr virus)、甲型肝炎病毒、乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、单纯疱疹病毒1型、单纯疱疹病毒2型、巨细胞病毒、埃博拉病毒、人疱疹病毒8型、HIV、流感病毒、麻疹病毒、腮腺炎病毒、人乳头瘤病毒、副流感病毒、脊髓灰质炎病毒、狂犬病病毒、呼吸道合胞病毒、风疹病毒和水痘-带状疱疹病毒。

[0205] 在一些实施例中,本文还提供了核酸和氨基酸序列,该核酸和氨基酸序列与SEQ ID NO.1-68的对应核酸或氨基酸序列相比具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%(及其中的范围)的同源性并且与对应的SEQ ID NO.1-68相比还表现出一种或多种功能:包括但不限于,(i) 增强的增殖,(ii) 增强的活化,(iii) 中的呈递配体的细胞的增强的细胞毒性活性,该配体与携带由这些核酸和氨基酸序列编码的受体的NK细胞结合,(iv) 增强的归巢至肿瘤或感染部位,(v) 减少的脱靶细胞毒性作用,(vi) 增强的免疫刺激细胞因子和趋化因子(包括但不限于IFN γ 、TNF α 、IL-22、CCL3、CCL4和CCL5)的分泌,(vii) 增强的刺激进一步先天性和适应性免疫应答的能力,和(viii) 其组合。

[0206] 另外,在若干实施例中,提供了对应于本文披露的任何核酸的氨基酸序列,同时考虑了核酸编码的简并性。此外,与本文明确披露的那些不同但具有功能相似性或等同性的那些序列(无论是核酸还是氨基酸)也涵盖在本披露的范围内。前述包括突变体、截短、取代

或其他类型的修饰。

[0207] 根据若干实施例,本文提供了编码嵌合受体的多核苷酸,这些嵌合受体包含胞外受体结构域,其中该胞外受体结构域包含与自然杀伤组2成员D (NKG2D)的天然配体结合的肽,其中与NKG2D的天然配体结合的肽是NKG2D片段,其是包含跨膜区和胞内信号传导结构域的效应子结构域。在若干实施例中,NKG2D片段由包含SEQ ID NO.2或3或68的序列的多核苷酸或其功能等效物编码。在若干实施例中,多核苷酸编码包含CD16的效应子结构域。在若干实施例中,多核苷酸编码包含NCR1的效应子结构域。在若干实施例中,多核苷酸编码包含NCR2的效应子结构域。在若干实施例中,多核苷酸编码包含NCR3的效应子结构域。在一些实施例中,多核苷酸编码包含4-1BB的另外的效应子结构域部分。在若干实施例中,多核苷酸编码由NKG2D和CD16构成的嵌合受体。在若干实施例中,多核苷酸编码由NKG2D和NCR1构成的嵌合受体。在若干实施例中,多核苷酸编码由NKG2D和NCR2构成的嵌合受体。在另外的实施例中,多核苷酸编码嵌合受体,其由与CD16偶联的NKG2D和任选的4-1BB构成。在若干实施例中,取决于实施例,CD16被NCR1替代,并且在一些实施例中,被NCR2或甚至NCR3替代。在若干实施例中,效应子结构域还包含在例如4-1BB与CD16、NCR1、NCR2或NCR3之一之间的GS接头。

[0208] 在若干实施例中,胞外受体结构域还包含铰链区。在若干实施例中,铰链区包含CD8a。然而,在另外的实施例中,铰链区还包含一个或多个接头,在一些实施例中,这些接头包含GS9、CD8a/GS3、截短的CD8a、GS3等。

[0209] 在若干实施例中,胞外受体结构域还包含CD8a信号肽。在若干实施例中,效应子结构域包含一个或多个半-ITAM序列。在若干实施例中,嵌合受体不包含DNAX活化蛋白10 (DAP10)。在若干实施例中,嵌合受体不包含ITAM基序,而是使用替代的信号传导区,例如ITSM、半tam或其他共刺激区。

[0210] 在一个实施例中,提供了编码包含胞外受体结构域的嵌合受体的多核苷酸,其中该胞外受体结构域包含与自然杀伤组2成员D (NKG2D)的天然配体结合的肽,其中与NKG2D天然配体结合的肽是NKG2D片段,跨膜区,其中该跨膜区包含CD8a和效应子结构域,其中该效应子结构域包含4-1BB和CD3 ζ ,其中该多核苷酸与编码膜结合的白细胞介素15 (mbIL15)的另外的构建体共表达。

[0211] 在若干实施例中还提供了编码包含胞外受体结构域的嵌合受体的多核苷酸,其中该胞外受体结构域包含与自然杀伤组2成员D (NKG2D)的天然配体结合的肽,其中与NKG2D天然配体结合的肽是NKG2D片段,跨膜区,其中该跨膜区包含CD8a和效应子结构域,其中该效应子结构域包含4-1BB和2B4或DAP10的胞内结构域。编码如本文所述的嵌合受体的多核苷酸包含与NKG2D的天然配体结合的第二肽。在若干实施例中,NKG2D的天然配体包括但不限于MICA、MICB、ULBP1、ULBP2、ULBP3、ULBP4、ULBP5或ULBP6。在若干实施例中,与NKG2D的天然配体结合的嵌合受体部分与SEQ ID NO:1、2、3、或68具有至少80%的同源性。

[0212] 在若干实施例中,提供的多核苷酸是mRNA。在一些实施例中,多核苷酸与至少一个用于表达嵌合受体的调节元件可操作地连接。如本文所用,术语“核酸”,“核苷酸”和“多核苷酸”应给出它们的普通含义,并且应包括脱氧核糖核苷酸、脱氧核糖核酸、核糖核苷酸和核糖核酸及其聚合形式,并且包括单链形式或双链形式。核酸包括天然存在的核酸,例如脱氧核糖核酸(“DNA”)和核糖核酸(“RNA”)以及核酸类似物。核酸类似物包括以下那些,其包

括非天然存在的碱基、与天然磷酸二酯键以外的其他核苷酸连接的核苷酸,或包括通过磷酸二酯键以外的连接而附接的碱基。因此,核酸类似物包括,例如但不限于,硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、磷酸三酯、氨基磷酸酯、硼磷酸酯、甲基膦酸酯、手性甲基膦酸酯、2-0-甲基核糖核苷酸、肽-核酸(PNA)、锁核酸(LNA)等。如本文所用,术语“可操作地连接”,例如在调节核酸序列与异源核酸序列“可操作地连接”的情况下,应给出其普通含义,并且应表示调节核酸序列是与异源核酸序列处于功能关系。在IRES的情况下,“可操作地连接”是指含有内部核糖体进入位点的核酸序列和在mRNA序列中间的异源编码序列起始位点(其导致异源编码序列的翻译)之间的功能性连接。如本文所用,术语“载体”应给出其普通含义,并且是指以下载体,其可以将DNA或RNA序列(例如,外源基因)引入基因工程改造细胞中,从而转化基因工程改造的细胞并促进导入的序列的表达(例如转录和/或翻译)。载体包括病毒、质粒、噬菌体等。本文所用的术语“嵌合受体”应给出其普通含义,并且应指包含至少两个不是天然一起存在于单个蛋白质上的多肽结构域的细胞表面受体。如本文所用的术语“嵌合受体复合物”是指第一多肽,其可以包含组合的至少两个不是天然一起存在于单个蛋白质上的多肽结构域,该第一多肽与第二多肽(例如衔接子多肽、信号分子或刺激分子)相关联。本文披露的与嵌合受体的产生和使用有关的另外的术语是本领域普通技术人员容易理解的,并且也可以在国际公开WO 2014/117121和美国专利号7,994,298(在此通过引用将其每一个的全部内容并入本文)中找到。

[0213] 另外,根据若干实施例,提供了包含编码本文提供的任何多核苷酸的多核苷酸的载体,其中这些多核苷酸任选地与至少一个用于表达嵌合受体的调节元件可操作地连接。在若干实施例中,载体是逆转录病毒。

[0214] 本文进一步提供了工程改造的自然杀伤细胞,其包含本文披露的多核苷酸、载体或嵌合受体。在若干实施例中,这些NK细胞适用于治疗或预防疾病,例如癌症和/或传染病。

[0215] 实例

[0216] 方法

[0217] 以下实验方法和材料用于下面披露的非限制性实验实例中。

[0218] 细胞系和培养条件

[0219] 人急性淋巴细胞白血病细胞系REH、人骨肉瘤细胞系U-20S和人胚肾成纤维细胞293T(HEK 293T)细胞获自美国典型培养物保藏中心(ATCC;马纳萨斯,弗吉尼亚州)。将REH细胞维持并在补充有10%胎牛血清(FBS;Hyclone公司,洛根(Logan),犹他州)和1%青霉素-链霉素的Roswell Park Memorial Institute系列1640(RPMI-1640;Gibco公司,卡尔斯巴德(Carlsbad),加利福尼亚州)中生长。将HEK 293T和U-20S细胞维持并在补充有10%FBS和1%青霉素-链霉素的杜氏改良伊戈尔培养基(DMEM;Hyclone公司)中生长。将所有哺乳动物细胞在37°C在5%CO₂下孵育。

[0220] DNA质粒

[0221] 如前所述制备含有嵌合受体NKG2D-DAP10-CD3 ζ 的DNA质粒(参见Chang等人Cancer Research[癌症研究],卷73(6):2013)。将通过重叠延伸聚合酶链式反应(SOE-PCR)的剪接用于融合形成NKG2D-41BB-CD3 ζ 构建体的各个结构域。然后将该构建体插入鼠干细胞病毒(MSCV)逆转录病毒载体中(图3A)。通过金斯瑞公司(GenScript)(南京,中国)对NKG2D-CD16和NKG2D-CD16-41BB的构建体进行密码子优化并插入MSCV载体(图3B)。通过DNA测序验证构

建体的序列。

[0222] 人NK细胞的扩增

[0223] 通过来自健康成年供体的血液样品的Ficoll密度离心来获得人外周血单核细胞(PBMC)。为了扩增NK细胞,将PBMC与用膜结合的IL-15和4-1BB配体进行遗传修饰的K562(K562-mb15-41BBL)一起培养。细胞在干细胞生长培养基(SCGM;Cell Genix公司,弗莱堡,德国)中培养,每两天补充40IU IL-2/ml。

[0224] 培养7天后,使用抗CD3 Dynabeads(英杰公司(Invitrogen),卡尔斯巴德,加利福尼亚州)将NK细胞进行T细胞消耗。然后在SCGM(每两天补充40-200IU IL-2/ml)中培养NK细胞。

[0225] 逆转录病毒的产生和NK细胞的转导

[0226] 通过用逆转录病毒包装质粒瞬时转染HEK 293T细胞进行逆转录病毒的产生。首先在转染前18小时将HEK 293T细胞在12ml DMEM中接种到 2.5×10^6 细胞浓度。然后用3.5 μ g含有对应的NKG2D嵌合受体的MSCV载体(非限制性构建体在图1B-1C和2A-2B中示意性说明)、3.5 μ g pEQ-PAM3和3.0 μ g pRDF转染细胞。为了对照,使用含有GFP的空MSCV载体。使用X-tremeGENE 9DNA转染试剂(罗氏公司(Roche),巴塞尔,瑞士)进行转染。转染后24小时,用条件RPMI-1640替换DMEM。

[0227] 在更换培养基后18小时,将NKG2D嵌合受体转基因转导到NK细胞中。首先将NK细胞以 0.25×10^6 个细胞的浓度悬浮于2ml的条件RPMI-1640中。随后将细胞接种到RetroNectin(宝生物公司(TaKaRa),天津,日本)包被的管中。从HEK 293T细胞培养物中收获含有逆转录病毒的RPMI-1640(病毒上清液),并将新鲜的条件培养基加回到培养物中。向病毒上清液中补充200IU IL-2/ml,并将3ml病毒上清液分配到每个RetroNectin包被的管(含有接种的NK细胞)中。根据产生NK细胞的某些实施例,用新鲜病毒培养基转导接种的NK细胞六次,每12小时一次。然后在最后一次转导后48小时收获转导的NK细胞,并在SCGM中培养,每两天加入200IU IL-2/ml。转化的NK细胞在扩增后14至28天用于实验。

[0228] 流式细胞术检测嵌合受体的表达

[0229] 用含有白蛋白的磷酸盐缓冲盐水洗涤转导的NK细胞一次,并添加2 μ l兔血清。然后将细胞用多甲藻素叶绿素(PerCP)缀合的抗人NKG2D抗体(克隆149810;R&D系统公司,明尼阿波利斯,美国)在黑暗中染色10分钟。对于对照,用对应的PerCP-缀合的IgG同种型抗体染色转导的NK细胞。将所有NK细胞再次洗涤并用300 μ l 0.5%甲醛固定,然后使用Accuri C6流式细胞仪(BD公司,富兰克林湖,新泽西州)进行分析。使用配对t检验分析数据。

[0230] 细胞毒性测定

[0231] 用钙黄绿素AM红橙(赛默飞世尔科技公司(Thermo Fisher Scientific),沃尔瑟姆(Waltham),马萨诸塞州)染色REH细胞。将REH细胞接种到96孔圆底板(科斯塔公司(CoStar),康宁公司(Corning),纽约)中。然后以各种效应子:靶(E:T)比率添加转导的NK细胞。将细胞培养物在37 $^{\circ}$ C和5%CO₂下孵育4小时。使用Accuri C6流式细胞仪计数染色的活靶细胞。将U-20S细胞接种到96孔平底白板(科斯塔公司)中并孵育4小时。然后根据不同的E:T比率添加转导的NK细胞。然后将细胞培养物再培养四小时。在分析之前,将Bright-Glo底物(普洛麦格公司(Promega),麦迪逊(Madison),威斯康星州)加入细胞中。使用FLx800荧光读数器(宝特公司(Bio Tek),威努斯基(Winooski),佛蒙特州)测量来自活靶细胞的发光

强度。将发光强度和对照之间的差异转换为细胞毒性百分比。

[0232] 干扰素 γ (IFN γ) 生产测定

[0233] 为了确定NK细胞产生的IFN γ 的量,首先在96孔圆底板中用(E:T为1:1)或不用REH培养效应细胞和靶细胞。将细胞孵育一小时,然后添加GolgiPlug(布雷菲德菌素A;BD生物科学公司(BD Biosciences))。再培养5小时后,用藻红蛋白(PE)缀合的抗人CD56抗体(克隆MY31, BD生物科学公司)标记细胞。使用专有的透化试剂使细胞透化,并在黑暗中孵育40分钟。然后用专利洗涤缓冲液洗涤细胞。用别藻蓝蛋白(APC)-缀合的IFN γ 抗体(克隆25723.11;BD生物科学公司)检测细胞内IFN γ 45分钟。然后固定细胞并使用Accuri C6流式细胞仪分析。

[0234] 实例1-含有NKG2D构建体的CD3- ζ

[0235] 如本文所公开的,提供了包含与各种跨膜和/或信号传导结构域偶联的NKG2D和/或NKG2D变体的各种构建体。进行本实验以评估包含CD3- ζ 信号传导结构域的构建体的表达和细胞毒活性。根据上述方法和材料制备和测试两种CD3- ζ 构建体。取决于构建体,可以容易地调整所使用的方法以解释产生、表达和测试构建体所需的变化。两种构建体是NKG2D-DAP10-CD3 ζ 和NKG2D-41BB-CD3 ζ 。作为参考,图1A示意性地描绘了内源NKG2D。在NK细胞中,NKG2D的跨膜区之间的离子相互作用允许与其衔接蛋白DAP10缔合(Wu等人,1999)。在配体结合后,通过在DAP10上发现的信号基序YxNM转导NKG2D信号。CD3 ζ 通过其基于免疫受体酪氨酸的活化基序(ITAM; Lanier, 2008)转导信号。两个实验构建体分别在图1B和1C中示意性地示出。图1B显示NKG2D-DAP10-CD3 ζ ,其中通过YxNM和ITAM基序发生信号传导。图1C显示了NKG2D-41BB-CD3 ζ 构建体,其使用CD8a铰链区作为跨膜结构域,并使用4-1BB和CD3 ζ 作为信号传导结构域。

[0236] 首先评估NK细胞有效表达这些构建体的能力。用两种嵌合受体之一转导从健康成年供体的PBMC扩增的NK细胞。模拟转导的NK细胞用作对照(仅用含有GFP的空MSCV载体转导)。通过用Per-CP缀合的抗-NKG2D抗体染色NK细胞来确定嵌合受体的存在和相对丰度。图4A描绘了与模拟(左图)、NKG2D-DAP10-CD3 ζ (中图)或NKG2D-41BB-CD3 ζ (右图)构建体转导后与NKG2D阳性NK细胞百分比相关的代表性流式细胞术数据。模拟转导的NK细胞显示在使用的抗体情况下没有NKG2D表达(尽管在活化的NK细胞上NKG2D表达天然地高,但未显示染色超过同型匹配的非反应性抗体),而不到60%的用NKG2D-DAP10-CD3 ζ 构建体转导的细胞以及超过80%的用NKG2D-41BB-CD3 ζ 构建体转导的细胞显示NKG2D表达超过同种型匹配的非反应性抗体对照。来自所有供体的NKG2D阳性NK细胞百分比的池化数据显示在图4B中。与模拟相比,两种工程改造的NKG2D构建体都导致NKG2D表达的显著增加,尽管这两种构建体的表达百分比之间没有显著差异。图4C描绘了基于平均荧光强度(MFI)的表达数据,其表示在表达NKG2D构建体的群体内,细胞表达构建体的程度(例如,多个拷贝的构建体/细胞将产生更大的MFI)。通过该测量,NKG2D-41BB-CD3 ζ 的表达显著大于NKG2D-DAP10-CD3 ζ 构建体的表达。

[0237] 总之,这些数据表明,根据本文披露的若干实施例,工程改造的构建体可以成功地在NK细胞上表达。在若干实施例中,可以通过用特定构建体重复转导NK细胞来实现构建体的增强表达。在若干实施例中,构建体的组分可以在单个载体中递送至细胞,或者可替代地使用多个载体递送至细胞。取决于实施例,构建体本身可以导致增强的表达,例如线性构建

体或头对尾构建体可以产生增加的表达,因为多亚基构建体需要较低程度的细胞内组装。

[0238] 进一步在NK细胞上成功表达NKG2D构建体,需要NK细胞的有效信号传导作用于靶细胞。为了评估两个转导的NK细胞群的效力,使用对NK细胞活性敏感的两个细胞系(REH(悬浮细胞)和U-20S(贴壁细胞))进行细胞毒性测定。数据显示在图5A-5C中(误差棒代表标准偏差;所有实验一式三份; $n=3$ ($P<0.001$)),该数据总结不同组NK细胞针对REH细胞并且跨以两个E:T比率的独立供体的细胞毒性百分比。如图5A-5C所示,与模拟NK细胞(用标记为(c)的箭头显示)相比,表达任一NKG2D嵌合受体(用标记为(a)的箭头显示NKG2D-DAP10-CD3 ζ ,用标记为(b)的箭头显示NKG2D-41BB-CD3 ζ)的NK细胞针对所有三个供体的REH均具有明显更高的细胞毒性。表达NKG2D-DAP10-CD3 ζ 的NK细胞的平均细胞毒性百分比为 $91.8\% \pm 5.8\%$ (1:1E:T比率)和 $83.9\% \pm 5.6\%$ (1:2E:T比率)。用NKG2D-41BB-CD3 ζ 转导的那些NK细胞显示出相似的效力-在1:1E:T比率下为 $87.4\% \pm 6.1\%$,在1:2E:T比率下为 $76.2\% \pm 4.8\%$ 。与模拟转导的NK细胞相比,表达嵌合受体的NK细胞还表现出针对U-20S的高细胞毒性(参见图6A-6C,图6A描绘了用标记为(a)的箭头显示NKG2D-DAP10-CD3 ζ ,图6B描绘了用标记为(b)的箭头显示NKG2D-41BB-CD3 ζ ,并且图6C描绘了用标记为(c)的箭头显示模拟NK细胞)。

[0239] 这些数据提供证据表明NK细胞不仅可以被工程改造以表达嵌合受体构建体,而且那些表达嵌合受体的细胞能够被活化并成功地产生针对靶细胞的增强的细胞毒性作用。重要的是,这些数据还表明,当存在更多数量(在该实验中加倍)的靶细胞时,NK细胞的效力仅略微降低。这表明即使当工程改造的NK细胞相对于靶细胞以较少数量存在时(这可能是临床使用的情况),仍可以实现工程改造的NK细胞的所需细胞毒性作用。此外,这些数据表明,根据一些实施例,给定NK细胞上较低密度或程度的嵌合受体表达不一定导致协同降低的细胞毒性作用,并且鉴于它们的较低的构建体表达可能与NK细胞的出人意料的功效相关联。另外,这些数据体现了根据若干实施例实现的出人意料地增强的细胞毒性。虽然非工程改造的NK细胞具有细胞毒性,并且在活化后表达显著量的NKG2D,但是出人意料的是,本文披露的工程改造的细胞可以使细胞毒性作用显著超过可被认为已经是升高的上限(例如,天然NK细胞的细胞毒性)。

[0240] 除了细胞毒性数据之外,通过评估表达各种NKG2D构建体的NK细胞的干扰素- γ (IFN γ) 的是否产生,检查NK细胞发挥这些作用的机制。IFN γ 是由NK细胞产生和释放的关键细胞因子(通常在先天免疫应答期间),其募集巨噬细胞并具有免疫刺激作用。图7A显示了在有或没有REH细胞刺激情况下,模拟(左图),表达NKG2D-DAP10-CD3 ζ 的NK细胞(中图)和表达NKG2D-41BB-CD3 ζ 的NK细胞(右图)中IFN γ 产生的相对量(通过MFI测量)。NK细胞用针对胞内IFN γ 的APC缀合抗-IFN γ 抗体染色。通过配对t检验分析数据。这些数据显示,观察到三组NK细胞中的每一组在没有刺激的情况下具有相似水平的IFN γ 产生,在REH细胞刺激后观察到增加。如在若干实施例中所提供的,表达NKG2D构建体的工程改造的NK细胞可导致稳健的细胞因子产生。工程改造的NK细胞应答的靶细胞(此处为REH细胞)的存在使生化级联运行,该生化级联导致IFN γ 产生并最终导致细胞毒性作用。如图7A所示,表达NKG2D-41BB-CD3 ζ 的NK细胞在刺激性REH细胞存在下显示出稳健的IFN γ 产生。有趣的是,表达NKG2D-DAP10-CD3 ζ 的NK细胞未显示出相似程度的应答。这在图7B中进一步证实,其中评估了用REH细胞刺激后不同组NK细胞之间的IFN γ 水平(示出中值;通过非配对t检验分析数

据)。所有IFN γ 实验一式三份进行,具有三个独立供体, $n=9$ 。图7B显示表达NKG2D-DAP10-CD3 ζ 的NK细胞的IFN γ 产生与模拟转导的NK细胞没有显著差异。相反,与模拟转导的NK细胞相比,表达NKG2D-41BB-CD3 ζ 的NK细胞显示出IFN γ 产生的显著增加。这些数据是有趣的,因为它们证明,如本文所讨论的,嵌合受体应答配体结合的信号传导是产生针对目标靶细胞的细胞毒性作用的必要步骤。然而,不存在各种构建体发出信号的单一途径,因为用两种不同的嵌合受体转导的NK细胞都表现出相对相似的细胞毒性,但没有反映IFN γ 产生的水平。因此,根据一些实施例,提供了与正常NK细胞相比通过IFN γ 或其他免疫刺激细胞因子的产生增加而实现细胞毒性作用的构建体。然而,在若干实施例中,不一定实现或检测到IFN γ 的增加的产生,而是可以通过给定的嵌合构建体利用另一种免疫刺激途径来实现升高的细胞毒性作用。

[0241] 实例2-含有CD16和CD16-4-1BB的NKG2D构建体

[0242] 产生另外的构建体以评估表达、细胞毒性和细胞因子产生。如本文所提供的,若干实施例涉及包含截短的NKG2D(在一些实施例中经密码子优化)的构建体,其使用CD16跨膜和/或信号传导结构域。在该实验中产生用于评估的构建体示意性地显示在图2A-2B中,其显示A) NKG2D-CD16和B) NKG2D-CD16-41BB嵌合受体的结构。两种嵌合受体都依赖于CD16的跨膜区与CD3 ζ 或FcR γ 缔合。用于产生这些构建体的质粒显示在图3B中。如上所述,在若干实施例中,所用的构建体依赖于CD3 ζ 或FcR γ 的内源表达,然而,在若干实施例中,编码嵌合受体的质粒(或单独的质粒)被配置为提高NK细胞的CD3 ζ 和/或FcR γ 的表达,从而增强细胞的效力。

[0243] 如上所述,评估构建体的表达水平。图8A描绘了模拟(左图)、表达NKG2D-DAP10-CD3 ζ 的NK细胞(中图)和表达NKG2D-CD16的NK细胞的代表性流式细胞术数据(使用来自不同符号表示的三个独立供体的细胞进行实验。通过配对t检验分析数据)。图8B显示了与表达NKG2D(以及因此构建体)的细胞百分比有关的总结数据。如所预期的,在所用抗体情况下,模拟转染的NK细胞显示低水平的NKG2D表达。相反,两种工程改造的构建体表现出显著增强的表达,其中与模拟转导的NK细胞相比,NKG2D-CD16-转导的NK细胞表达 $35.8\% \pm 6.9\%$ 更高的表达。另外,如通过MFI评估的(图8C),NKG2D-CD16-转导的NK细胞也表现出构建体的表达增加。这些数据对于证明构建体可以有效地引入NK细胞并表达是重要的。

[0244] 已经建立了构建体的表达,评估了它们表现出细胞毒性作用的能力。如上所述,测试来自三个供体的NK细胞针对REH细胞和U-20S细胞的细胞毒性作用,其各自具有三个E:T比率(所有实验一式三份进行, $n=3$)。有趣的是,与模拟NK细胞相比,NKG2D-CD16构建体的增强表达不导致细胞毒性增加(参见图9A-9C,误差棒代表标准偏差)。与前面的实例一样,表达NKG2D-DAP10-CD3 ζ 的NK细胞(用标记为(a)的箭头显示)确实表现出增加的细胞毒性。关于针对U-20S细胞的细胞毒性,与模拟NK细胞(用标记为(c)的箭头显示)相比,NKG2D-CD16(用标记为(b)的箭头显示)确实表现出增加的细胞毒性(参见图10A-10C)。这些数据表明,对特定给定靶细胞类型的细胞毒性影响程度可随所用NK构建体而变化。在一些实施例中,特定构建体可能不那么有效,然而,在若干实施例中,可以使用NK细胞群的组合并显示出协同效应。换言之,具有表达NKG2D-CD16的部分和表达NKG2D-DAP10-CD3 ζ (或本文披露的任何构建体的其他组合)的部分的NK细胞群与任一单独的子群相比可以表现出出人意料地增强的细胞毒性。

[0245] 接下来测量干扰素- γ 的产生,以确认转染的NK细胞的作用机制。表达各种构建体的NK细胞或者通过REH细胞刺激,或者不通过REH细胞刺激,并测量IFN γ 的产生。这些数据在图11中(数据通过配对t检验分析)。所有NK细胞组在没有刺激的情况下具有相似水平的IFN γ ,并且在与REH细胞孵育后增加。表达NKG2D-CD16的NK细胞显示出IFN γ 产生增加 634 ± 211 MFI,这大于模拟转染的NK细胞显示的增加(423 ± 70 MFI)。然而,该增加低于对表达NKG2D-DAP10-CD3 ζ 的NK细胞观察到的增加(其增加 2041 ± 411 MFI)。与数据一致,根据若干实施例,IFN γ 的产生与表达某些构建体的NK细胞表现出的细胞毒性作用相关。

[0246] 根据本文披露的若干实施例,可以使用多个信号传导区。进行另外的实验以评估扩增的NK细胞中NKG2D-CD16-41BB的表达(使用来自一个供体的细胞进行实验)。表达数据显示在图12A-12B中。图12A显示原始流式细胞术数据,其证明与NKG2D-CD16构建体相比,添加4-1BB信号传导区不会显著损害NK细胞对构建体的表达。这也反映在图12B的总结直方图中,其显示了在测试的每个NK细胞组的表面上NKG2D受体的相对量。与NKG2D-CD16相比,NKG2D-CD16-41BB显示略微降低的MFI,但两种构建体均显示出与模拟物相比升高的表达。

[0247] 如上所述评估细胞毒性作用,使用REH和U-2OS细胞作为靶标。图13A-13B描绘了所得数据(误差棒代表标准偏差;所有实验一式三份进行, $n=3$)。图13A显示了构建体针对REH细胞的细胞毒性作用。与上述实验类似,与用标记为(a)的箭头所示的模拟NK细胞相比,用标记为(b)的箭头所示的表达NKG2D-CD16的细胞未显示显著升高的细胞毒性作用。相反,表达NKG2D-CD16-41BB的NK细胞(用标记为(c)的箭头显示)显示出针对REH细胞的增强的细胞毒性。关于针对U-2OS细胞的功效,表达NKG2D-CD16的细胞和表达NKG2D-CD16-41BB的细胞均显示出增强的细胞毒性,其中表达NKG2D-CD16-41BB的细胞表现出更稳健的细胞毒性作用。这表明,根据若干实施例,使用信号传导结构域的组合可导致转染的NK细胞功效的出人意料的增强。因此,如上所述,若干实施例采用两个或更多个跨膜/信号传导结构域,它们协同作用以产生针对靶细胞的增强的细胞毒性。

[0248] 实例3-另外的NKG2D构建体

[0249] 产生具有不同胞外结构域、跨膜结构域和胞内效应子结构域的另外构建体以评估它们的表达和细胞毒性。在该实验中生成的用于评估的12种构建体示意性地显示在图14中。这些变体嵌合受体中的一些依赖于CD16跨膜区与CD3 ζ 或FcR γ 缔合。如上所述,在若干实施例中,所用的构建体依赖于CD3 ζ 或FcR γ 的内源表达,然而,在若干实施例中,编码嵌合受体的质粒(或单独的质粒)被配置为提高NK细胞的CD3 ζ 和/或FcR γ 的表达,从而增强细胞的效力。如上所述,评估构建体的表达水平。如通过MFI评估的,模拟转染的NK细胞显示低水平的NKG2D表达(图16A)。相反,用上述变体NKG2D构建体转染的NK细胞显示不同水平的NKG2D表达,其中工程改造的变体构建体4和9在NK细胞中表现出显著增强的表达。图16B描绘了在转导入两个供体的NK细胞后变体NKG2D构建体1、4、8、9的代表性流式细胞术数据。相对于模拟转染的NK细胞,变体8和变体9转染的NK细胞特别显示出嵌合受体的强表达。转染后7天,变体构建体表达在两个供体的NK细胞中持续存在,其中如通过MFI评估,变体8和9特别显示出高水平(图16C)。这些数据对于证明构建体可以有效地引入NK细胞并表达是重要的。已经建立了构建体的表达,还评估了它们在转染的NK细胞中传递细胞毒性作用的能力。在以1:1E:T比率转染NK细胞后14天评估NKG2D变体构建体4、8和9的细胞毒性(图17)。

[0250] 产生了另外的变体构建体并且在图15中示意性地显示,其显示了包含各种胞外结

构域、跨膜结构域和胞内效应子结构域的嵌合受体的结构。这些变体嵌合受体中的一些依赖于包含CD3 ζ 和/或另一信号传导结构域的效应子结构域以在配体结合后转导信号传导,而其他变体嵌合受体包含CD3 ζ 跨膜结构域,其通过二聚化将全长CD3 ζ 分子募集至突触。如上所述,评估构建体的表达水平。如通过MFI评估的(图18A-B),用工程改造的构建体转导的NK细胞相对于模拟转导的细胞表现出嵌合受体的表达增加。如上所述使用效应物:靶标比率为1:1评估细胞毒性作用。如图19A-B所示,用工程改造的构建体(特别是变体18)转导的NK细胞相对于模拟对照具有增强的细胞毒性。

[0251] 由于变体18在NK细胞中表现出稳健的表达,伴随着增强的细胞毒性作用,因此产生了包含CD3 ζ 跨膜结构域的一系列变体NKG2D构建体。这些变体被称为“NK39”并且在图15中示意性地示出。转染进入供体NK细胞后14天(在低IL-2条件下培养4天),评估转导的NK细胞的细胞毒性。图21显示了构建体针对1:1和1:2E:T比率的培养的REH细胞的细胞毒性作用。与对照NK细胞在1:1E:T比率下相比,表达工程改造的NK39构建体的所有NK细胞显示出显著升高的细胞毒性作用。当以1:2E:T比率评估时,相对于模拟对照,嵌合构建体16-7、39-1、39-2、39-3和39-5各自增强了它们各自转导的NK细胞的细胞毒性作用。由于活化受体的外源表达可导致NK细胞无反应性和细胞死亡,因此将工程改造的构建体转导至两个供体NK细胞中,并在21天后评估存活。如图23A-B所示,在两个测试的供体中,NK39-5和NK39-10转导的细胞显示出比NK16更好的存活。

[0252] 实例4-NK45 NKG2D构建体的评估

[0253] 根据本文公开的实施例的具有不同胞外结构域、铰链、跨膜结构域和胞内效应子结构域的其他构建体示意性显示于图22中。在该实例中,相对于实例3中描述的三种NK39构建体(NK39-5、NK39-6、NK39-10)以及双顺反子地表达膜结合白细胞介素15(NK26-8)的NK16版本,评估了这7种构建体介导的表达、细胞毒性、持久性和细胞因子产生。根据本文披露的若干实施例,可以使用多个信号传导区。这些变体嵌合受体中的一些依赖于包含CD3 ζ 和/或另一信号传导结构域(例如,OX40、CD28和/或4-1BB共刺激结构域)的效应子结构域以在配体结合后转导信号传导,而其他变体嵌合受体包含CD3 ζ 跨膜结构域,其通过二聚化将全长CD3 ζ 分子募集至突触。如本文所披露的,这些构建体进一步配置为共表达膜结合的IL15。

[0254] 如上所述,首先评估NK细胞有效表达这些构建体的能力。用变体构建体(或仅包含GFP的空MSCV对照载体)转导从四个供体的PBMC扩增的NK细胞,并在3天后通过MFI评估NKG2D表达。如图24所示,模拟转染的NK细胞显示相对低水平的NKG2D表达。相反,工程改造的构建体表现出显著增强的表达,其中NK45-4(NKG2D-OX40-CD3 ζ)在所有供体中表现出人意料的稳健表达。OX40在活化的NK细胞中表达,但其作用尚未确定。具有包含CD28共刺激结构域(NK45-2;NKG2D-CD28-CD3 ζ)的效应子结构域的变体嵌合受体也在转导后3天显示出稳健表达。

[0255] 已经建立了变体构建体的表达,使用REH和HL60细胞作为靶标如上评估了它们发挥细胞毒性作用的能力。在转导后14天,以1:1E:T比率检测来自四个供体的NK细胞针对REH细胞(图25A)和HL60细胞(图25B)的效力。如图25A-B所示,与模拟NK细胞相比,工程改造的构建体针对所有四个供体中的REH和HL60细胞均发挥增强的细胞毒性。除了其显著的表达谱之外,表达NK45-4(NKG2D-OX40-CD3 ζ)的细胞相对于模拟对照和测试的其他构建体也表现出人意料的升高的细胞毒性。表达NK45-1和NK45-2的NK细胞在这些测定中也显示出显

著的细胞毒性。这些数据表明,根据若干实施例,使用信号传导结构域(特别是OX40共刺激结构域)的组合可导致转导的NK细胞功效的出人意料的增强。图28A-B描绘了在不同的E:T比率(1:2和1:4)下用若干种变体构建体转导的NK细胞针对U2OS细胞的细胞毒活性,并在更长的时间内评估。出人意料的是,用45-4构建体转导的NK细胞似乎在整个时间过程中保持细胞毒活性。有利地,这些实验表明,根据本文公开的若干实施例,NKG2D变体构建体在延长的时间段内提供出人意料地增强的细胞毒性,取决于实施例,该延长的时间段可以在范围在从2-3天、3-5天、5-7天、7-8天、8-10天、10-14天、14-21天或21-50天(以及列出的那些之间的任何范围,包括端值)。在若干实施例中,甚至实现了更长的细胞毒性作用持续时间。

[0256] 除了细胞毒性数据之外,通过评估在用REH细胞刺激后NK细胞的IFN γ 、TNF α 和GM-CSF的产生来检查NK细胞发挥这些作用的机制。如图26A-C所示,相对于表达GFP的对照NK细胞表现出的IFN γ 、TNF α 和GM-CSF的产生,每种变体构建体的表达产生增强的细胞因子分泌。嵌合受体NK45-1始终如一地介导高细胞因子产生,这是出人意料的,因为该构建体表达的水平显著低于NK26-8(其仅在铰链区有所不同)。因此,这些数据证明了本文披露的铰链区对于介导应答刺激的稳健细胞因子产生的出人意料的重要性。另外,表达NKG2D-OX40-CD3 ζ 的NK细胞也显示出IFN γ 、TNF α 和GM-CSF的产生增加。

[0257] 由于活化受体的外源表达可导致NK细胞无反应性和细胞死亡,因此将工程改造的构建体转导至两个供体NK细胞中,并在转导后7、14和21天评估总细胞计数。出人意料的是,NK45-4的出人意料的稳健表达不以降低培养物中NK细胞持久性为代价,因为总细胞计数保持在与表达GFP的对照细胞相当的水平(图27A和27B)。同样地,表达高水平变体构建体的其他NK细胞在转导后在2个供体中继续增殖至少3周。总的来说,这些数据表明,根据本文披露的若干实施例,工程改造的构建体可以在NK细胞中以高水平成功表达并介导细胞毒性作用,并且进一步地,这种增强的表达不会具有以下损害:NK细胞增殖减少和/或存活率降低。

[0258] 预期可以进行上面披露的实施例的特定特征和方面的各种组合或子组合,并且仍然落入本发明中的一个或多个中。此外,与实施例相关的任何特定特征、方面、方法、特性、特征性、质量、属性、元件等的披露内容可以用于本文阐述的所有其他实施例中。因此,应该理解的是,所披露的实施例的各种特征和方面可以彼此组合或替换,以便形成所披露的发明的不同模式。因此,意图是本文披露的本发明的范围不应受上述具体披露的实施例的限制。此外,尽管本发明易于进行各种修改和替代形式,但是其具体实例已在附图中示出并在本文中详细描述。然而,应该理解,本发明不限于所披露的特定形式或方法,相反,本发明将覆盖落入各种实施例描述和所附权利要求的精神和范围内的所有修改、等同物和替代物。本文披露的任何方法不需要按照所述顺序进行。本文披露的方法包括从业者采取的某些行为;但是,他们也可以明确地或暗示地包括这些行为的任何第三方指示。例如,诸如“给予扩增的NK细胞群”的行为包括“指导扩增的NK细胞群的给予”。此外,当本披露的特征或方面以马库什组(Markush group)描述时,本领域技术人员应意识到本披露还由此描述马库什组的任何单个个体或亚组个体。

[0259] 本文披露的范围还涵盖任何和所有重叠、子范围及其组合。诸如“至多”、“至少”、“大于”、“小于”、“之间”等语言包括所叙述的数字。在诸如“约”或“大约”之类的术语之后的数字包括所叙述的数字。例如,“约90%”包括“90%”。在一些实施例中,至少95%同源包括与参考序列96%、97%、98%、99%和100%同源。此外,当序列被披露为“包含”核苷酸或氨

基酸序列时,除非另有说明,否则这样的参考还应包括序列“包含所述序列”、“由所述序列组成”或“基本上由所述序列组成”。

序列表

<110>	新加坡国立大学(National University of Singapore); Nkarta, Inc	
<120>	截短的NKG2D嵌合受体及其在自然杀伤细胞免疫疗法中的用途	
<130>	4459.1144002	
<150>	62/477335	
<151>	2017-03-27	
<150>	62/628774	
<151>	2018-02-09	
<160>	109	
<170>	PatentIn 版本3.5	
<210>	1	
<211>	645	
<212>	DNA	
<213>	智人	
<220>		
<221>	尚未归类的特征	
<223>	全长 NKG2D	
<400>	1	
	gggtggattc gtggtcggag gtctcgacac agctgggaga tgagtgaatt tcataattat	60
	aacttggatc tgaagaagag tgatttttca acacgatggc aaaagcaaag atgtccagta	120
	gtcaaaagca aatgtagaga aaatgcatct ccattttttt tctgctgctt catcgctgta	180
	gccatgggaa tccgtttcat tattatggta acaatatgga gtgctgtatt cctaaactca	240
	ttattcaacc aagaagtca aattcccttg accgaaagtt actgtggccc atgtcctaaa	300
	aactggatat gttacaaaa taactgctac caattttttg atgagagtaa aaactggtat	360
	gagagccagg cttcttgtat gtctcaaaat gccagccttc tgaaagtata cagcaaagag	420
	gaccaggatt tacttaaact ggtgaagtca tatcattgga tgggactagt acacattcca	480
	acaaatggat cttggcagtg ggaagatggc tccattctct cacccaacct actaacaata	540
	attgaaatgc agaagggaga ctgtgcactc tatgcctcga gctttaaagg ctatatagaa	600
	aactgttcaa ctccaaatac gtacatctgc atgcaaagga ctgtg	645
<210>	2	
<211>	405	
<212>	DNA	
<213>	智人	
<220>		
<221>	尚未归类的特征	
<223>	截短的NKG2D	
<400>	2	
	ttattcaacc aagaagtca aattcccttg accgaaagtt actgtggccc atgtcctaaa	60

aactggatat gttacaaaaa taactgctac caattttttg atgagagtaa aaactggtat	120
gagagccagg cttcttgtat gtctcaaaat gccagccttc tgaaagtata cagcaaagag	180
gaccaggatt tacttaaaact ggtgaagtca tatcattgga tgggactagt acacattcca	240
acaaatggat cttggcagtg ggaagatggc tccattctct cacccaacct actaacaata	300
attgaaatgc agaagggaga ctgtgcactc tatgcctcga gctttaaagg ctatatagaa	360
aactgttcaa ctccaaatac gtacatctgc atgcaaagga ctgtg	405
<210> 3	
<211> 405	
<212> DNA	
<213> 智人	
<220>	
<221> 尚未归类的特征	
<223> 密码子优化的 截短的NKG2D	
<400> 3	
ctgttcaatc aggaagtcca gatccccctg acagagtctt actgcggccc atgtcccaag	60
aactggatct gctacaagaa caattgttat cagttctttg acgagagcaa gaactggtat	120
gagtcccagg cctcttgcac gagccagaat gcctctctgc tgaaggtgta cagcaaggag	180
gaccaggatc tgctgaagct ggtgaagtcc tatcactgga tgggcctggt gcacatcct	240
acaaacggct cttggcagtg ggaggacggc tccatcctgt ctccaaatct gctgaccatc	300
atcgagatgc agaagggcga ttgcgcctg tacgccagct cettcaaggg ctatatcgag	360
aactgctcca cacccaatac ctacatctgt atgcagagga cegtg	405
<210> 4	
<211> 63	
<212> DNA	
<213> 智人	
<220>	
<221> 尚未归类的特征	
<223> CD8 信号传导序列	
<400> 4	
atggctctgc ccgtcaccgc actgctgctg cctctggctc tgctgctgca cgccgcacga	60
cca	63
<210> 5	
<211> 135	
<212> DNA	
<213> 智人	
<220>	
<221> 尚未归类的特征	
<223> CD8 α 较链	
<400> 5	

accacaaccc ctgcaccacg cccccctaca ccagcaccta ccatcgcaag ccagcctctg	60
tccctgcggc cagaggcatg tagaccagca gcaggaggag cagtgcacac aagaggcctg	120
gacttcgcct gcgat	135
<210> 6	
<211> 1722	
<212> DNA	
<213> 智人	
<220>	
<221> 尚未归类的特征	
<223> CD8 β	
<220>	
<221> 尚未归类的特征	
<222> (674) .. (773)	
<223> n是a, c, g,或t	
<220>	
<221> 尚未归类的特征	
<222> (859) .. (958)	
<223> n是a, c, g,或t	
<400> 6	
atctaggtct tgctgcaccc gcacaaccta caaacagcgt cggggccttc tctgcacctc	60
cagttccag ctcacctccc tcagtgtcac agccggttac ctttcttcc tccctggggg	120
agggcaagac ttggggcttg ctgactccag gccagccca gcccggggca cccaggagcc	180
cctcaattgc tactcaaca gacaagaagc ggccccagtt agtggccagc tccaccatgc	240
actacacatc ctgacctctc tgagcctcta ctgtcactcg gggtcacaac ctttctga	300
gcacctcccg gggcaggggg cgatgacaca catgcagctg cctgggggag gccggcggtg	360
tcccctcctt tctggaacgc ggagggtcct ggtgggctct ggaaacgcag cccagacctt	420
tgcaatgcta ggaggatgag ggcggagacc tcgcggtccc caacaccaga ctcccgcagc	480
caccgcgccc ggtcccgccc tccccactgc cccccagct ccccgacca ggcgccccgc	540
ccggccagct cctcacccac cccagccgag actgtctccg ccgagcccc gggccaggt	600
gtcccgggag cgccacgatg cggccgagcg tgtggctcct cctggccgag cagctgacag	660
gtaaggcggc ggcnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn	720
nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnttgcttt	780
cctcttccag gccggcggag gagagcccgg cttegcttca tgaacagta agtgtataac	840
ctgggtgtgg ccttgggann nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn	900
nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnct	960
tgctgttgtt ttcagatctt acaaatgagc agagaatacg gttttggtgt cctgctataa	1020
aaagacatcg gtcagtaacg agcacgatgt ggaaaaatga gagaaggac acattcaacc	1080
ctggagagtt caatggctgc tgaagctgcc tgcttttca tgctgcaagg cttttctgtg	1140
tgtgacgtgc atgggagcaa cttgttcgtg ggtcatcggg aatactaggg agaaggtttc	1200

attgccccca gggcacttca cagagtgtgc tggaggactg agtaagaaat gctgccccatg	1260
ccaccgcttc cggctcctgt gctttccctg aactgggacc tttagtgggtg gccatttagc	1320
caccatcttt gcaggttgct ttgccctggg agggcagtaa cattgggtcc tgggtctttc	1380
atgggggtgat gctgggctgg ctccctggtg gtcttcccag gctggggctg accttcctcg	1440
cagagaggcc aggtgcaggt tgggaatgag gcttgctgag aggggctgtc cagttcccag	1500
aaggcatatc agtctctgag ggcttcctt ggggccggga acttgccgggt ttgaggatag	1560
gagttcactt catcttctca gctcccattt ctactcttaa gtttctcagc tcccatttct	1620
actctcccat ggcttaatgc ttctttcatt ttctgtttgt tttatacaaa tgtcttagtt	1680
gtaaaaaataa agtcccaggt taaagataac aaacgggtcc tg	1722
<210> 7	
<211> 2415	
<212> DNA	
<213> 智人	
<220>	
<221> 尚未归类的特征	
<223> CD16 α	
<400> 7	
attcttgggtg ctgggtggat ccaaattccag gagatggggc aagcatcctg ggatggctga	60
gggcacactc tggcagattc tgttgtgtgc ctcagatgct cagccacaga cttttgaggg	120
agtaaagggg gcagaccac ccacctgccc tccaggtctt ttcttctctg gtctgtttct	180
atgggtggggc tcccttgcca gacttcagac tgagaagtca gatgaagttt caagaaaagg	240
aaattgggtg gtgacagaga tgggtggagg ggctggggaa aggctgttta ctctctctg	300
tctagtcggg ttggtcctt tagggctccg gatatctttg gtgacttgct cactccagtg	360
tggcatcatg tggcagctgc tctcccaac tgctctgcta cttctagttt cagctggcat	420
gcggactgaa gatctccca aggctgtggg gttcctggag cctcaatggt acagggtgct	480
cgagaaggac agtgtgactc tgaagtcca gggagcctac tcccctgagg acaattccac	540
acagtggttt cacaatgaga gcctcatctc aagccaggcc tcgagctact tcattgacgc	600
tgccacagtc gacgacagtg gagagtacag gtgccagaca aacctctcca ccctcagtga	660
cccgggtgcag ctagaagtcc atatcggtg gctgttgctc caggcccctc ggtgggtggt	720
caaggaggaa gaccctatc acctgaggtg tcacagctgg aagaacctg ctctgcataa	780
ggtcacatat ttacagaatg gcaaaggcag gaagtatctt catcataatt ctgacttcta	840
cattccaaaa gccacactca aagacagcgg ctctacttc tgcagggggc tttttgggag	900
taaaaatgtg tcttcagaga ctgtgaacat caccatcact caaggtttg cagtgtcaac	960
catctcatca ttctttccac ctgggtacca agtctcttct tgcttggtga tggactctct	1020
ttttgcagtg gacacaggac tatatttctc tgtgaagaca aacattcgaa gctcaacaag	1080
agactggaag gaccataaat ttaaattggag aaaggacct caagacaaat gacccccatc	1140
ccatgggggt aataagagca gtagcagcag catctctgaa catttctctg gatttgcaac	1200
cccatcatcc tcaggcctct ctacaagcag caggaaacat agaactcaga gccagatccc	1260
ttatccaact ctcgactttt ccttggtctc cagtggaagg gaaaagccca tgatcttcaa	1320

gcaggggaagc cccagtgagt agctgcattc ctagaaattg aagtttcaga gctacacaaa	1380
cacttttttct gtccaaccg ttcctcaca gcaaagcaac aatacaggct agggatggta	1440
atcctttaa cacaacaaaa ttgctcgtgt tataaattac ccagtttaga ggggaaaaaa	1500
aaacaattat tcctaaataa atggataagt agaattaatg gttgaggcag gaccatacag	1560
agtgtgggaa ctgctgggga tctagggaat tcagtgggac caatgaaagc atggctgaga	1620
aatagcagggt agtccaggat agtctaaggg aggtgttccc atctgagccc agagataagg	1680
gtgtcttcct agaacattag ccgtagtgga attaacagga aatcatgagg gtgacgtaga	1740
attgagtctt ccaggggact ctatcagaac tggaccatct ccaagtatat aacgatgagt	1800
cctcttaatg ctaggagtag aaaatgggtcc taggaagggg actgaggatt gcggtggggg	1860
gtgggggtgga aaagaaagta cagaacaaac cctgtgtcac tgtcccaagt tgctaagtga	1920
acagaactat ctcagcatca gaatgagaaa gctgagaag aaagaaccaa ccacaagcac	1980
acaggaagga aagcgcagga ggtgaaaatg ctttcttggc cagggtagta agaattagag	2040
gttaatgcag ggactgtaaa accacctttt ctgcttcaat atctaattcc tgtgtagctt	2100
tgttcattgc atttattaaa caaatgttgt ataaccaata ctaaattgtac tactgagctt	2160
cgctgagtta agttatgaaa ctttcaaate cttcatcatg tcagttccaa tgaggtgggg	2220
atggagaaga caattgttgc ttatgaaaga aagcttttagc tgtctctgtt ttgtaagctt	2280
taagcgaac atttcttgggt tccaataaag cattttacaa gatcttgcac gctactctta	2340
gatagaagat gggaaaacca tggtaaataa atatgaatga taaaaaaaa aaaaaaaaaa	2400
aaaaaaaaa aaaaa	2415
<210> 8	
<211> 2473	
<212> DNA	
<213> 智人	
<220>	
<221> 尚未归类的特征	
<223> CD16 β	
<220>	
<221> 尚未归类的特征	
<222> (211) .. (310)	
<223> n是a, c, g, 或t	
<220>	
<221> 尚未归类的特征	
<222> (537) .. (636)	
<223> n是a, c, g, 或t	
<220>	
<221> 尚未归类的特征	
<222> (968) .. (1067)	
<223> n是a, c, g, 或t	
<400> 8	

aaagatgggt	ggagggactg	gggaaaggct	gtttactccc	tcctgtctag	tcggcttggt	60
ccctttaggg	gtccgatat	ctttggtgac	ttgtccactc	cagtgtggca	tcatgtggca	120
gctgctcctc	ccaactgctc	tgctacttct	aggtaagtag	gatctccctg	gttgagggag	180
aagtttgaga	tccttggtg	tcagcagaga	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	240
nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	300
nnnnnnnnnn	aagaggcatg	aacagtggaa	gaccagagag	caggtagcaa	ggtttccacc	360
agaaacatcc	tgattccttg	gaaaattggg	ctcctggggc	agaggagggc	aggggagttt	420
taaactcact	ctatgttcta	atcactctga	tctctgcccc	tactcaatat	ttgatttact	480
cttttttctt	gcagtttcag	ctggcatgcg	gactggtgag	tcagcttcat	ggtcttnnnn	540
nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	600
nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnncact	gagagctgag	ctcccggggc	660
tggggtgtct	ctgtgtcttt	caggetggct	gttgetccag	gcccctcggg	gggtgttcaa	720
ggaggaagac	cctattcacc	tgaggtgtca	cagctggaag	aacactgctc	tgcataaggt	780
cacatattta	cagaatggca	aagacaggaa	gtattttcat	cataattctg	acttccacat	840
tccaaaagcc	acactcaaag	atagcggctc	ctacttctgc	agggggcttg	ttgggagtaa	900
aatgtgtct	tcagagactg	tgaacatcac	catcactcaa	ggtgagacat	gtgccaccct	960
ggaatgcnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	1020
nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnttt	ttcatctctc	1080
cacttctcct	aataggtttg	gcagtgtaa	ccatctcatc	attctctcca	cctgggtacc	1140
aagtctcttt	ctgcttggtg	atggtactcc	tttttgcagt	ggacacagga	ctatatttct	1200
ctgtgaagac	aaacatttga	agctcaacaa	gagactggaa	ggaccataaa	cttaaattga	1260
gaaaggacc	tcaagacaaa	tgacccccat	cccatgggag	taataagagc	agtggcagca	1320
gcactctctga	acatttctct	ggatttgcaa	ccccatcatc	ctcaggcctc	tctacaagca	1380
gcaggaaaca	tagaactcag	agccagatcc	tttatccaac	tctcgatttt	tccttggtct	1440
ccagtggag	ggaaaagccc	atgatcttca	agcagggag	ccccagttag	tagctgcatt	1500
cctagaaatt	gaagtttcag	agctacacaa	acactttttc	tgtcccaacc	attccctcac	1560
agtaaaacaa	caatacaggc	tagggatggt	aatcctttaa	acatacaaaa	attgctcgta	1620
ttataaatta	cccagtttag	accggaaaaa	agaaaataat	tattcctaaa	caaatggata	1680
agtagaatta	atgattgagg	caggacccta	cagagtgtgg	gaactgctgg	ggatctagag	1740
aattcagtgg	gaccaatgaa	agcatggctg	agaaatagca	gggtagtcca	ggagagtcta	1800
agggaggtgt	tcccatctga	gcccagagat	aagggtgtct	tcctagaaca	ttagccgtag	1860
tggaattaac	aggaaatcat	gagggtgacg	tagaattgag	tcttccaggg	gactctatca	1920
gaactggacc	atttccaagt	atataacgat	gagccctcta	atgctaggag	tagcaaatgg	1980
tcctaggaag	gggactgagg	attgggggtg	gggtgggggtg	gaaaagaaag	tacagaacaa	2040
accctgtgtc	actgtcccaa	gttaagctaa	gtgaacagaa	ctatctcagc	atcagaatga	2100
gaaagcctga	gaagaaagaa	ccaaccacaa	gcacacagga	aggaaagcgc	aggaggtgaa	2160
aatgctttct	tggccagggt	agtaagaatt	agaggttaat	gcagggactg	taaaaccacc	2220
ttttctgctt	caatgtctag	ttcctgtata	gctttgttca	ttgcatttat	taaacaatg	2280
ttgtataacc	aatactaaat	gtactactga	gcttactga	gttacgctgt	gaaactttca	2340

aatccttctt catgtcagtt ccaatgaggt ggggatggag aagacaattg ttgcttatga	2400
aaaaaagctt tagctgtctc tgttttgtaa gctttcagtg caacatttct tggttccaat	2460
aaagcattttt aca	2473
<210> 9	
<211> 370	
<212> PRT	
<213> 智人	
<220>	
<221> 尚未归类的特征	
<223> 2B4	
<400> 9	
Met Leu Gly Gln Val Val Thr Leu Ile Leu Leu Leu Leu Leu Lys Val	
1 5 10 15	
Tyr Gln Gly Lys Gly Cys Gln Gly Ser Ala Asp His Val Val Ser Ile	
20 25 30	
Ser Gly Val Pro Leu Gln Leu Gln Pro Asn Ser Ile Gln Thr Lys Val	
35 40 45	
Asp Ser Ile Ala Trp Lys Lys Leu Leu Pro Ser Gln Asn Gly Phe His	
50 55 60	
His Ile Leu Lys Trp Glu Asn Gly Ser Leu Pro Ser Asn Thr Ser Asn	
65 70 75 80	
Asp Arg Phe Ser Phe Ile Val Lys Asn Leu Ser Leu Leu Ile Lys Ala	
85 90 95	
Ala Gln Gln Gln Asp Ser Gly Leu Tyr Cys Leu Glu Val Thr Ser Ile	
100 105 110	
Ser Gly Lys Val Gln Thr Ala Thr Phe Gln Val Phe Val Phe Glu Ser	
115 120 125	
Leu Leu Pro Asp Lys Val Glu Lys Pro Arg Leu Gln Gly Gln Gly Lys	
130 135 140	
Ile Leu Asp Arg Gly Arg Cys Gln Val Ala Leu Ser Cys Leu Val Ser	
145 150 155 160	
Arg Asp Gly Asn Val Ser Tyr Ala Trp Tyr Arg Gly Ser Lys Leu Ile	
165 170 175	
Gln Thr Ala Gly Asn Leu Thr Tyr Leu Asp Glu Glu Val Asp Ile Asn	
180 185 190	
Gly Thr His Thr Tyr Thr Cys Asn Val Ser Asn Pro Val Ser Trp Glu	
195 200 205	
Ser His Thr Leu Asn Leu Thr Gln Asp Cys Gln Asn Ala His Gln Glu	
210 215 220	

<223> DAP12	
<400> 11	
agacttcctc cttcacttgc ctggacgctg cgccacatcc caccggcct tacactgtgg	60
tgtccagcag catccggctt catgggggga ctgaaccct gcagcaggct cctgctcctg	120
cctctcctgc tggctgtaag tgattgcagt tgctctacgg tgagcccggg cgtgctggca	180
gggatcgtga tgggagacct ggtgctgaca gtgctcattg ccctggccgt gtacttcctg	240
ggccggctgg tccctcgggg gcgaggggct gcggaggcag cgaccggaa acagcgtatc	300
actgagaccg agtcgcctta tcaggagctc cagggtcaga ggtcggatgt ctacagcgac	360
ctcaacacac agaggccgta ttacaaatga gcccgaatca tgacagtcag caacatgata	420
cctggatcca gccattcctg aagcccacc tgcacctcat tccaactcct accgcgatac	480
agaccacag agtgccatcc ctgagagacc agaccgctcc ccaatactct cctaaaataa	540
acatgaagca caaaaacaaa aaaaaaaaaa aaaaa	575
<210> 12	
<211> 126	
<212> DNA	
<213> 智人	
<220>	
<221> 尚未归类的特征	
<223> 4-1BB	
<400> 12	
aaacggggca gaaagaaact cctgtatata ttcaaacac catttatgag accagtacaa	60
actactcaag aggaagatgg ctgtagctgc cgatttcag aagaagaaga aggaggatgt	120
gaactg	126
<210> 13	
<211> 339	
<212> DNA	
<213> 智人	
<220>	
<221> 尚未归类的特征	
<223> CD3-ζ	
<400> 13	
agagtgaagt tcagcaggag cgcagacgcc cccgcgtacc agcagggcca gaaccagctc	60
tataacgagc tcaatctagg acgaagagag gactacgatg ttttgacaa gagacgtggc	120
cgggaccctg agatgggggg aaagccgaga aggaagaacc ctgaggaagg cctgtacaat	180
gaactgcaga aagataagat ggcggaggcc tacagtgaga ttgggatgaa aggcgagcgc	240
cggaggggca aggggcacga tggcctttac cagggtctca gtacagccac caaggacacc	300
tacgacgccc ttcacatgca ggcctgccc cctcgctaa	339
<210> 14	
<211> 6	

<212> PRT
<213> 智人
<220>
<221> 尚未归类的特征
<223> 经典半-tam
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (4) .. (5)
<223> X = 任何氨基酸
<400> 14
Asp Gly Tyr Xaa Xaa Leu
1 5
<210> 15
<211> 6
<212> PRT
<213> 智人
<220>
<221> 尚未归类的特征
<223> ITSM基序
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (1) .. (1)
<223> N = S或T
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (2) .. (2)
<223> x = 任何氨基酸
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (4) .. (5)
<223> x = 任何氨基酸
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (6) .. (6)
<223> N = L或I
<400> 15
Asn Xaa Tyr Xaa Xaa Asn
1 5
<210> 16

<211>	614	
<212>	DNA	
<213>	智人	
<220>		
<221>	尚未归类的特征	
<223>	膜结合IL15	
<400>	16	
atggccttac	cagtgaccgc	cttgctcctg
ccgaactggg	tgaatgtaat	aagtgatttg
catattgatg	ctactttata	tacggaaagt
atgaagtgct	ttctcttga	gttacaagtt
catgatacag	tagaaaatct	gatcactcta
gtaacagaat	ctggatgcaa	agaatgtgag
ttgcagagtt	ttgtacatat	tgtccaaatg
ccgcgaccac	caacaccggc	gcccaccatc
gcgtgccggc	cagcggcggg	gggcgcagtg
atctacatct	gggcgccctt	ggccgggact
ccctttactg	ctaa	
		60
		120
		180
		240
		300
		360
		420
		480
		540
		600
		614
<210>	17	
<211>	204	
<212>	PRT	
<213>	智人	
<220>		
<221>	尚未归类的特征	
<223>	膜结合IL15	
<400>	17	
Met	Ala	Leu
1	5	10
His	Ala	Ala
	20	25
Ile	Glu	Asp
	35	40
Glu	Ser	Asp
	50	55
Leu	Leu	Glu
65	70	75
His	Asp	Thr
	85	90
Ser	Asn	Gly
	95	
		Leu

100	105	110
Glu Glu Lys Asn Ile Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val		
115	120	125
Gln Met Phe Ile Asn Thr Ser Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro		
130	135	140
Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu		
145	150	155
Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp		
165	170	175
Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly		
180	185	190
Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys		

195
 <210> 18
 <211> 1140
 <212> DNA
 <213> 智人

<220>
 <221> 尚未归类的特征
 <223> NKG2D/CD8a/4-1BB/CD3ζ
 <220>
 <221> 尚未归类的特征
 <223> NKG2D/CD8a/4-1BB/CD3ζ (aka NK16)
 <400> 18

atggccttac cagtgaccgc cttgctcctg ccgctggcct tgctgctcca cgccgccagg	60
ccgttattca accaagaagt tcaaattccc ttgaccgaaa gttactgtgg cccatgtcct	120
aaaaactgga tatgttaciaa aaataactgc taccaatttt ttgatgagag taaaaactgg	180
tatgagagcc aggcttcttg tatgtctcaa aatgccagcc ttctgaaagt atacagcaaa	240
gaggaccagg atttacttaa actggtgaag tcataatcatt ggatgggact agtacacatt	300
ccaacaaatg gatccttgca gtgggaagat ggctccattc tctacccaa cctactaaca	360
ataattgaaa tgcagaaggg agactgtgca ctctatgcct cgagctttaa aggctatata	420
gaaaactgtt caactccaaa tacatacatc tgcattgcaa ggactgtgac cagcagccca	480
gcgccgcgac caccaacacc ggcgcccacc atcgcgtcgc agcccctgtc cctgcgcccc	540
gaggcgtgcc ggccagcggc ggggggcgca gtgcacacga gggggctgga cttegcctgt	600
gatatctaca tctgggcgcc cttggccggg acttgtgggg tccttctcct gtcactggtt	660
atcacccttt actgcaaacg gggcagaaag aaactcctgt atatattcaa acaaccattt	720
atgagaccag taaaaactac tcaagaggaa gatggctgta gctgccgatt tccagaagaa	780
gaagaaggag gatgtgaact gagagtgaag ttcagcagga gcgcagacgc ccccgctac	840
cagcagggcc agaaccagct ctataacgag ctcaatctag gacgaagaga ggagtacgat	900

gttttggaca agagacgtgg ccgggaccct gagatggggg gaaagccgag aaggaagaac 960
 cctcaggaag gcctgtacaa tgaactgcag aaagataaga tggcggaggc ctacagtgag 1020
 attgggatga aaggcgagcg ccggaggggc aaggggcacg atggccttta ccagggtctc 1080
 agtacagcca ccaaggacac ctacgacgcc cttcacatgc aggccctgcc ccctcgctaa 1140
 <210> 19
 <211> 379
 <212> PRT
 <213> 智人
 <220>
 <221> 尚未归类的特征
 <223> NKG2D/CD8a/4-1BB/CD3ζ的氨基酸序列
 <220>
 <221> 尚未归类的特征
 <223> NKG2D/CD8a/4-1BB/CD3ζ (aka NK16) 的氨基酸序列
 <400> 19
 Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15
 His Ala Ala Arg Pro Leu Phe Asn Gln Glu Val Gln Ile Pro Leu Thr
 20 25 30
 Glu Ser Tyr Cys Gly Pro Cys Pro Lys Asn Trp Ile Cys Tyr Lys Asn
 35 40 45
 Asn Cys Tyr Gln Phe Phe Asp Glu Ser Lys Asn Trp Tyr Glu Ser Gln
 50 55 60
 Ala Ser Cys Met Ser Gln Asn Ala Ser Leu Leu Lys Val Tyr Ser Lys
 65 70 75 80
 Glu Asp Gln Asp Leu Leu Lys Leu Val Lys Ser Tyr His Trp Met Gly
 85 90 95
 Leu Val His Ile Pro Thr Asn Gly Ser Trp Gln Trp Glu Asp Gly Ser
 100 105 110
 Ile Leu Ser Pro Asn Leu Leu Thr Ile Ile Glu Met Gln Lys Gly Asp
 115 120 125
 Cys Ala Leu Tyr Ala Ser Ser Phe Lys Gly Tyr Ile Glu Asn Cys Ser
 130 135 140
 Thr Pro Asn Thr Tyr Ile Cys Met Gln Arg Thr Val Thr Thr Thr Pro
 145 150 155 160
 Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu
 165 170 175
 Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His
 180 185 190

Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu
 195 200 205
 Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr
 210 215 220
 Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe
 225 230 235 240
 Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg
 245 250 255
 Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser
 260 265 270
 Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr
 275 280 285
 Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys
 290 295 300
 Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn
 305 310 315 320
 Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu
 325 330 335
 Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly
 340 345 350
 His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr
 355 360 365
 Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 370 375

<210> 20

<211> 46

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> 尚未归类的特征

<223> NCR1 TM/IC的氨基酸

<400> 20

Met Gly Leu Ala Phe Leu Val Leu Val Ala Leu Val Trp Phe Leu Val
 1 5 10 15
 Glu Asp Trp Leu Ser Arg Lys Arg Thr Arg Glu Arg Ala Ser Arg Ala
 20 25 30
 Ser Thr Trp Glu Gly Arg Arg Arg Leu Asn Thr Gln Thr Leu
 35 40 45

<210> 21

<211> 276
 <212> PRT
 <213> 智人
 <220>
 <221> 尚未归类的特征
 <223> 全长 NCR2
 <400> 21
 Met Ala Trp Arg Ala Leu His Pro Leu Leu Leu Leu Leu Leu Phe
 1 5 10 15
 Pro Gly Ser Gln Ala Gln Ser Lys Ala Gln Val Leu Gln Ser Val Ala
 20 25 30
 Gly Gln Thr Leu Thr Val Arg Cys Gln Tyr Pro Pro Thr Gly Ser Leu
 35 40 45
 Tyr Glu Lys Lys Gly Trp Cys Lys Glu Ala Ser Ala Leu Val Cys Ile
 50 55 60
 Arg Leu Val Thr Ser Ser Lys Pro Arg Thr Met Ala Trp Thr Ser Arg
 65 70 75 80
 Phe Thr Ile Trp Asp Asp Pro Asp Ala Gly Phe Phe Thr Val Thr Met
 85 90 95
 Thr Asp Leu Arg Glu Glu Asp Ser Gly His Tyr Trp Cys Arg Ile Tyr
 100 105 110
 Arg Pro Ser Asp Asn Ser Val Ser Lys Ser Val Arg Phe Tyr Leu Val
 115 120 125
 Val Ser Pro Ala Ser Ala Ser Thr Gln Thr Ser Trp Thr Pro Arg Asp
 130 135 140
 Leu Val Ser Ser Gln Thr Gln Thr Gln Ser Cys Val Pro Pro Thr Ala
 145 150 155 160
 Gly Ala Arg Gln Ala Pro Glu Ser Pro Ser Thr Ile Pro Val Pro Ser
 165 170 175
 Gln Pro Gln Asn Ser Thr Leu Arg Pro Gly Pro Ala Ala Pro Ile Ala
 180 185 190
 Leu Val Pro Val Phe Cys Gly Leu Leu Val Ala Lys Ser Leu Val Leu
 195 200 205
 Ser Ala Leu Leu Val Trp Trp Gly Asp Ile Trp Trp Lys Thr Met Met
 210 215 220
 Glu Leu Arg Ser Leu Asp Thr Gln Lys Ala Thr Cys His Leu Gln Gln
 225 230 235 240
 Val Thr Asp Leu Pro Trp Thr Ser Val Ser Ser Pro Val Glu Arg Glu
 245 250 255

Ile Leu Tyr His Thr Val Ala Arg Thr Lys Ile Ser Asp Asp Asp Asp
 260 265 270

Glu His Thr Leu
 275

<210> 22

<211> 66

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> 尚未归类的特征

<223> NCR3 TM/IC结构域

<400> 22

Ala Gly Thr Val Leu Leu Leu Arg Ala Gly Phe Tyr Ala Val Ser Phe
 1 5 10 15

Leu Ser Val Ala Val Gly Ser Thr Val Tyr Tyr Gln Gly Lys Cys Leu
 20 25 30

Thr Trp Lys Gly Pro Arg Arg Gln Leu Pro Ala Val Val Pro Ala Pro
 35 40 45

Leu Pro Pro Pro Cys Gly Ser Ser Ala His Leu Leu Pro Pro Val Pro
 50 55 60

Gly Gly
 65

<210> 23

<211> 741

<212> DNA

<213> 智人

<220>

<221> 尚未归类的特征

<223> NKG2D/CD16

<400> 23

atggccttac cagtgaccgc cttgctcctg ccgctggcct tgctgctcca cgccgcccgc 60
 cccctgttca accaggaagt gcagateccc ctgaccgagt cctattgtgg cccttgcct 120
 aagaattgga tttgctataa aaacaactgc taccagttct ttgacgagtc taagaattgg 180
 tatgagtccc aggcctcttg tatgagccag aacgcctctc tgctgaaggt gtacagcaag 240
 gaggaccagg atctgctgaa gctggtgaag tcctatact ggatgggcct ggtgcacatc 300
 cccacaaacg gctcttggca gtgggaggac ggctccatcc tgtctectaa tctgctgacc 360
 atcatcgaga tgcagaaggg cgattgcgcc ctgtacgcca gctccttcaa gggctatatc 420
 gagaactgca gcacacccaa tacctacatc tgtatgcagc ggacagtgac cacaacccca 480
 gcaccaggc cccctacacc tgcaccaacc atcgaagcc agccactgtc cctgaggcct 540

gaggcatgta ggccagcagc aggaggagca gtgcacacac ggggcctgga cttgcctgc	600
gatgtgagct tttgtctggt catggtgctg ctgttcgccg tggataccgg cctgtatfff	660
tccgtgaaga caaatatccg gtctagcacc agagactgga aggatcacia gttcaaatgg	720
aggaaggacc cacaggacia g	741
<210> 24	
<211> 247	
<212> PRT	
<213> 智人	
<220>	
<221> 尚未归类的特征	
<223> NKG2D/CD16	
<400> 24	
Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu	
1 5 10 15	
His Ala Ala Arg Pro Leu Phe Asn Gln Glu Val Gln Ile Pro Leu Thr	
20 25 30	
Glu Ser Tyr Cys Gly Pro Cys Pro Lys Asn Trp Ile Cys Tyr Lys Asn	
35 40 45	
Asn Cys Tyr Gln Phe Phe Asp Glu Ser Lys Asn Trp Tyr Glu Ser Gln	
50 55 60	
Ala Ser Cys Met Ser Gln Asn Ala Ser Leu Leu Lys Val Tyr Ser Lys	
65 70 75 80	
Glu Asp Gln Asp Leu Leu Lys Leu Val Lys Ser Tyr His Trp Met Gly	
85 90 95	
Leu Val His Ile Pro Thr Asn Gly Ser Trp Gln Trp Glu Asp Gly Ser	
100 105 110	
Ile Leu Ser Pro Asn Leu Leu Thr Ile Ile Glu Met Gln Lys Gly Asp	
115 120 125	
Cys Ala Leu Tyr Ala Ser Ser Phe Lys Gly Tyr Ile Glu Asn Cys Ser	
130 135 140	
Thr Pro Asn Thr Tyr Ile Cys Met Gln Arg Thr Val Thr Thr Thr Pro	
145 150 155 160	
Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu	
165 170 175	
Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His	
180 185 190	
Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Val Ser Phe Cys Leu Val Met	
195 200 205	
Val Leu Leu Phe Ala Val Asp Thr Gly Leu Tyr Phe Ser Val Lys Thr	

210	215	220	
Asn Ile Arg Ser Ser Thr Arg Asp Trp Lys Asp His Lys Phe Lys Trp			
225	230	235	240
Arg Lys Asp Pro Gln Asp Lys			
	245		
<210>	25		
<211>	870		
<212>	DNA		
<213>	智人		
<220>			
<221>	尚未归类的特征		
<223>	CD8/NKG2D0pt/CD8a/CD16 TM/IC/4-1BB		
<400>	25		
atggctctgc ccgtcaccgc actgctgctg cctctggctc tgctgctgca cgccgcacga			60
ccactgttca atcaggaagt ccagatcccc ctgacagagt cttactgcgg cccatgtccc			120
aagaactgga tctgctacaa gaacaattgt tatcagttct ttgacgagag caagaactgg			180
tatgagtccc aggcctcttg catgagccag aatgcctctc tgctgaaggt gtacagcaag			240
gaggaccagg atctgctgaa gctggtgaag tcctatcact ggatgggcct ggtgcacatc			300
cctacaaacg gctcttggca gtgggaggac ggctccatcc tgtctccaaa tctgctgacc			360
atcatcgaga tgcagaaggg cgattgcgcc ctgtacgcca gctcettcaa gggctatatc			420
gagaactgct ccacacccaa tacctacatc tgtatgcaga ggaccgtgac cacaaccctt			480
gcaccacgcc cccctacacc agcacctacc atcgcaagcc agcctctgtc cctgcggcca			540
gaggcatgta gaccagcagc aggaggagca gtgcacacaa gaggcctgga cttgcctgc			600
gatgtgagct tttgtctggt catggtgctg ctgttcgccg tggataccgg cctgtacttt			660
tccgtgaaga caaatatcag gtctagcacc cgcgactgga aggatcacia gtttaagtgg			720
cggaaggacc ctcaggataa gaagcggggc agaaagaagc tgctgtatat cttcaagcag			780
cccttcatgc ggcccgtgca gacaaccag gaggaagac gctgctcatg tagatttctt			840
gaagaagaag aagggggctg tgaactgtaa			870
<210>	26		
<211>	289		
<212>	PRT		
<213>	智人		
<220>			
<221>	尚未归类的特征		
<223>	CD8/NKG2D0pt/CD8a/CD16 TM/IC/4-1BB		
<400>	26		
Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu			
1	5	10	15
His Ala Ala Arg Pro Leu Phe Asn Gln Glu Val Gln Ile Pro Leu Thr			

20					25					30									
Glu	Ser	Tyr	Cys	Gly	Pro	Cys	Pro	Lys	Asn	Trp	Ile	Cys	Tyr	Lys	Asn				
35					40					45									
Asn	Cys	Tyr	Gln	Phe	Phe	Asp	Glu	Ser	Lys	Asn	Trp	Tyr	Glu	Ser	Gln				
50					55					60									
Ala	Ser	Cys	Met	Ser	Gln	Asn	Ala	Ser	Leu	Leu	Lys	Val	Tyr	Ser	Lys				
65					70					75					80				
Glu	Asp	Gln	Asp	Leu	Leu	Lys	Leu	Val	Lys	Ser	Tyr	His	Trp	Met	Gly				
85					90					95									
Leu	Val	His	Ile	Pro	Thr	Asn	Gly	Ser	Trp	Gln	Trp	Glu	Asp	Gly	Ser				
100					105					110									
Ile	Leu	Ser	Pro	Asn	Leu	Leu	Thr	Ile	Ile	Glu	Met	Gln	Lys	Gly	Asp				
115					120					125									
Cys	Ala	Leu	Tyr	Ala	Ser	Ser	Phe	Lys	Gly	Tyr	Ile	Glu	Asn	Cys	Ser				
130					135					140									
Thr	Pro	Asn	Thr	Tyr	Ile	Cys	Met	Gln	Arg	Thr	Val	Thr	Thr	Thr	Pro				
145					150					155					160				
Ala	Pro	Arg	Pro	Pro	Thr	Pro	Ala	Pro	Thr	Ile	Ala	Ser	Gln	Pro	Leu				
165					170					175									
Ser	Leu	Arg	Pro	Glu	Ala	Cys	Arg	Pro	Ala	Ala	Gly	Gly	Ala	Val	His				
180					185					190									
Thr	Arg	Gly	Leu	Asp	Phe	Ala	Cys	Asp	Val	Ser	Phe	Cys	Leu	Val	Met				
195					200					205									
Val	Leu	Leu	Phe	Ala	Val	Asp	Thr	Gly	Leu	Tyr	Phe	Ser	Val	Lys	Thr				
210					215					220									
Asn	Ile	Arg	Ser	Ser	Thr	Arg	Asp	Trp	Lys	Asp	His	Lys	Phe	Lys	Trp				
225					230					235					240				
Arg	Lys	Asp	Pro	Gln	Asp	Lys	Lys	Arg	Gly	Arg	Lys	Lys	Leu	Leu	Tyr				
245					250					255									
Ile	Phe	Lys	Gln	Pro	Phe	Met	Arg	Pro	Val	Gln	Thr	Thr	Gln	Glu	Glu				
260					265					270									
Asp	Gly	Cys	Ser	Cys	Arg	Phe	Pro	Glu	Glu	Glu	Glu	Gly	Gly	Cys	Glu				
275					280					285									

Leu

<210> 27

<211> 741

<212> DNA

<213> 智人

<220>

<221> 尚未归类的特征	
<223> NKG2D/NCR1	
<400> 27	
atggccttac cagtgaccgc cttgctcctg ccgctggcct tgctgctcca cgccgcccgc	60
cctctgttca accaggaagt gcagatccct ctgaccgaaa gctattgcgg accttgccct	120
aagaattgga tttgctataa aaacaactgc taccagtctt ttgacgagtc taagaattgg	180
tatgagtctc aggccagctg tatgtcccag aacgcctctc tgctgaaggt gtacagcaag	240
gaggaccagg atctgctgaa gctggtgaag tcctatact ggatgggcct ggtgcacatc	300
cccacaaacg gctcttgcca gtgggaggac ggctctatcc tgagccctaa tctgctgacc	360
atcatcgaga tgcagaaggg cgattgcgcc ctgtacgcca gctccttcaa gggctatatc	420
gagaactgca gcacacccaa tactacatc tgtatgcaga ggacagtgc cacaacccca	480
gcaccccgcc cccctacacc tgcaccaacc atcgcaagcc agccactgtc cctgcggcct	540
gaggcctgca gaccagcagc aggaggagca gtgcacaccc ggggcctgga cttegctgt	600
gatatgggcc tggcctttct ggtgctggtg gcctggtgt ggtttctggt ggaggattgg	660
ctgtcccgga agagaacaag ggagagggcc tcccgggcct ctacctggga aggaagaagg	720
agactgaaca cccagacact g	741
<210> 28	
<211> 247	
<212> PRT	
<213> 智人	
<220>	
<221> 尚未归类的特征	
<223> NKG2D/NCR1	
<400> 28	
Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu	
1 5 10 15	
His Ala Ala Arg Pro Leu Phe Asn Gln Glu Val Gln Ile Pro Leu Thr	
20 25 30	
Glu Ser Tyr Cys Gly Pro Cys Pro Lys Asn Trp Ile Cys Tyr Lys Asn	
35 40 45	
Asn Cys Tyr Gln Phe Phe Asp Glu Ser Lys Asn Trp Tyr Glu Ser Gln	
50 55 60	
Ala Ser Cys Met Ser Gln Asn Ala Ser Leu Leu Lys Val Tyr Ser Lys	
65 70 75 80	
Glu Asp Gln Asp Leu Leu Lys Leu Val Lys Ser Tyr His Trp Met Gly	
85 90 95	
Leu Val His Ile Pro Thr Asn Gly Ser Trp Gln Trp Glu Asp Gly Ser	
100 105 110	
Ile Leu Ser Pro Asn Leu Leu Thr Ile Ile Glu Met Gln Lys Gly Asp	

115	120	125
Cys Ala Leu Tyr Ala Ser Ser Phe Lys Gly Tyr Ile Glu Asn Cys Ser		
130	135	140
Thr Pro Asn Thr Tyr Ile Cys Met Gln Arg Thr Val Thr Thr Thr Pro		
145	150	155
Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu		
165	170	175
Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His		
180	185	190
Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Met Gly Leu Ala Phe Leu Val		
195	200	205
Leu Val Ala Leu Val Trp Phe Leu Val Glu Asp Trp Leu Ser Arg Lys		
210	215	220
Arg Thr Arg Glu Arg Ala Ser Arg Ala Ser Thr Trp Glu Gly Arg Arg		
225	230	235
Arg Leu Asn Thr Gln Thr Leu		
245		

- <210> 29
- <211> 801
- <212> DNA
- <213> 智人
- <220>
- <221> 尚未归类的特征
- <223> NKG2D/NCR3
- <400> 29

atggccttac cagtgaccgc cttgctcctg ccgctggcct tgctgctcca cgccgccaga	60
cccctgttca accaggaggt gcagattccc ctgacagaaa gctattgtgg cccttgcct	120
aaaaattgga tttgctataa aaacaactgc taccagttct ttgacgagtc taagaattgg	180
tatgagtctc aggccagctg tatgtcccag aacgcctctc tgctgaaggt gtacagcaag	240
gaggaccagg atctgctgaa gctggtgaag tectatact ggatgggcct ggtgcacatc	300
cctacaaaacg gctcttggca gtgggaggac ggctctatcc tgagcccaaa tctgctgacc	360
atcatcgaga tgcagaaggg cgattgcgcc ctgtaegcea gctccttcaa gggctatatc	420
gagaactgca gcacacccaa tacctacatc tgtatgcagc ggacagtgac cacaacccca	480
gcaccagac cccctacacc tgcaccaacc atcgccagcc agccactgtc cctgaggccc	540
gaggcatgca ggccctgcagc aggaggcgcc gtgcacacaa ggggcctgga ctttgctgt	600
gatgcaggaa ccgtgctgct gctgagagca ggcttctatg ccgtgtcctt tctgtctgtg	660
gccgtgggct ccacagtgta ctatcagggc aagtgcctga cctggaaggc cccacggaga	720
cagctgcccg ccgtggtgcc cgcccctctg ccaccccctt gtggcagtag cgcccactg	780
ctgccaccgc tgcccggagg a	801

<210> 30
 <211> 267
 <212> PRT
 <213> 智人
 <220>
 <221> 尚未归类的特征
 <223> NKG2D/NCR3
 <400> 30
 Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15
 His Ala Ala Arg Pro Leu Phe Asn Gln Glu Val Gln Ile Pro Leu Thr
 20 25 30
 Glu Ser Tyr Cys Gly Pro Cys Pro Lys Asn Trp Ile Cys Tyr Lys Asn
 35 40 45
 Asn Cys Tyr Gln Phe Phe Asp Glu Ser Lys Asn Trp Tyr Glu Ser Gln
 50 55 60
 Ala Ser Cys Met Ser Gln Asn Ala Ser Leu Leu Lys Val Tyr Ser Lys
 65 70 75 80
 Glu Asp Gln Asp Leu Leu Lys Leu Val Lys Ser Tyr His Trp Met Gly
 85 90 95
 Leu Val His Ile Pro Thr Asn Gly Ser Trp Gln Trp Glu Asp Gly Ser
 100 105 110
 Ile Leu Ser Pro Asn Leu Leu Thr Ile Ile Glu Met Gln Lys Gly Asp
 115 120 125
 Cys Ala Leu Tyr Ala Ser Ser Phe Lys Gly Tyr Ile Glu Asn Cys Ser
 130 135 140
 Thr Pro Asn Thr Tyr Ile Cys Met Gln Arg Thr Val Thr Thr Thr Pro
 145 150 155 160
 Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu
 165 170 175
 Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His
 180 185 190
 Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ala Gly Thr Val Leu Leu Leu
 195 200 205
 Arg Ala Gly Phe Tyr Ala Val Ser Phe Leu Ser Val Ala Val Gly Ser
 210 215 220
 Thr Val Tyr Tyr Gln Gly Lys Cys Leu Thr Trp Lys Gly Pro Arg Arg
 225 230 235 240
 Gln Leu Pro Ala Val Val Pro Ala Pro Leu Pro Pro Pro Cys Gly Ser

	245	250	255
Ser Ala His Leu Leu Pro Pro Val Pro Gly Gly			
	260	265	
<210>	31		
<211>	6		
<212>	PRT		
<213>	智人		
<220>			
<221>	尚未归类的特征		
<222>	(6) .. (6)		
<223>	N是整数,表示重复的GGGS的次数		
<400>	31		
Gly Gly Gly Gly Ser Asn			
1	5		
<210>	32		
<211>	60		
<212>	PRT		
<213>	智人		
<220>			
<221>	尚未归类的特征		
<223>	GS3/CD8a		
<400>	32		
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Thr			
1	5	10	15
Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser			
	20	25	30
Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly			
	35	40	45
Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp			
	50	55	60
<210>	33		
<211>	45		
<212>	PRT		
<213>	智人		
<220>			
<221>	尚未归类的特征		
<223>	GS9		
<400>	33		
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly			

1 5 10 15
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 20 25 30
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 35 40 45
 <210> 34
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 智人
 <220>
 <221> 尚未归类的特征
 <223> GS3
 <400> 34
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15
 <210> 35
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> 智人
 <220>
 <221> 尚未归类的特征
 <223> 2B4 ICR
 <400> 35
 Trp Arg Arg Lys Arg Lys Glu Lys Gln Ser Glu Thr Ser Pro Lys Glu
 1 5 10 15
 Phe Leu Thr Ile Tyr Glu Asp Val Lys Asp Leu Lys Thr Arg Arg Asn
 20 25 30
 His Glu Gln Glu Gln Thr Phe Pro Gly Gly Gly Ser Thr Ile Tyr Ser
 35 40 45
 Met Ile Gln Ser Gln Ser Ser Ala Pro Thr Ser Gln Glu Pro Ala Tyr
 50 55 60
 Thr Leu Tyr Ser Leu Ile Gln Pro Ser Arg Lys Ser Gly Ser Arg Lys
 65 70 75 80
 Arg Asn His Ser Pro Ser Phe Asn Ser Thr Ile Tyr Glu Val Ile Gly
 85 90 95
 Lys Ser Gln Pro Lys Ala Gln Asn Pro Ala Arg Leu Ser Arg Lys Glu
 100 105 110
 Leu Glu Asn Phe Asp Val Tyr Ser
 115 120

<210>	36	
<211>	360	
<212>	DNA	
<213>	智人	
<220>		
<221>	尚未归类的特征	
<223>	2B4 ICR	
<400>	36	
tggaggagga	aaaggaagga	gaaacagagc gagacctccc ctaaggagtt cctgaccatc 60
tacgaggacg	tgaaggacct	gaagaccagg aggaaccacg agcaggaaca gacctttcct 120
ggcggaggca	gcaccatcta	cagcatgate cagagccaga gcagcgcccc taccagccaa 180
gagcctgcct	acaccctgta	cagcctgate cageccagca ggaaaagcgg ctccaggaag 240
aggaaccaca	gccccagett	caacagcacc atctatgagg tgatcggcaa gagccagccc 300
aaggcccaga	accctgccag	gctgtccagg aaggagctgg agaacttcga cgtgtacagc 360
<210>	37	
<211>	38	
<212>	PRT	
<213>	智人	
<220>		
<221>	尚未归类的特征	
<223>	NKp80 ICR	
<400>	37	
Met	Gln Asp Glu Asp Gly Tyr Met Thr Leu Asn Val Gln Ser Lys Lys	
1	5	10 15
Arg Ser Ser Ala Gln Thr Ser Gln Leu Thr Phe Lys Asp Tyr Ser Val		
	20	25 30
Thr Leu His Trp Tyr Lys		
	35	
<210>	38	
<211>	114	
<212>	DNA	
<213>	智人	
<220>		
<221>	尚未归类的特征	
<223>	NKp80 ICR	
<400>	38	
atgcaggatg	aggacggeta	tatgacctg aacgtccagt ccaagaagag gtccagcgct 60
cagaccagcc	agctgacctt	caaggactac tccgtgacce tgcaactgta caag 114
<210>	39	

<211> 30
 <212> PRT
 <213> 智人
 <220>
 <221> 尚未归类的特征
 <223> B2Ad N-末端 ECD
 <400> 39
 Met Gly Gln Pro Gly Asn Gly Ser Ala Phe Leu Leu Ala Pro Asn Arg
 1 5 10 15
 Ser His Ala Pro Asp His Asp Val Thr Gln Gln Arg Asp Glu
 20 25 30
 <210> 40
 <211> 90
 <212> DNA
 <213> 智人
 <220>
 <221> 尚未归类的特征
 <223> B2 AdR N-末端ECD
 <400> 40
 atggggcaac ccggaacgg cagcgccttc ttgctggcac ccaatagaag ccatgcgccg 60
 gaccacgacg tcacgcagca aaggacgag 90
 <210> 41
 <211> 33
 <212> PRT
 <213> 智人
 <220>
 <221> 尚未归类的特征
 <223> B2 AdR TM 螺旋
 <400> 41
 Val Trp Val Val Gly Met Gly Ile Val Met Ser Leu Ile Val Leu Ala
 1 5 10 15
 Ile Val Phe Gly Asn Val Leu Val Ile Thr Ala Ile Ala Lys Phe Glu
 20 25 30
 Arg
 <210> 42
 <211> 99
 <212> DNA
 <213> 智人
 <220>

<221>	尚未归类的特征	
<223>	B2AdR TM 螺旋	
<400>	42	
	gtgtgggtgg tgggcatggg catcgtcatg tctctcatcg tcctggccat cgtgtttggc	60
	aatgtgctgg tcatcacagc cattgccaag ttcgagcgt	99
<210>	43	
<211>	924	
<212>	DNA	
<213>	智人	
<220>		
<221>	尚未归类的特征	
<223>	NK15_1	
<400>	43	
	gccgccacca tggctctgcc cgtcaccgca ctgctgctgc ctctggctct gctgctgcac	60
	gccgcacgac cactgttcaa tcaggaagtc cagatcccc tgacagagtc ttactgcggc	120
	ccatgtccca agaactggat ctgctacaag aacaattggt atcagttctt tgacgagagc	180
	aagaactggg atgagtccca ggctcttgc atgagccaga atgcctctct gctgaagggt	240
	tacagcaagg aggaccagga tctgctgaag ctggtgaagt cctatcactg gatgggcctg	300
	gtgcacatcc ctacaaacgg ctcttggcag tgggaggacg gctccatcct gtctccaaat	360
	ctgctgacca tcatcgagat gcagaagggc gattgcgcc tgtacgccag ctcttcaag	420
	ggctatatcg agaactgctc cacaccaat acctacatct gtatgcagag gaccgtgggt	480
	ggcgggtggct cgggcgggtg tgggtcgggt ggcggcggat ctaccacaac ccctgcacca	540
	cgcccccta caccagcacc taccatcgca agccagcctc tgtccctgcg gccagaggca	600
	tgtagaccag cagcaggagg agcagtgcac acaagaggcc tggacttcgc ctgcatgtg	660
	agcttttgtc tgggtcatggt gctgctgttc gccgtggata cggcctgta cttttccgtg	720
	aagacaaata tcaggtctag caccgcgac tggaaggatc acaagtttaa gtggcgaag	780
	gaccctcagg ataagaagcg gggcagaaag aagctgctgt atatcttcaa gcagcccttc	840
	atgcggcccc tgagacaac ccaggaggaa gacggctgct catgtagatt tcctgaagaa	900
	gaagaagggg gctgtgaact gtaa	924
<210>	44	
<211>	789	
<212>	DNA	
<213>	智人	
<220>		
<221>	尚未归类的特征	
<223>	NK15_2	
<400>	44	
	gccgccacca tggctctgcc cgtcaccgca ctgctgctgc ctctggctct gctgctgcac	60
	gccgcacgac cactgttcaa tcaggaagtc cagatcccc tgacagagtc ttactgcggc	120

ccatgtccca agaactggat ctgctacaag aacaattggt atcagttctt tgacgagagc	180
aagaactggg atgagtccca ggcctcttgc atgagccaga atgcctctct gctgaaggtg	240
tacagcaagg aggaccagga tctgctgaag ctggtgaagt cctatcactg gatgggcctg	300
gtgcacatcc ctacaaacgg ctcttggcag tgggaggacg gctccatcct gtctccaaat	360
ctgctgacca tcatcgagat gcagaagggc gattgcgcc tgtacgccag ctccttcaag	420
ggctatatcg agaactgctc cacaccaat acctacatct gtatgcagag gaccgtgggt	480
ggcgggtggc cgggcgggtg tgggtcgggt ggcgcgcat ctgtgagctt ttgtctggtc	540
atgggtgctgc tgttcgccgt ggataccggc ctgtactttt ccgtgaagac aaatatcagg	600
tctagcaccg gcgactggaa ggatcacaag tttaatggc ggaaggacc tcaggataag	660
aagcggggca gaaagaagct gctgtatata ttcaagcagc cttcatgcg gcccgctgag	720
acaaccagg aggaagacgg ctgctcatgt agatttctg aagaagaaga agggggctgt	780
gaactgtaa	789
<210> 45	
<211> 744	
<212> DNA	
<213> 智人	
<220>	
<221> 尚未归类的特征	
<223> NK15_3	
<400> 45	
gccgccacca tggctctgcc cgtcacgca ctgctgctgc ctctggctct gctgctgcac	60
gccgcacgac cactgttcaa tcaggaagtc cagatcccc tgacagagtc ttactgcggc	120
ccatgtccca agaactggat ctgctacaag aacaattggt atcagttctt tgacgagagc	180
aagaactggg atgagtccca ggcctcttgc atgagccaga atgcctctct gctgaaggtg	240
tacagcaagg aggaccagga tctgctgaag ctggtgaagt cctatcactg gatgggcctg	300
gtgcacatcc ctacaaacgg ctcttggcag tgggaggacg gctccatcct gtctccaaat	360
ctgctgacca tcatcgagat gcagaagggc gattgcgcc tgtacgccag ctccttcaag	420
ggctatatcg agaactgctc cacaccaat acctacatct gtatgcagag gaccgtgggt	480
agcttttgtc tggatcatgt gctgctgtc gccgtggata ccggcctgta cttttccgtg	540
aagacaaata tcaggcttag caccgcgac tggaaggatc acaagtttaa gtggcggaag	600
gaccctcagg ataagaagcg gggcagaaag aagctgctgt atatcttcaa gcagcccttc	660
atgcggcccc tgacagacaac ccaggaggaa gacggctgct catgtagatt tctgaagaa	720
gaagaagggg gctgtgaact gtaa	744
<210> 46	
<211> 1164	
<212> DNA	
<213> 智人	
<220>	
<221> 尚未归类的特征	

<223> NK15_4	
<400> 46	
gccgccacca tggccctgcc tgtgacagcc ctgctgctgc ctctggctct gctgctgcac	60
gctgccagac ccttattcaa ccaagaagtt caaatteect tgaccgaaag ttactgtggc	120
ccatgtccta aaaactggat atgttacaaa aataactgct accaattttt tgatgagagt	180
aaaaactggg atgagagcca ggcttcttgt atgtctcaaa atgccagcct tctgaaagta	240
tacagcaaag aggaccagga tttacttaaa ctggtgaagt catatcattg gatgggacta	300
gtacacattc caacaaatgg atcttggcag tgggaagatg gctccattct ctcaccaac	360
ctactaacia taattgaaat gcagaaggga gactgtgcac tctatgcctc gagctttaa	420
ggctatatag aaaactgttc aactccaaat acgtacatct gcatgcaaag gactgtgacc	480
acaacccccg ctcccagacc tctaccct gcccataca tgcagacca gcccctgagc	540
ctgagaccgg aagcctgtag acctgctgcc ggaggcctg tgcacacaag aggctggac	600
ttgcctgcg atatctatat ctgggcccct ctggctggaa cctgtggcgt gctgctgctg	660
agcctgggta ttaccaagag gggcaggaag aagctgctgt acatcttcaa gcagccttc	720
atgaggcccc tgcaaaccac ccaggaggag gacggctgca gctgcagatt ccctgaggag	780
gaggagggcg gatgagagct gtggaggagg aaaaggaagg agaaacagag cgagacctc	840
cctaaggagt tcctgaccat ctacaggagc gtgaaggacc tgaagaccag gaggaaccac	900
gagcaggaac agaccttcc tggcggaggc agcaccatct acagcatgat ccagagccag	960
agcagcgccc ctaccagcca agagcctgcc tacaccctgt acagcctgat ccagcccagc	1020
aggaaaagcg gctccaggaa gaggaaccac agccccagct tcaacagcac catctatgag	1080
gtgatcggca agagccagcc caaggcccag aaccctgcc ggctgtccag gaaggagctg	1140
gagaacttcg acgtgtacag ctga	1164
<210> 47	
<211> 1155	
<212> DNA	
<213> 智人	
<220>	
<221> 尚未归类的特征	
<223> NK15_5	
<400> 47	
gccgccacca tggccctgcc tgtgacagcc ctgctgctgc ctctggctct gctgctgcac	60
gctgccagac ccttattcaa ccaagaagtt caaatteect tgaccgaaag ttactgtggc	120
ccatgtccta aaaactggat atgttacaaa aataactgct accaattttt tgatgagagt	180
aaaaactggg atgagagcca ggcttcttgt atgtctcaaa atgccagcct tctgaaagta	240
tacagcaaag aggaccagga tttacttaaa ctggtgaagt catatcattg gatgggacta	300
gtacacattc caacaaatgg atcttggcag tgggaagatg gctccattct ctcaccaac	360
ctactaacia taattgaaat gcagaaggga gactgtgcac tctatgcctc gagctttaa	420
ggctatatag aaaactgttc aactccaaat acgtacatct gcatgcaaag gactgtgatg	480
ggacagcctg gaaacggcag cgccttctct ctggccccta acagaagcca cgccccgat	540

cacgatgtga cccagcagag ggacgaggtg tgggtggtgg gcatgggcat cgtgatgagc	600
ctgatcgtgc tggctatcgt gttcggcaac gtgctggtga tcaccgccat cgccaagttc	660
gagaggaaga ggggcaggaa aaagctgctc tacatcttca agcagccctt catgaggccc	720
gtgcagacca cccaggaaga ggatggctgc tcctgtaggt ttcccaggga ggaggagggc	780
ggctgtgagc tgtggaggag aaaaaggaag gagaagcaga gcgagaccag cccaaggag	840
ttcctgacca tctacgagga cgtgaaggac ctgaagacca ggaggaacca cgagcaggaa	900
cagaccttcc ccggcggagg cagcaccatc tacagcatga tccagagcca gtccagcgcc	960
cccacaagcc aggaacccgc ctacacactg tatagcctga tccagccctc caggaagagc	1020
ggcagcagga agaggaacca cagccccagc ttcaacagca ccatttacga ggtgatcgga	1080
aagagccagc ccaaggctca gaaccccgcc aggctgagca ggaaggagct cgaaaacttc	1140
gacgtgtaca gctga	1155
<210> 48	
<211> 1349	
<212> DNA	
<213> 智人	
<220>	
<221> 尚未归类的特征	
<223> NK15_6	
<400> 48	
ggatccgaat tcgccccac catggccctg cctgtgacag ccctgctgct gcctctggct	60
ctgctgctgc acgtgccag acccttattc aaccaagaag ttcaaattcc cttgaccgaa	120
agttactgtg gcccatgtcc taaaaactgg atatgttaca aaaataactg ctaccaatth	180
tttgatgaga gtaaaaactg gtatgagagc caggettctt gtatgtctca aatgccagc	240
cttctgaaag tatacagcaa agaggaccag gatttactta aactggtgaa gtcatatcat	300
tggatgggac tagtacacat tccaacaaat ggatcttggc agtgggaaga tggctccatt	360
ctctcacca acctactaac aataattgaa atgcagaagg gagactgtgc actctatgcc	420
tcgagcttta aaggctatat agaaaactgt tcaactcaa atacgtacat ctgcatgcaa	480
aggactgtga ccacaacccc tgctcccaga cctcccacac ccgccctac aatgcctcc	540
cagcctctga gcctgagacc cgaagcctgt agacctgcc ccggcggagc tgtgcataca	600
agaggcctgg acttcgctg cgacatctac atctgggccc ctctggctgg cacatgcgga	660
gtcctgctgc tgagcctggt gatcaccaag aggggcagga agaagctgct gtacatcttc	720
aagcagccct tcatgagcc tgtgcagacc acacaggagg aggacggctg ctctgcagg	780
ttccctgagg aggaggagg aggctgcgag ctgtggagga ggaagagaaa ggagaagcag	840
tccgagacct ccccaagga gttcctcacc atttacgagg acgtgaagga cctgaagacc	900
aggagaaacc acgagcagga acaaacttc ccggcggcg gcagccat ctacagcatg	960
atccagagcc agtcctccgc ccctacaagc caggagcctg cctacacct gtacagcctg	1020
atccagccta gcaggaagag cggtccagg aagaggaacc actccccag cttcaacagc	1080
accatthtat aggtgatcgg caagtcccag cccaaggccc agaacctgc cagactgtcc	1140
aggaaggagc tggagaactt cgacgtctac tccggcggcg gcggcagcgg cggaggaggc	1200

tccggaggag gcggcagcat gcaggatgag gacggctata tgaccctgaa cgtccagtcc	1260
aagaagaggt ccagcgctca gaccagccag ctgacctca aggactactc cgtgaccctg	1320
cactggtaca agtgagcggc cgcgtcgac	1349
<210> 49	
<211> 989	
<212> DNA	
<213> 智人	
<220>	
<221> 尚未归类的特征	
<223> NK15_7	
<400> 49	
ggatccgaat tcgccccac catggcctg cctgtgacag ccttctgct gcctctggct	60
ctgctgctgc atgccgcccag acccttattc aaccaagaag ttcaaattcc cttgaccgaa	120
agttactgtg gcccatgtcc taaaaactgg atatgttaca aaaataactg ctaccaattt	180
tttgatgaga gtaaaaaactg gtatgagagc caggcttctt gtatgtctca aaatgccagc	240
cttctgaaaag tatacagcaa agaggaccag gatttactta aactggtgaa gtcatatcat	300
tggatgggac tagtacacat tccaacaaat ggatcttggc agtgggaaga tggctccatt	360
ctctcaccca acctactaac aataattgaa atgcagaagg gagactgtgc actctatgcc	420
tcgagcttta aaggctatat agaaaactgt tcaactcaa atacgtacat ctgcatgcaa	480
aggactgtga ccaccacccc tgetcccaga cccctacac ctgccctac aatgccagc	540
cagcccctga gcctgagacc tgaggcctgc agacctgctg ctggaggcgc tgtgcacaca	600
aggggcctcg acttcgcctg cgacatctac atctgggccc ctctggccgg cacatgtgga	660
gtgctgctgc tgtccctggt gatcaccaag aggggcagga agaagctgct gtacatcttc	720
aagcagccct tcatgaggcc cgtgcagacc acccaggagg aggacggctg ctctgcaga	780
ttccccgagg aggaggagg cggatgtgaa ctgggcggag gaggcagcgg cggcggcggc	840
agcggcggcg gcggcagcat gcaggatgag gacggctaca tgaccctgaa cgtgcagagc	900
aagaagagga gcagcgcca gaccagccag ctgacctca aggactacag cgtgaccctg	960
cactggtaca agtgagcggc cgcgtcgac	989
<210> 50	
<211> 1430	
<212> DNA	
<213> 智人	
<220>	
<221> 尚未归类的特征	
<223> NK15_8	
<400> 50	
ggatccgaat tcgccccac catggcctg cccgtgacag ctctgctgct gcctctggcc	60
ctgctgctgc atgccgctag acccctgttc aaccaggagg tgcagatccc cctgaccgaa	120
agctactgcg gccctgccc caagaactgg atctgttaca agaacaactg ctatcagttc	180

ttcgacgaga gcaagaactg gtacgagagc caggccagct gtatgagcca gaacgccagc	240
ctgctgaaaag tgtatagcaa ggaggaccag gacctgctga agctggtgaa gagctaccac	300
tggatgggcc tgggtcacat ccccaccaac ggaagctggc agtgggagga cggcagcatc	360
ctgagcccca acctgctgac catcatcgag atgcagaagg gcgactgcgc cctgtatgcc	420
agcagcttca agggctacat cgagaactgt agcaccacca acacctacat ctgcatgcag	480
aggaccgtgg gcggcggcgg cagcggcggg ggcggctccg gcggcggcgg cagcttattc	540
aaccaagaag ttcaaatcc cttgaccgaa agttactgtg gcccatgtcc taaaaactgg	600
atatgttaca aaaataactg ctaccaattt tttgatgaga gtaaaaactg gtatgagagc	660
caggcttctt gtatgtctca aaatgccagc cttctgaaag tatacagcaa agaggaccag	720
gatttactta aactggtgaa gtcatatcat tggatgggac tagtacacat tccaacaaat	780
ggatcttggc agtgggaaga tggetccatt ctctacca acctaactaac aataattgaa	840
atgcagaagg gagactgtgc actctatgcc tcgagcttta aaggctatat agaaaactgt	900
tcaactccaa atacgtacat ctgcatgcaa aggactgtga tgggccagcc tggcaacggc	960
agcgcctttc tgctggcccc caacaggagc catgcccctg accacgacgt gaccagcag	1020
agggacgagg tgtgggtggt gggcatgggc atcgtgatga gcctgatcgt gctggccatc	1080
gtgttcggca acgtgctggt gatcaccgcc atcgccaagt tcgagaggaa gaggggcagg	1140
aagaagctgc tgtacatctt caagcagccc ttcatgagac ccgtgcaaac caccagcag	1200
gaggacggct gcagctgcag gtttcccag gaggaggagg gcggatgcga actgggaggc	1260
ggaggaagcg gaggaggagg atccggagga ggcggaagca tgcaggacga ggacggctac	1320
atgaccctga acgtccagag caagaagagg agcagcggcc agacctcca gctgaccttc	1380
aaggactact ccgtgaccct gacttggtac aagtgagcgg ccgcgtcgac	1430
<210> 51	
<211> 1439	
<212> DNA	
<213> 智人	
<220>	
<221> 尚未归类的特征	
<223> NK15_9	
<400> 51	
ggatccgaat tcgccgccac catggccctg cccgtgacag ctctgctgct gcctctggcc	60
ctgctgctgc atgccgctag accctgttc aaccaggagg tgcagatccc cctgaccgaa	120
agctactgcg gccctgccc caagaactgg atctgttaca agaacaactg ctatcagttc	180
ttcgacgaga gcaagaactg gtacgagagc caggccagct gtatgagcca gaacgccagc	240
ctgctgaaaag tgtatagcaa ggaggaccag gacctgctga agctggtgaa gagctaccac	300
tggatgggcc tgggtcacat ccccaccaac ggaagctggc agtgggagga cggcagcatc	360
ctgagcccca acctgctgac catcatcgag atgcagaagg gcgactgcgc cctgtatgcc	420
agcagcttca agggctacat cgagaactgt agcaccacca acacctacat ctgcatgcag	480
aggaccgtgg gcggcggcgg cagcggcggg ggcggctccg gcggcggcgg cagcttattc	540
aaccaagaag ttcaaatcc cttgaccgaa agttactgtg gcccatgtcc taaaaactgg	600

atatgttaca	aaaataactg	ctaccaattt	tttgatgaga	gtaaaaactg	gtatgagagc	660
caggcttctt	gtatgtctca	aaatgccagc	cttctgaaag	tatacagcaa	agaggaccag	720
gatttactta	aactggtgaa	gtcatatcat	tggatgggac	tagtacacat	tccaacaaat	780
ggatcttggc	agtgggaaga	tggctccatt	ctctcaccca	acctactaac	aataattgaa	840
atgcagaagg	gagactgtgc	actctatgcc	tcgagcttta	aaggctatat	agaaaactgt	900
tcaactccaa	atacgtacat	ctgcatgcaa	aggactgtga	ccaccacccc	tgctcccaga	960
ccccctacac	ctgcccctac	aatcgccagc	cagcccctga	gcctgagacc	tgaggcctgc	1020
agacctgctg	ctggaggcgc	tgtgcacaca	aggggcctcg	acttcgcctg	cgacatctac	1080
atctgggccc	ctctggccgg	cacatgtgga	gtgctgctgc	tgtccctggt	gatcaccaag	1140
aggggcagga	agaagctgct	gtacatcttc	aagcagcctt	tcatgaggcc	cgtgcagacc	1200
accaggagg	aggacgctg	ctcctgcaga	ttccccgagg	aggaggagg	cggatgtgaa	1260
ctgggcggag	gaggcagcgg	cggcggcggc	agcggcggcg	gcggcagcat	gcaggatgag	1320
gacggctaca	tgacctgaa	cgtgcagagc	aagaagagga	gcagcgcca	gaccagccag	1380
ctgaccttca	aggactacag	cgtgacctg	cactggtaca	agtgagcggc	cgcgtcgac	1439
<210>	52					
<211>	1329					
<212>	DNA					
<213>	智人					
<220>						
<221>	尚未归类的特征					
<223>	NK15_10					
<400>	52					
gccccacaa	tggccctgcc	tgtgacagcc	ctgctgctgc	ctctggccct	gctgctgcat	60
gctgccaggc	ctctgttcaa	ccaggagggtg	cagatccctc	tgaccgagag	ctactgcggc	120
ccctgcccc	agaactggat	ctgctacaag	aacaactgct	accagttctt	cgacgagagc	180
aagaactgg	acgagagcca	ggccagctgc	atgtcccaga	acgctagcct	gctgaagggtg	240
tatagcaagg	aggaccagga	cctgctgaag	ctgggtgaaga	gctaccactg	gatgggcctg	300
gtgcacatcc	ccaccaacgg	ctcctggcag	tgggaggacg	gcagcatcct	gagccctaac	360
ctgctgacca	tcatcgagat	gcagaaggga	gactgcgccc	tgtacgccag	ctcctttaag	420
ggctacatcg	agaactgcag	cacccccaac	acctacatct	gtatgcagag	gaccgtggga	480
ggcggcggca	gcggcggcgg	cggcagcggc	ggcggcggca	gcttattcaa	ccaagaagtt	540
caaattccct	tgaccgaaa	ttactgtggc	ccatgtecta	aaaactggat	atgttacaaa	600
aataactgct	accaattttt	tgatgagagt	aaaaactgg	atgagagcca	ggcttcttgt	660
atgtctcaaa	atgccagcct	tctgaaagta	tacagcaaag	aggaccagga	tttacttaaa	720
ctgggtgaagt	catatcattg	gatgggacta	gtacacattc	caacaaatgg	atcttggcag	780
tgggaagatg	gctccattct	ctcaccacac	ctactaacia	taattgaaat	gcagaaggga	840
gactgtgcac	tctatgcctc	gagctttaa	ggctatatag	aaaactgttc	aactccaaat	900
acgtacatct	gcatgcaaag	gactgtgacc	accaccctg	cccctagacc	ccctacacct	960
gcccctacca	tcgccagcca	gcctctgagc	ctgagaccgg	aggcctgtag	acctgctgcc	1020

ggaggagccg tgcacacaag aggcctggac ttcgcctgcg acgtgagctt ctgcctgggtg	1080
atgggtgctgc tgttcgccgt ggacaccggc ctgtacttca gcgtgaagac caacatcagg	1140
agcagcacca gggactggaa ggaccacaaa ttcaagtgga ggaaggacc cagagacaag	1200
aagaggggca ggaagaagct gctgtacatc ttcaagcagc cttcatgag gcctgtgcag	1260
accacccagg aggaggacgg ctgcagctgc aggttcctg aggaggaaga gggcggctgc	1320
gagctgtga	1329
<210> 53	
<211> 1239	
<212> DNA	
<213> 智人	
<220>	
<221> 尚未归类的特征	
<223> NK15_11	
<400> 53	
gccgccacca tggctctgcc cgtcaccgca ctgctgctgc ctctggctct gctgctgcac	60
gccgcacgac cactgttcaa tcaggaagtc cagatcccc tgacagagtc ttactgcggc	120
ccatgtccca agaactggat ctgctacaag aacaattggt atcagttctt tgacgagagc	180
aagaactggat atgagtccca ggccctcttgc atgagccaga atgcctctct gctgaagggtg	240
tacagcaagg aggaccagga tctgctgaag ctggtgaagt cctatcactg gatgggcctg	300
gtgcacatcc ctacaaacgg ctcttggcag tgggaggacg gctccatcct gtctccaaat	360
ctgctgacca tcatcgagat gcagaagggc gattgcgccc tgtacgccag ctcttcaag	420
ggctatatcg agaactgctc cacaccaat acctacatct gtatgcagag gaccgtgacc	480
acaaccctg caccacgcc ccctacacca gcacctacca tcgcaagcca gcctctgtcc	540
ctgcggccag aggcatgtag accagcagca ggaggagcag tgacacacaag aggcctggac	600
ttgcctgcg atgtgagctt ttgtctggtc atgggtgctgc tgttcgccgt ggataccggc	660
ctgtactttt ccgtgaagac aaatatcagg tctagcacc gcgactggaa ggatcacaag	720
tttaagtggc ggaaggacc tcaggataag aagcggggca gaaagaagct gctgtatatc	780
ttcaagcagc cttcatgcg gccctgacg acaaccagg aggaagacgg ctgctcatgt	840
agatttcctg aagaagaaga agggggctgt gaactgtgga ggaggaaaag gaaggagaaa	900
cagagcgaga cctcccctaa ggagttctg acctctacg aggacgtgaa ggacctgaag	960
accaggagga accacgagca ggaacagacc tttcttggcg gaggcagcac catctacagc	1020
atgatccaga gccagagcag cgcccctacc agccaagagc ctgcctacac cctgtacagc	1080
ctgatccagc ccagcaggaa aagcggctcc aggaagagga accacagccc cagcttcaac	1140
agcaccatct atgagtgat cggcaagagc cagcccaagg cccagaacct tgccaggctg	1200
tccaggaagg agctggagaa cttcgacgtg tacagctga	1239
<210> 54	
<211> 1064	
<212> DNA	
<213> 智人	

<220>	
<221>	尚未归类的特征
<223>	NK15_12
<400>	54
ggatccgaat tcgccgccac catggctctg cccgtcaccg cactgctgct gcctctggct	60
ctgctgctgc acgccgcacg accactgttc aatcaggaag tccagatccc cctgacagag	120
tcttactgcg gcccattgtcc caagaactgg atctgctaca agaacaattg ttatcagttc	180
tttgacgaga gcaagaactg gtatgagtcc caggcctctt gcatgagcca gaatgcctct	240
ctgctgaagg tgtacagcaa ggaggaccag gatctgctga agctggtgaa gtccatcac	300
tggatgggcc tggtgacat ccctacaaac ggctcttggc agtgggagga cggctccatc	360
ctgtctccaa atctgctgac catcatcgag atgcagaagg gcgattgcgc cctgtacgcc	420
agctccttca agggtatat cgagaactgc tccacacca atacctacat ctgtatgcag	480
aggaccgtga ccacaacccc tgcaccacgc cccctacac cagcacctac catcgcaagc	540
cagcctctgt ccctgcggcc agaggcatgt agaccagcag caggaggagc agtgcacaca	600
agaggcctgg acttcgctg cgatgtgagc ttttgtctgg tcatggtgct gctgttcgcc	660
gtggataccg gcctgtactt ttccgtgaag acaaatatca ggtctagcac ccgcgactgg	720
aaggatcaca agtttaagtg gcggaaggac cctcaggata agaagcgggg cagaaagaag	780
ctgctgtata tcttcaagca gcccttcatg cggcccgtgc agacaacca ggaggaagac	840
ggctgctcat gtagatttcc tgaagaagaa gaagggggct gtgaactggg cggaggaggc	900
agcggcggcg gcggcagcgg cggcggcggc agcatgcagg atgaggacgg ctacatgacc	960
ctgaacgtgc agagcaagaa gaggagcagc gccagacca gccagctgac cttcaaggac	1020
tacagcgtga ccctgcactg gtacaagtga gcggccgcgt cgac	1064
<210>	55
<211>	8
<212>	PRT
<213>	智人
<220>	
<221>	尚未归类的特征
<223>	FLAG标签
<400>	55
Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys	
1	5
<210>	56
<211>	6
<212>	PRT
<213>	智人
<220>	
<221>	尚未归类的特征
<223>	His标签

gtgatcggca agagccagcc caaggcccag aaccctgcca ggctgtccag gaaggagctg 1140
 gagaacttcg acgtgtacag cagagtgaag ttcagcagga gcgcagacgc ccccgctac 1200
 cagcagggcc agaaccagct ctataacgag ctcaatctag gacgaagaga ggagtacgat 1260
 gttttggaca agagacgtgg ccgggaccct gagatggggg gaaagccgag aaggaagaac 1320
 cctcaggaag gcctgtacaa tgaactgcag aaagataaga tggcggaggc ctacagtgag 1380
 attgggatga aaggcgagcg ccggaggggc aaggggcacg atggccttta ccagggtctc 1440
 agtacagcca ccaaggacac ctacgacgcc cttcacatgc aggccctgcc ccctcgcta 1499

<210> 59

<211> 499

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> 尚未归类的特征

<223> 变体13的氨基酸序列

<400> 59

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Leu Phe Asn Gln Glu Val Gln Ile Pro Leu Thr
 20 25 30

Glu Ser Tyr Cys Gly Pro Cys Pro Lys Asn Trp Ile Cys Tyr Lys Asn
 35 40 45

Asn Cys Tyr Gln Phe Phe Asp Glu Ser Lys Asn Trp Tyr Glu Ser Gln
 50 55 60

Ala Ser Cys Met Ser Gln Asn Ala Ser Leu Leu Lys Val Tyr Ser Lys
 65 70 75 80

Glu Asp Gln Asp Leu Leu Lys Leu Val Lys Ser Tyr His Trp Met Gly
 85 90 95

Leu Val His Ile Pro Thr Asn Gly Ser Trp Gln Trp Glu Asp Gly Ser
 100 105 110

Ile Leu Ser Pro Asn Leu Leu Thr Ile Ile Glu Met Gln Lys Gly Asp
 115 120 125

Cys Ala Leu Tyr Ala Ser Ser Phe Lys Gly Tyr Ile Glu Asn Cys Ser
 130 135 140

Thr Pro Asn Thr Tyr Ile Cys Met Gln Arg Thr Val Thr Thr Thr Pro
 145 150 155 160

Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu
 165 170 175

Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His
 180 185 190

Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu
 195 200 205
 Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr
 210 215 220
 Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe
 225 230 235 240
 Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg
 245 250 255
 Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Trp Arg Arg Lys Arg
 260 265 270
 Lys Glu Lys Gln Ser Glu Thr Ser Pro Lys Glu Phe Leu Thr Ile Tyr
 275 280 285
 Glu Asp Val Lys Asp Leu Lys Thr Arg Arg Asn His Glu Gln Glu Gln
 290 295 300
 Thr Phe Pro Gly Gly Gly Ser Thr Ile Tyr Ser Met Ile Gln Ser Gln
 305 310 315 320
 Ser Ser Ala Pro Thr Ser Gln Glu Pro Ala Tyr Thr Leu Tyr Ser Leu
 325 330 335
 Ile Gln Pro Ser Arg Lys Ser Gly Ser Arg Lys Arg Asn His Ser Pro
 340 345 350
 Ser Phe Asn Ser Thr Ile Tyr Glu Val Ile Gly Lys Ser Gln Pro Lys
 355 360 365
 Ala Gln Asn Pro Ala Arg Leu Ser Arg Lys Glu Leu Glu Asn Phe Asp
 370 375 380
 Val Tyr Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr
 385 390 395 400
 Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg
 405 410 415
 Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met
 420 425 430
 Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu
 435 440 445
 Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys
 450 455 460
 Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu
 465 470 475 480
 Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu
 485 490 495
 Pro Pro Arg

<210> 60
 <211> 870
 <212> DNA
 <213> 智人
 <220>
 <221> 尚未归类的特征
 <223> DNA序列变体14
 <400> 60
 atggccttac cagtgaccgc cttgctcctg ccgctggcct tgctgctcca cgccgccagg 60
 ccgttattca accaagaagt tcaaattccc ttgaccgaaa gttactgtgg cccatgtcct 120
 aaaaactgga tatgttacia aaataactgc tacciaatfff ttgatgagag taaaaactgg 180
 tatgagagcc aggettcttg tatgtctcaa aatgccagcc ttctgaaagt atacagcaaa 240
 gaggaccagg atttacttaa actggtgaag tcatatcatt ggatgggact agtacacatt 300
 ccaacaaatg gatcttggca gtgggaagat ggctccattc tctacccaa cctactaaca 360
 ataattgaaa tgcagaaggg agactgtgca ctctatgect cgagctttaa aggctatata 420
 gaaaactggt caactccaaa tacgtacatc tgcatgcaaa ggactgtgac cacgacgcca 480
 gcgccgcgac caccaacacc ggcgcccacc atcgcgtcgc agcccctgtc cctgcgcccc 540
 gaggcgtgcc ggccagcggc gggggcgca gtgcacacga gggggctgga cttcgcctgt 600
 gatatctaca tctggggccc cttggccggg acttgtgggg tccttctcct gtcactggtt 660
 atcacccttt actgcaaacg gggcagaaag aaactcctgt atatattcaa acaaccattt 720
 atgagaccag tacaactac tcaagaggaa gatggctgta gctgccgatt tccagaagaa 780
 gaagaaggag gatgtgaact gctgtgcgca cgcccacgcc gcagccccgc ccaagatggc 840
 aaagtctaca tcaacatgcc aggcaggggc 870

<210> 61
 <211> 290
 <212> PRT
 <213> 智人
 <220>
 <221> 尚未归类的特征
 <223> 氨基酸序列变体14
 <400> 61
 Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15
 His Ala Ala Arg Pro Leu Phe Asn Gln Glu Val Gln Ile Pro Leu Thr
 20 25 30
 Glu Ser Tyr Cys Gly Pro Cys Pro Lys Asn Trp Ile Cys Tyr Lys Asn
 35 40 45
 Asn Cys Tyr Gln Phe Phe Asp Glu Ser Lys Asn Trp Tyr Glu Ser Gln
 50 55 60

ccgttattca accaagaagt tcaaattccc ttgaccgaaa gttactgtgg cccatgtcct 120
 aaaaactgga tatgttacia aaataactgc taccaatttt ttgatgagag taaaaactgg 180
 tatgagagcc aggccttctg tatgtctcaa aatgccagcc ttctgaaagt atacagcaaa 240
 gaggaccagg atttacttaa actggtgaag tcatatcatt ggatgggact agtacacatt 300
 ccaacaaatg gatcttggca gtgggaagat ggctccattc tctcacccaa cctactaaca 360
 ataattgaaa tgcagaaggg agactgtgca ctctatgcct cgagctttaa aggctatata 420
 gaaaactggt caactccaaa tacgtacatc tgcattgcaa ggactgtgac cacgacgcca 480
 gcgcccgcgac caccaacacc ggcgcccacc atcgcgtcgc agcccctgtc cctgcgcccc 540
 gaggcgtgcc ggccagcggc ggggggcgca gtgcacacga gggggctgga cttgcctgt 600
 gatattctaca tctgggcgcc cttggccggg acttgtgggg tccttctcct gtcactggtt 660
 atcacccttt actgcaaacg gggcagaaag aaactcctgt atatattcaa acaaccattt 720
 atgagaccag taaaaactac tcaagaggaa gatggctgta gctgccgatt tccagaagaa 780
 gaagaaggag gatgtgaact gctgtgcgca cgcccacgcc gcagccccgc ccaagatggc 840
 aaagtctaca tcaacatgcc aggcaggggc tggaggagga aaaggaagga gaaacagagc 900
 gagacctccc ctaaggagtt cctgaccatc tacgaggacg tgaaggacct gaagaccagg 960
 aggaaccacg agcaggaaca gacctttcct ggcggaggca gcaccatcta cagcatgac 1020
 cagagccaga gcagcgcgcc taccagccaa gagcctgcct acaccctgta cagcctgac 1080
 cagcccagca ggaaaagcgg ctccaggaag aggaaccaca gccccagctt caacagcacc 1140
 atctatgagg tgatcggcaa gagccagccc aaggcccaga accctgccag gctgtccagg 1200
 aaggagctgg agaacttca cgtgtacagc 1230

<210> 63

<211> 410

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> 尚未归类的特征

<223> 氨基酸序列变体15

<400> 63

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15
 His Ala Ala Arg Pro Leu Phe Asn Gln Glu Val Gln Ile Pro Leu Thr
 20 25 30
 Glu Ser Tyr Cys Gly Pro Cys Pro Lys Asn Trp Ile Cys Tyr Lys Asn
 35 40 45
 Asn Cys Tyr Gln Phe Phe Asp Glu Ser Lys Asn Trp Tyr Glu Ser Gln
 50 55 60
 Ala Ser Cys Met Ser Gln Asn Ala Ser Leu Leu Lys Val Tyr Ser Lys
 65 70 75 80
 Glu Asp Gln Asp Leu Leu Lys Leu Val Lys Ser Tyr His Trp Met Gly

	85	90	95
Leu Val His Ile Pro Thr Asn Gly Ser Trp Gln Trp Glu Asp Gly Ser			
	100	105	110
Ile Leu Ser Pro Asn Leu Leu Thr Ile Ile Glu Met Gln Lys Gly Asp			
	115	120	125
Cys Ala Leu Tyr Ala Ser Ser Phe Lys Gly Tyr Ile Glu Asn Cys Ser			
	130	135	140
Thr Pro Asn Thr Tyr Ile Cys Met Gln Arg Thr Val Thr Thr Thr Pro			
145	150	155	160
Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu			
	165	170	175
Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His			
	180	185	190
Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu			
	195	200	205
Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr			
	210	215	220
Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe			
225	230	235	240
Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg			
	245	250	255
Phe Pro Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Leu Cys Ala Arg Pro			
	260	265	270
Arg Arg Ser Pro Ala Gln Asp Gly Lys Val Tyr Ile Asn Met Pro Gly			
	275	280	285
Arg Gly Trp Arg Arg Lys Arg Lys Glu Lys Gln Ser Glu Thr Ser Pro			
	290	295	300
Lys Glu Phe Leu Thr Ile Tyr Glu Asp Val Lys Asp Leu Lys Thr Arg			
305	310	315	320
Arg Asn His Glu Gln Glu Gln Thr Phe Pro Gly Gly Gly Ser Thr Ile			
	325	330	335
Tyr Ser Met Ile Gln Ser Gln Ser Ser Ala Pro Thr Ser Gln Glu Pro			
	340	345	350
Ala Tyr Thr Leu Tyr Ser Leu Ile Gln Pro Ser Arg Lys Ser Gly Ser			
	355	360	365
Arg Lys Arg Asn His Ser Pro Ser Phe Asn Ser Thr Ile Tyr Glu Val			
	370	375	380
Ile Gly Lys Ser Gln Pro Lys Ala Gln Asn Pro Ala Arg Leu Ser Arg			
385	390	395	400

Lys Glu Leu Glu Asn Phe Asp Val Tyr Ser

405

410

<210> 64

<211> 1232

<212> DNA

<213> 智人

<220>

<221> 尚未归类的特征

<223> DNA序列 变体16

<400> 64

```

atggccttac cagtgaccgc cttgctcctg ccgctggcct tgctgctcca cgccgccagg      60
ccgttattca accaagaagt tcaaattccc ttgaccgaaa gttactgtgg cccatgtcct      120
aaaaactgga tatgttataa aaataactgc taccaatttt ttgatgagag taaaaactgg      180
tatgagagcc aggcttcttg tatgtctcaa aatgccagcc ttctgaaagt atacagcaaa      240
gaggaccagg atttacttaa actggtgaag tcatatcatt ggatgggact agtacacatt      300
ccaacaaatg gatcttggca gtgggaagat ggctccattc tctcaccaa cctactaaca      360
ataattgaaa tgcagaaggg agactgtgca ctctatgcct cgagctttaa aggctatata      420
gaaaactggt caactccaaa tacgtacatc tgcatgcaaa ggactgtgac cacgacgcca      480
gcgccgcgac caccaacacc ggcgccacc atcgcgtcgc agcccctgtc cctgcgcccc      540
gaggcgtgcc ggccagcggc gggggcgca gtgcacacga gggggctgga cttcgcctgt      600
gatatctaca tctgggggcc cttggccggg acttgtgggg tccttctcct gtcactggtt      660
atcacccitt actgcaaacg gggcagaaag aaactcctgt atatattcaa acaaccattt      720
atgagaccag tacaactac tcaagaggaa gatggctgta gctgccgatt tccagaagaa      780
gaagaaggag gatgtgaact gtggaggagg aaaaggaagg agaaacagag cgagacctcc      840
cctaaggagt tcctgacat ctacaggac gtgaaggacc tgaagaccag gaggaaccac      900
gagcaggaac agaccttcc tggcggaggc agcaccatct acagcatgat ccagagccag      960
agcagcgccc ctaccagcca agagcctgcc tacaccctgt acagcctgat ccagcccagc     1020
aggaaaagcg gctccaggaa gaggaaccac agccccagct tcaacagcac catctatgag     1080
gtgatcggca agagccagcc caaggcccag aaccctgcca ggctgtccag gaaggagctg     1140
gagaacttcg acgtgtacag cctgtgcgca cgcccacgcc gcagccccgc ccaagatggc     1200
aaagtctaca tcaacatgcc aggcaggggc tg                                     1232

```

<210> 65

<211> 410

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> 尚未归类的特征

<223> 氨基酸序列变体16

<400> 65

305	310	315	320
Ser Ser Ala Pro Thr Ser Gln Glu Pro Ala Tyr Thr Leu Tyr Ser Leu			
	325	330	335
Ile Gln Pro Ser Arg Lys Ser Gly Ser Arg Lys Arg Asn His Ser Pro			
	340	345	350
Ser Phe Asn Ser Thr Ile Tyr Glu Val Ile Gly Lys Ser Gln Pro Lys			
	355	360	365
Ala Gln Asn Pro Ala Arg Leu Ser Arg Lys Glu Leu Glu Asn Phe Asp			
	370	375	380
Val Tyr Ser Leu Cys Ala Arg Pro Arg Arg Ser Pro Ala Gln Asp Gly			
385	390	395	400
Lys Val Tyr Ile Asn Met Pro Gly Arg Gly			
	405	410	

- <210> 66
- <211> 1587
- <212> DNA
- <213> 智人
- <220>
- <221> 尚未归类的特征
- <223> DNA序列 变体17
- <400> 66

atggccctgc ccgtgacagc tctgctgctg cctctggccc tgctgctgca tgccgctaga	60
cccctgttca accaggaggt gcagatcccc ctgaccgaaa gctactgctg cccctgcccc	120
aagaactgga tctgttacia gaacaactgc tatcagttct tcgacgagag caagaactgg	180
tacgagagcc aggccagctg tatgagccag aacgccagcc tgctgaaagt gtatagcaag	240
gaggaccagg acctgctgaa gctggtgaag agctaccact ggatgggcct ggtgcacatc	300
cccaccaacg gaagctggca gtgggaggac ggcagcatcc tgagcccaa cctgctgacc	360
atcatcgaga tgcagaaggc cgactgcgcc ctgtatgcca gcagcttcaa gggctacatc	420
gagaactgta gcaccccaa cacctacatc tgcattgaga ggaccgtggg cggcggcggc	480
agcggcggag gcggtctcgg cggcggcggc agcttattca accaagaagt tcaaattccc	540
ttgaccgaaa gttactgtgg cccatgtcct aaaaactgga tatgttacia aaataactgc	600
taccaatttt ttgatgagag taaaaactgg tatgagagcc aggtctcttg tatgtctcaa	660
aatgccagcc ttctgaaagt atacagcaa gaggaccagg atttacttaa actggtgaag	720
tcatatcatt ggatgggact agtacacatt ccaacaaatg gatcttgcca gtgggaagat	780
ggctccattc tctacccaa cctaactaaca ataattgaaa tgcagaaggc agactgtgca	840
ctctatgcct cgagctttaa aggttatata gaaaactgtt caactccaaa tacgtacatc	900
tgcattgaaa ggactgtgac cacgacgcca gcgccgcgac caccaacacc ggcgccacc	960
atcgcgtcgc agccccctgc cctgcgcca gagcgtgcc ggccagcggc gggggcgca	1020
gtgcacacga gggggctgga cttgcctgt gatattaca tctgggcgcc cttggccggg	1080

acttgtgggg tccttctcct gtcactggtt atcacctttt actgcaaacg gggcagaaag 1140
 aaactcctgt atatatcaa acaaccattt atgagaccag taaaactac tcaagaggaa 1200
 gatggctgta gctgccgatt tccagaagaa gaagaaggag gatgtgaact gagagtgaag 1260
 ttcagcagga gcgcagacgc ccccgctac cagcagggcc agaaccagct ctataacgag 1320
 ctcaatctag gacgaagaga ggagtacgat gttttggaca agagacgtgg ccgggaccct 1380
 gagatggggg gaaagccgag aaggaagaac cctcaggaag gcctgtacaa tgaactgcag 1440
 aaagataaga tggcggaggc ctacagtgag attgggatga aaggcgagcg ccggaggggc 1500
 aaggggcacg atggccttta ccagggtctc agtacagcca ccaaggacac ctacgacgcc 1560
 cttcacatgc aggccttgc cctcgc 1587

<210> 67

<211> 529

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> 尚未归类的特征

<223> 氨基酸序列变体17

<400> 67

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15
 His Ala Ala Arg Pro Leu Phe Asn Gln Glu Val Gln Ile Pro Leu Thr
 20 25 30
 Glu Ser Tyr Cys Gly Pro Cys Pro Lys Asn Trp Ile Cys Tyr Lys Asn
 35 40 45
 Asn Cys Tyr Gln Phe Phe Asp Glu Ser Lys Asn Trp Tyr Glu Ser Gln
 50 55 60
 Ala Ser Cys Met Ser Gln Asn Ala Ser Leu Leu Lys Val Tyr Ser Lys
 65 70 75 80
 Glu Asp Gln Asp Leu Leu Lys Leu Val Lys Ser Tyr His Trp Met Gly
 85 90 95
 Leu Val His Ile Pro Thr Asn Gly Ser Trp Gln Trp Glu Asp Gly Ser
 100 105 110
 Ile Leu Ser Pro Asn Leu Leu Thr Ile Ile Glu Met Gln Lys Gly Asp
 115 120 125
 Cys Ala Leu Tyr Ala Ser Ser Phe Lys Gly Tyr Ile Glu Asn Cys Ser
 130 135 140
 Thr Pro Asn Thr Tyr Ile Cys Met Gln Arg Thr Val Gly Gly Gly Gly
 145 150 155 160
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Leu Phe Asn Gln Glu
 165 170 175

Val Gln Ile Pro Leu Thr Glu Ser Tyr Cys Gly Pro Cys Pro Lys Asn
 180 185 190
 Trp Ile Cys Tyr Lys Asn Asn Cys Tyr Gln Phe Phe Asp Glu Ser Lys
 195 200 205
 Asn Trp Tyr Glu Ser Gln Ala Ser Cys Met Ser Gln Asn Ala Ser Leu
 210 215 220
 Leu Lys Val Tyr Ser Lys Glu Asp Gln Asp Leu Leu Lys Leu Val Lys
 225 230 235 240
 Ser Tyr His Trp Met Gly Leu Val His Ile Pro Thr Asn Gly Ser Trp
 245 250 255
 Gln Trp Glu Asp Gly Ser Ile Leu Ser Pro Asn Leu Leu Thr Ile Ile
 260 265 270
 Glu Met Gln Lys Gly Asp Cys Ala Leu Tyr Ala Ser Ser Phe Lys Gly
 275 280 285
 Tyr Ile Glu Asn Cys Ser Thr Pro Asn Thr Tyr Ile Cys Met Gln Arg
 290 295 300
 Thr Val Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr
 305 310 315 320
 Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala
 325 330 335
 Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile
 340 345 350
 Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser
 355 360 365
 Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr
 370 375 380
 Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu
 385 390 395 400
 Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu
 405 410 415
 Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln
 420 425 430
 Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu
 435 440 445
 Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly
 450 455 460
 Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln
 465 470 475 480
 Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu

	485	490	495	
Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr				
	500	505	510	
Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro				
	515	520	525	
Arg				
<210>	68			
<211>	405			
<212>	DNA			
<213>	智人			
<220>				
<221>	尚未归类的特征			
<223>	可替代的NKG2D密码子优化的胞外结构域的DNA序列			
<400>	68			
ctgttcaacc aggagtgca gatccccctg accgaaagct actgcggccc ctgccccaaag				60
aactggatct gttacaagaa caactgctat cagttcttcg acgagagcaa gaactggtac				120
gagagccagg ccagctgtat gagccagaac gccagcctgc tgaaagtgta tagcaaggag				180
gaccaggacc tgctgaagct ggtgaagagc taccactgga tgggcctggt gcacatcccc				240
accaacggaa gctggcagtg ggaggacggc agcatcctga gccccaacct gctgaccatc				300
atcgagatgc agaagggcga ctgcgcctg tatgccagca gtttcaaggg ctacatcgag				360
aactgtagca cccccaacac ctacatctgc atgcagagga ccgtg				405
<210>	69			
<211>	21			
<212>	PRT			
<213>	智人			
<220>				
<221>	尚未归类的特征			
<223>	氨基酸序列CD3 ζ 跨膜			
<400>	69			
Leu Cys Tyr Leu Leu Asp Gly Ile Leu Phe Ile Tyr Gly Val Ile Leu				
1	5	10	15	
Thr Ala Leu Phe Leu				
	20			
<210>	70			
<211>	876			
<212>	DNA			
<213>	智人			
<220>				
<221>	尚未归类的特征			

<223> DNA序列 变体18 (NK39)

<400> 70

```

atggctctgc cgcgcaccgc actgctgctg cctctggctc tgctgctgca cgccgcacga      60
ccactgttca atcaggaagt ccagatcccc ctgacagagt cttactgctg cccatgtccc      120
aagaactgga tctgctacaa gaacaattgt tatcagttct ttgacgagag caagaactgg      180
tatgagtccc aggcctcttg catgagccag aatgcctctc tgctgaaggt gtacagcaag      240
gaggaccagg atctgctgaa gctgggtaag tcctatactt ggatgggcct ggtgcacatc      300
cctacaaaac gctcttggca gtgggaggac ggetccatcc tgtctccaaa tctgctgacc      360
atcatcgaga tgcagaaggg cgattgcgcc ctgtacgcca gctccttcaa gggctatatc      420
gagaactgct ccacacccaa tacctacatc tgtatgcaga ggaccgtgac cacaaccctt      480
gcaccacgcc cccctacacc agcacctacc atcgcaagcc agcctctgtc cctgctggcca      540
gaggcatgta gaccagcagc aggaggagca gtgcacacaa gaggcctgga cttegcctgc      600
gatcccaaac tctgctacct gctggatgga atctcttcca tctatggtgt cattctcact      660
gccttgttcc tgaagacaaa tatcaggtct agcaccgcgc actggaagga tcacaagttt      720
aagtggcgga aggaccctca ggataagaag cggggcgaaa agaagctgct gtatatcttc      780
aagcagccct tcatgcggcc cgtgcagaca acccaggagg aagacggctg ctcatgtaga      840
tttctgaag aagaagaagg gggctgtgaa ctgtaa      876

```

<210> 71

<211> 291

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> 尚未归类的特征

<223> 氨基酸序列变体18 (NK39)

<400> 71

```

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
1           5           10          15
His Ala Ala Arg Pro Leu Phe Asn Gln Glu Val Gln Ile Pro Leu Thr
          20          25          30
Glu Ser Tyr Cys Gly Pro Cys Pro Lys Asn Trp Ile Cys Tyr Lys Asn
          35          40          45
Asn Cys Tyr Gln Phe Phe Asp Glu Ser Lys Asn Trp Tyr Glu Ser Gln
          50          55          60
Ala Ser Cys Met Ser Gln Asn Ala Ser Leu Leu Lys Val Tyr Ser Lys
65          70          75          80
Glu Asp Gln Asp Leu Leu Lys Leu Val Lys Ser Tyr His Trp Met Gly
          85          90          95
Leu Val His Ile Pro Thr Asn Gly Ser Trp Gln Trp Glu Asp Gly Ser
          100         105         110

```

Ile Leu Ser Pro Asn Leu Leu Thr Ile Ile Glu Met Gln Lys Gly Asp
 115 120 125
 Cys Ala Leu Tyr Ala Ser Ser Phe Lys Gly Tyr Ile Glu Asn Cys Ser
 130 135 140
 Thr Pro Asn Thr Tyr Ile Cys Met Gln Arg Thr Val Thr Thr Thr Pro
 145 150 155 160
 Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu
 165 170 175
 Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His
 180 185 190
 Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Pro Lys Leu Cys Tyr Leu Leu
 195 200 205
 Asp Gly Ile Leu Phe Ile Tyr Gly Val Ile Leu Thr Ala Leu Phe Leu
 210 215 220
 Lys Thr Asn Ile Arg Ser Ser Thr Arg Asp Trp Lys Asp His Lys Phe
 225 230 235 240
 Lys Trp Arg Lys Asp Pro Gln Asp Lys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu
 245 250 255
 Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln
 260 265 270
 Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly
 275 280 285
 Cys Glu Leu
 290

<210> 72

<211> 1323

<212> DNA

<213> 智人

<220>

<221> 尚未归类的特征

<223> DNA序列 NK39_1

<400> 72

atggccctgc ccgtgacagc tctgctgctg cctctggccc tgctgctgca tgccgctaga 60
 cccctgttca accaggaggt gcagatcccc ctgaccgaaa gctactgctg ccctgcccc 120
 aagaactgga tctgttataa gaacaactgc tatcagttct tcgacgagag caagaactgg 180
 tacgagagcc aggccagctg tatgagccag aacgccagcc tgctgaaagt gtatagcaag 240
 gaggaccagg acctgctgaa gctggtgaag agctaccact ggatgggect ggtgcacatc 300
 cccaccaacg gaagctggca gtgggaggac ggcagcatcc tgagcccca cctgctgacc 360
 atcatcgaga tgcagaaggg cgactgcgcc ctgtatgcca gcagcttcaa gggctacatc 420

gagaactgta gcacccccaa cacctacatc tgcattgcaga ggaccgtggg cggcggcggc 480
 agcggcggag gcggctccgg cggcggcggc agcttattca accaagaagt tcaaattccc 540
 ttgaccgaaa gttactgtgg cccatgtcct aaaaactgga tatgttacia aaataactgc 600
 taccaatttt ttgatgagag taaaaactgg tatgagagcc aggcttcttg tatgtctcaa 660
 aatgccagcc ttctgaaagt atacagcaaa gaggaccagg atttacttaa actggtgaag 720
 tcatatcatt ggatgggact agtacacatt ccaacaaatg gatcttggca gtgggaagat 780
 ggctccattc tctcacccaa cctactaaca ataattgaaa tgcagaaggg agactgtgca 840
 ctctatgcct cgagctttaa aggctatata gaaaactggt caactccaaa tacgtacatc 900
 tgcattgcaaa ggactgtgac caccaccct gctcccagac cccctacacc tgcccctaca 960
 atcgccagcc agcccctgag cctgagacct gaggcctgca gacctgctgc tggaggcgct 1020
 gtgcacacaa ggggctcga ctctgctgc gaccccaaac tctgctacct gctggatgga 1080
 atcctcttca tctatggtgt cattctcaact gcttgttcc tgaagacaaa tctcaggtct 1140
 agcaccgcg actggaagga tcacaagttt aagtggcgga aggacctca ggataagaag 1200
 cggggcagaa agaagctgct gtatatcttc aagcagcct tcatgcggcc cgtgcagaca 1260
 acccaggagg aagacggctg ctcatgtaga tttctgaag aagaagaagg gggctgtgaa 1320
 ctg 1323

<210> 73

<211> 441

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> 尚未归类的特征

<223> 氨基酸序列NK39_1

<400> 73

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15
 His Ala Ala Arg Pro Leu Phe Asn Gln Glu Val Gln Ile Pro Leu Thr
 20 25 30
 Glu Ser Tyr Cys Gly Pro Cys Pro Lys Asn Trp Ile Cys Tyr Lys Asn
 35 40 45
 Asn Cys Tyr Gln Phe Phe Asp Glu Ser Lys Asn Trp Tyr Glu Ser Gln
 50 55 60
 Ala Ser Cys Met Ser Gln Asn Ala Ser Leu Leu Lys Val Tyr Ser Lys
 65 70 75 80
 Glu Asp Gln Asp Leu Leu Lys Leu Val Lys Ser Tyr His Trp Met Gly
 85 90 95
 Leu Val His Ile Pro Thr Asn Gly Ser Trp Gln Trp Glu Asp Gly Ser
 100 105 110
 Ile Leu Ser Pro Asn Leu Leu Thr Ile Ile Glu Met Gln Lys Gly Asp

115	120	125
Cys Ala Leu Tyr Ala Ser Ser Phe Lys Gly Tyr Ile Glu Asn Cys Ser		
130	135	140
Thr Pro Asn Thr Tyr Ile Cys Met Gln Arg Thr Val Gly Gly Gly Gly		
145	150	155
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Leu Phe Asn Gln Glu		
165	170	175
Val Gln Ile Pro Leu Thr Glu Ser Tyr Cys Gly Pro Cys Pro Lys Asn		
180	185	190
Trp Ile Cys Tyr Lys Asn Asn Cys Tyr Gln Phe Phe Asp Glu Ser Lys		
195	200	205
Asn Trp Tyr Glu Ser Gln Ala Ser Cys Met Ser Gln Asn Ala Ser Leu		
210	215	220
Leu Lys Val Tyr Ser Lys Glu Asp Gln Asp Leu Leu Lys Leu Val Lys		
225	230	235
Ser Tyr His Trp Met Gly Leu Val His Ile Pro Thr Asn Gly Ser Trp		
245	250	255
Gln Trp Glu Asp Gly Ser Ile Leu Ser Pro Asn Leu Leu Thr Ile Ile		
260	265	270
Glu Met Gln Lys Gly Asp Cys Ala Leu Tyr Ala Ser Ser Phe Lys Gly		
275	280	285
Tyr Ile Glu Asn Cys Ser Thr Pro Asn Thr Tyr Ile Cys Met Gln Arg		
290	295	300
Thr Val Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr		
305	310	315
Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala		
325	330	335
Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Pro		
340	345	350
Lys Leu Cys Tyr Leu Leu Asp Gly Ile Leu Phe Ile Tyr Gly Val Ile		
355	360	365
Leu Thr Ala Leu Phe Leu Lys Thr Asn Ile Arg Ser Ser Thr Arg Asp		
370	375	380
Trp Lys Asp His Lys Phe Lys Trp Arg Lys Asp Pro Gln Asp Lys Lys		
385	390	395
Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg		
405	410	415
Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro		
420	425	430

Ser Val Thr Leu His Trp Tyr Lys

340

<210> 76

<211> 1416

<212> DNA

<213> 智人

<220>

<221> 尚未归类的特征

<223> DNA序列 NK39_3

<400> 76

```

atggccctgc ccgtgacagc tctgctgctg cctctggccc tgctgctgca tgccgctaga      60
cccctgttca accaggaggt gcagatcccc ctgaccgaaa gctactgctg ccctgcccc      120
aagaactgga tctgttataa gaacaactgc tatcagttct tcgacgagag caagaactgg      180
tacgagagcc aggccagctg tatgagccag aacgccagcc tgctgaaagt gtatagcaag      240
gaggaccagg acctgctgaa gctggtgaag agctaccact ggatgggcct ggtgcacatc      300
cccaccaacg gaagctggca gtgggaggac ggcagcatcc tgagcccaa cctgctgacc      360
atcatcgaga tgcagaaggg cgactgcgcc ctgtatgcca gcagcttcaa gggctacatc      420
gagaactgta gcaccccaa cacctacatc tgcatgcaga ggaccgtggg cggcggcggc      480
agcggcggag gcggctccgg cggcggcggc agcttattca accaagaagt tcaaatccc      540
ttgaccgaaa gttactgtgg cccatgtcct aaaaactgga tatgttataa aaataactgc      600
taccaatttt ttgatgagag taaaaactgg tatgagagcc aggttcttg tatgtctcaa      660
aatgccagcc ttctgaaagt atacagcaa gaggaccagg atttacttaa actggtgaag      720
tcatatcatt ggatgggact agtacacatt ccaacaaatg gatcttgcca gtgggaagat      780
ggctccattc tctacccaa cctactaaca ataattgaaa tgcagaaggg agactgtgca      840
ctctatgcct cgagctttaa aggctatata gaaaactggt caactccaaa tacgtacatc      900
tgcatgcaaa ggactgtgac caccaccct gctcccagac cccctacacc tgcccctaca      960
atcgccagcc agcccctgag cctgagacct gaggcctgca gacctgctgc tggaggcct      1020
gtgcacacaa ggggcctcga cttgcctgc gacccaaac tctgctacct gctggatgga      1080
atcctcttca tctatggtgt cattctcact gccttgttcc tgctttactg caagcggggc      1140
agaaaagaagc tgctgtatat cttcaagcag cccttcattg ggcccgtgca gacaaccag      1200
gaggaagacg gctgctcatg tagatttct gaagaagaag aagggggctg tgaactgggc      1260
ggaggaggca gcggcggcgg cggcagcggc ggcggcggca gcatgcagga tgaggacggc      1320
tacaatgacc tgaacgtgca gagcaagaag aggagcagcg cccagaccag ccagctgacc      1380
ttcaaggact acagcgtgac cctgcaactgg tacaag      1416

```

<210> 77

<211> 472

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> 尚未归类的特征

<223> 氨基酸序列NK39_3

<400> 77

```

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
1           5           10           15
His Ala Ala Arg Pro Leu Phe Asn Gln Glu Val Gln Ile Pro Leu Thr
           20           25           30
Glu Ser Tyr Cys Gly Pro Cys Pro Lys Asn Trp Ile Cys Tyr Lys Asn
           35           40           45
Asn Cys Tyr Gln Phe Phe Asp Glu Ser Lys Asn Trp Tyr Glu Ser Gln
           50           55           60
Ala Ser Cys Met Ser Gln Asn Ala Ser Leu Leu Lys Val Tyr Ser Lys
65           70           75           80
Glu Asp Gln Asp Leu Leu Lys Leu Val Lys Ser Tyr His Trp Met Gly
           85           90           95
Leu Val His Ile Pro Thr Asn Gly Ser Trp Gln Trp Glu Asp Gly Ser
           100          105          110
Ile Leu Ser Pro Asn Leu Leu Thr Ile Ile Glu Met Gln Lys Gly Asp
           115          120          125
Cys Ala Leu Tyr Ala Ser Ser Phe Lys Gly Tyr Ile Glu Asn Cys Ser
           130          135          140
Thr Pro Asn Thr Tyr Ile Cys Met Gln Arg Thr Val Gly Gly Gly Gly
145          150          155          160
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Leu Phe Asn Gln Glu
           165          170          175
Val Gln Ile Pro Leu Thr Glu Ser Tyr Cys Gly Pro Cys Pro Lys Asn
           180          185          190
Trp Ile Cys Tyr Lys Asn Asn Cys Tyr Gln Phe Phe Asp Glu Ser Lys
           195          200          205
Asn Trp Tyr Glu Ser Gln Ala Ser Cys Met Ser Gln Asn Ala Ser Leu
           210          215          220
Leu Lys Val Tyr Ser Lys Glu Asp Gln Asp Leu Leu Lys Leu Val Lys
225          230          235          240
Ser Tyr His Trp Met Gly Leu Val His Ile Pro Thr Asn Gly Ser Trp
           245          250          255
Gln Trp Glu Asp Gly Ser Ile Leu Ser Pro Asn Leu Leu Thr Ile Ile
           260          265          270
Glu Met Gln Lys Gly Asp Cys Ala Leu Tyr Ala Ser Ser Phe Lys Gly
           275          280          285

```

Tyr Ile Glu Asn Cys Ser Thr Pro Asn Thr Tyr Ile Cys Met Gln Arg
 290 295 300
 Thr Val Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr
 305 310 315 320
 Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala
 325 330 335
 Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Pro
 340 345 350
 Lys Leu Cys Tyr Leu Leu Asp Gly Ile Leu Phe Ile Tyr Gly Val Ile
 355 360 365
 Leu Thr Ala Leu Phe Leu Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu
 370 375 380
 Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln
 385 390 395 400
 Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly
 405 410 415
 Cys Glu Leu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 420 425 430
 Gly Ser Met Gln Asp Glu Asp Gly Tyr Met Thr Leu Asn Val Gln Ser
 435 440 445
 Lys Lys Arg Ser Ser Ala Gln Thr Ser Gln Leu Thr Phe Lys Asp Tyr
 450 455 460
 Ser Val Thr Leu His Trp Tyr Lys
 465 470

<210> 78

<211> 807

<212> DNA

<213> 智人

<220>

<221> 尚未归类的特征

<223> DNA序列 NK39_4

<400> 78

atggctctgc ccgtcaccgc actgctgctg cctctggctc tgctgctgca cgccgcacga 60
 ccaactgttca atcaggaagt ccagatcccc ctgacagagt cttactgctg cccatgtccc 120
 aagaactgga tctgctacaa gaacaattgt tatcagttct ttgacgagag caagaactgg 180
 tatgagtccc aggcctcttg catgagccag aatgcctctc tgctgaaggt gtacagcaag 240
 gaggaccagg atctgctgaa gctggtgaag tcctatcact ggatgggcct ggtgcacatc 300
 cctacaaacg gctcttgcca gtgggaggac ggctccatcc tgtctccaaa tctgctgacc 360
 atcatcgaga tgcagaaggg cgattgcgcc ctgtacgcca gctccttcaa gggctatatc 420

gagaactgct ccacacccaa tacctacatc tgtatgcaga ggaccgtgac cacaaccct 480
 gcaccacgcc cccctacacc agcacctacc atcgcaagcc agcctctgtc cctgcggcca 540
 gaggcattgta gaccagcagc aggaggagca gtgcacacaa gaggcctgga cttgcctgc 600
 gatcccaaac tctgctacct gctggatgga atcctcttca tctatggtgt cattctcact 660
 gccttgttcc tgctttactg caagcggggc agaaagaagc tgctgtatat cttcaagcag 720
 cccttcatgc ggcccgtgca gacaaccag gaggaagacg gctgctcatg tagatttct 780
 gaagaagaag aagggggctg tgaactg 807

<210> 79

<211> 269

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> 尚未归类的特征

<223> 氨基酸序列NK39_4

<400> 79

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15
 His Ala Ala Arg Pro Leu Phe Asn Gln Glu Val Gln Ile Pro Leu Thr
 20 25 30
 Glu Ser Tyr Cys Gly Pro Cys Pro Lys Asn Trp Ile Cys Tyr Lys Asn
 35 40 45
 Asn Cys Tyr Gln Phe Phe Asp Glu Ser Lys Asn Trp Tyr Glu Ser Gln
 50 55 60
 Ala Ser Cys Met Ser Gln Asn Ala Ser Leu Leu Lys Val Tyr Ser Lys
 65 70 75 80
 Glu Asp Gln Asp Leu Leu Lys Leu Val Lys Ser Tyr His Trp Met Gly
 85 90 95
 Leu Val His Ile Pro Thr Asn Gly Ser Trp Gln Trp Glu Asp Gly Ser
 100 105 110
 Ile Leu Ser Pro Asn Leu Leu Thr Ile Ile Glu Met Gln Lys Gly Asp
 115 120 125
 Cys Ala Leu Tyr Ala Ser Ser Phe Lys Gly Tyr Ile Glu Asn Cys Ser
 130 135 140
 Thr Pro Asn Thr Tyr Ile Cys Met Gln Arg Thr Val Thr Thr Thr Pro
 145 150 155 160
 Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu
 165 170 175
 Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His
 180 185 190

Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Pro Lys Leu Cys Tyr Leu Leu
 195 200 205
 Asp Gly Ile Leu Phe Ile Tyr Gly Val Ile Leu Thr Ala Leu Phe Leu
 210 215 220
 Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln
 225 230 235 240
 Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser
 245 250 255
 Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu
 260 265

- <210> 80
- <211> 1143
- <212> DNA
- <213> 智人
- <220>
- <221> 尚未归类的特征
- <223> DNA序列 NK39_5
- <400> 80

```

atggctctgc ccgtcaccgc actgctgctg cctctggctc tgctgctgca cgccgcacga      60
ccactgttca atcaggaagt ccagatcccc ctgacagagt cttactgcgg cccatgtccc      120
aagaactgga tctgctacaa gaacaattgt tatcagttct ttgacgagag caagaactgg      180
tatgagtccc aggcctcttg catgagccag aatgcctctc tgctgaaggt gtacagcaag      240
gaggaccagg atctgctgaa gctgggtgaag tcctatcact ggatgggcct ggtgcacatc      300
cctacaaacg gctcttggca gtgggaggac ggctccatcc tgtctccaaa tctgctgacc      360
atcatcgaga tgcagaaggg cgattgcgcc ctgtacgcca gctccttcaa gggctatatc      420
gagaactgct ccacacccaa tacctacatc tgtatgcaga ggaccgtgac cacaaccctt      480
gcaccacgcc cccctacacc agcacctacc atcgcaagcc agcctctgtc cctgctggcca      540
gaggcatgta gaccagcagc aggaggagca gtgcacacaa gaggcctgga cttgcctgctc      600
gatcccaaac tctgctacct gctggatgga atcctcttca tctatggtgt cattctcact      660
gccttgttcc tgctttactg caagcggggc agaaagaagc tgctgtatat cttcaagcag      720
cccttcatgc ggcccgtgca gacaaccag gaggaagacg gctgctcatg tagatttctt      780
gaagaagaag aagggggctg tgaactgaga gtgaagttea gcaggagcgc agacgcccc      840
gcgtaccagc agggccagaa ccagctctat aacgagctca atctaggacg aagagaggag      900
tacgatgttt tggacaagag acgtggccgg gaccctgaga tggggggaaa gccgagaagg      960
aagaaccctc aggaaggcct gtacaatgaa ctgcagaaag ataagatggc ggaggcctac     1020
agtgagattg ggatgaaagg cgagcgcggg aggggcaagg ggcacgatgg cttttaccag     1080
ggtctcagta cagccaccaa ggacacctac gacgccttc acatgcaggc cctgccccct     1140
cgc                                             1143
    
```

<210> 81

<211> 381
 <212> PRT
 <213> 智人
 <220>
 <221> 尚未归类的特征
 <223> 氨基酸序列NK39_5
 <400> 81
 Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15
 His Ala Ala Arg Pro Leu Phe Asn Gln Glu Val Gln Ile Pro Leu Thr
 20 25 30
 Glu Ser Tyr Cys Gly Pro Cys Pro Lys Asn Trp Ile Cys Tyr Lys Asn
 35 40 45
 Asn Cys Tyr Gln Phe Phe Asp Glu Ser Lys Asn Trp Tyr Glu Ser Gln
 50 55 60
 Ala Ser Cys Met Ser Gln Asn Ala Ser Leu Leu Lys Val Tyr Ser Lys
 65 70 75 80
 Glu Asp Gln Asp Leu Leu Lys Leu Val Lys Ser Tyr His Trp Met Gly
 85 90 95
 Leu Val His Ile Pro Thr Asn Gly Ser Trp Gln Trp Glu Asp Gly Ser
 100 105 110
 Ile Leu Ser Pro Asn Leu Leu Thr Ile Ile Glu Met Gln Lys Gly Asp
 115 120 125
 Cys Ala Leu Tyr Ala Ser Ser Phe Lys Gly Tyr Ile Glu Asn Cys Ser
 130 135 140
 Thr Pro Asn Thr Tyr Ile Cys Met Gln Arg Thr Val Thr Thr Thr Pro
 145 150 155 160
 Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu
 165 170 175
 Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His
 180 185 190
 Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Pro Lys Leu Cys Tyr Leu Leu
 195 200 205
 Asp Gly Ile Leu Phe Ile Tyr Gly Val Ile Leu Thr Ala Leu Phe Leu
 210 215 220
 Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln
 225 230 235 240
 Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser
 245 250 255

Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys
 260 265 270
 Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln
 275 280 285
 Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu
 290 295 300
 Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg
 305 310 315 320
 Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met
 325 330 335
 Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly
 340 345 350
 Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp
 355 360 365
 Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 370 375 380

<210> 82

<211> 965

<212> DNA

<213> 智人

<220>

<221> 尚未归类的特征

<223> DNA序列 NK39_6

<400> 82

atggctctgc ccgtcaccgc actgctgctg cctctggctc tgctgctgca cgccgcacga 60
 ccactgttca atcaggaagt ccagatcccc ctgacagagt cttactgcfg cccatgtccc 120
 aagaactgga tctgctacaa gaacaattgt tatcagttct ttgacgagag caagaactgg 180
 tatgagtccc aggcctcttg catgagccag aatgcctctc tgctgaaggt gtacagcaag 240
 gaggaccagg atctgctgaa gctgggtaag tctatact ggatgggcct ggtgcacatc 300
 cctacaaacg gctcttggca gtgggaggac ggctccatcc tgtctccaaa tctgctgacc 360
 atcatcgaga tgcagaaggg cgattgcgcc ctgtacgcca gctccttcaa gggctatatc 420
 gagaactgct ccacacccaa tacctacatc tgtatgcaga ggaccgtgac cacaaccct 480
 gcaccacgcc cccctacacc agcacctacc atcgcaagcc agcctctgtc cctgcggcc 540
 gaggcattgta gaccagcagc aggaggagca gtgcacacaa gaggcctgga cttegcctgc 600
 gatcccaaac tctgctacct gctggatgga atcctcttca tctatggtgt cattctcact 660
 gccttgttcc tgctttactg caagcggggc agaaagaagc tgctgtatat cttaagcag 720
 cccttcatgc ggcccgtgca gacaaccagc gaggaagacg gctgctcatg tagatttct 780
 gaagaagaag aagggggctg tgaactgggc ggaggaggca gcggcgcgcg cggcagcggc 840
 ggcgggcgca gcatgcagga tgaggacggc tacatgacct tgaactgca gagcaagaag 900

aggagcagcg cccagaccag ccagctgacc ttcaaggact acagcgtgac cctgcactgg 960
tacaa 965
<210> 83
<211> 322
<212> PRT
<213> 智人
<220>
<221> 尚未归类的特征
<223> 氨基酸序列NK39_6
<400> 83
Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
1 5 10 15
His Ala Ala Arg Pro Leu Phe Asn Gln Glu Val Gln Ile Pro Leu Thr
20 25 30
Glu Ser Tyr Cys Gly Pro Cys Pro Lys Asn Trp Ile Cys Tyr Lys Asn
35 40 45
Asn Cys Tyr Gln Phe Phe Asp Glu Ser Lys Asn Trp Tyr Glu Ser Gln
50 55 60
Ala Ser Cys Met Ser Gln Asn Ala Ser Leu Leu Lys Val Tyr Ser Lys
65 70 75 80
Glu Asp Gln Asp Leu Leu Lys Leu Val Lys Ser Tyr His Trp Met Gly
85 90 95
Leu Val His Ile Pro Thr Asn Gly Ser Trp Gln Trp Glu Asp Gly Ser
100 105 110
Ile Leu Ser Pro Asn Leu Leu Thr Ile Ile Glu Met Gln Lys Gly Asp
115 120 125
Cys Ala Leu Tyr Ala Ser Ser Phe Lys Gly Tyr Ile Glu Asn Cys Ser
130 135 140
Thr Pro Asn Thr Tyr Ile Cys Met Gln Arg Thr Val Thr Thr Thr Pro
145 150 155 160
Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu
165 170 175
Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His
180 185 190
Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Pro Lys Leu Cys Tyr Leu Leu
195 200 205
Asp Gly Ile Leu Phe Ile Tyr Gly Val Ile Leu Thr Ala Leu Phe Leu
210 215 220
Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln

225	230	235	240
Pro Phe Met Arg	Pro Val Gln Thr Thr	Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser	
	245	250	255
Cys Arg Phe Pro	Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys	Glu Leu Gly Gly Gly	
	260	265	270
Gly Ser Gly Gly	Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly	Ser Met Gln Asp Glu	
	275	280	285
Asp Gly Tyr Met	Thr Leu Asn Val Gln Ser Lys	Lys Arg Ser Ser Ala	
	290	295	300
Gln Thr Ser Gln	Leu Thr Phe Lys Asp Tyr Ser	Val Thr Leu His Trp	
305	310	315	320

Tyr Lys

<210> 84

<211> 927

<212> DNA

<213> 智人

<220>

<221> 尚未归类的特征

<223> DNA序列 NK39_7

<400> 84

```

atggctctgc ccgtcaccgc actgctgctg cctctggctc tgctgctgca cgccgcacga      60
ccactgttca atcaggaagt ccagatcccc ctgacagagt cttactgcgg cccatgtccc      120
aagaactgga tctgctacaa gaacaattgt tatcagttct ttgacgagag caagaactgg      180
tatgagtccc aggcctcttg catgagccag aatgcctctc tgctgaaggt gtacagcaag      240
gaggaccagg atctgctgaa gctggtgaa tcctatcact ggatgggcct ggtgcacatc      300
cctacaaacg gctcttggca gtgggaggac ggctccatcc tgtctccaaa tctgctgacc      360
atcatcgaga tgcagaaggg cgattgcgcc ctgtacgcca gctccttcaa gggctatata      420
gagaactgct ccacacccaa tacctacatc tgtatgcaga ggaccgtgac cacaaccctt      480
gcaccacgcc cccctacacc agcacctacc atcgcaagcc agcctctgtc cctgcggccca      540
gaggcatgta gaccagcagc aggaggagca gtgcacacaa gaggcctgga cttcgctctg      600
gatcccaaac tctgctacct gctggatgga atcctcttca tctatggtgt cattctcact      660
gccttgttcc tgctttactg caagcggggc agaaagaagc tgctgtatat cttcaagcag      720
cccttcatgc ggccccgtgca gacaaccag gaggaagacg gctgctcatg tagatttctt      780
gaagaagaag aagggggctg tgaactgggc ggaggaggca gcggcgggcg cggcagcggc      840
ggcggcggca gcaagacaaa tatcaggtct agcaccgcgc actggaagga tcacaagttt      900
aagtggcgga aggaccctca ggataag

```

<210> 85

<211> 309

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> 尚未归类的特征

<223> 氨基酸序列NK39_7

<400> 85

```

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
1           5           10           15
His Ala Ala Arg Pro Leu Phe Asn Gln Glu Val Gln Ile Pro Leu Thr
           20           25           30
Glu Ser Tyr Cys Gly Pro Cys Pro Lys Asn Trp Ile Cys Tyr Lys Asn
           35           40           45
Asn Cys Tyr Gln Phe Phe Asp Glu Ser Lys Asn Trp Tyr Glu Ser Gln
           50           55           60
Ala Ser Cys Met Ser Gln Asn Ala Ser Leu Leu Lys Val Tyr Ser Lys
65           70           75           80
Glu Asp Gln Asp Leu Leu Lys Leu Val Lys Ser Tyr His Trp Met Gly
           85           90           95
Leu Val His Ile Pro Thr Asn Gly Ser Trp Gln Trp Glu Asp Gly Ser
           100          105          110
Ile Leu Ser Pro Asn Leu Leu Thr Ile Ile Glu Met Gln Lys Gly Asp
           115          120          125
Cys Ala Leu Tyr Ala Ser Ser Phe Lys Gly Tyr Ile Glu Asn Cys Ser
           130          135          140
Thr Pro Asn Thr Tyr Ile Cys Met Gln Arg Thr Val Thr Thr Thr Pro
145          150          155          160
Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu
           165          170          175
Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His
           180          185          190
Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Pro Lys Leu Cys Tyr Leu Leu
           195          200          205
Asp Gly Ile Leu Phe Ile Tyr Gly Val Ile Leu Thr Ala Leu Phe Leu
           210          215          220
Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln
225          230          235          240
Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser
           245          250          255
Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Gly Gly Gly
           260          265          270

```

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Lys Thr Asn Ile
 275 280 285

Arg Ser Ser Thr Arg Asp Trp Lys Asp His Lys Phe Lys Trp Arg Lys
 290 295 300

Asp Pro Gln Asp Lys
 305

<210> 86

<211> 933

<212> DNA

<213> 智人

<220>

<221> 尚未归类的特征

<223> DNA序列 NK39_8

<400> 86

```

atggccctgc ccgtgacagc tctgctgctg cctctggccc tgctgctgca tgccgctaga      60
cccttattca accaagaagt tcaaattccc ttgaccgaaa gttactgtgg cccatgtcct      120
aaaaactgga tatgttacia aaataactgc taccaatttt ttgatgagag taaaaactgg      180
tatgagagcc aggcttcttg tatgtctcaa aatgccagcc ttctgaaagt atacagcaaa      240
gaggaccagg atttacttaa actggtgaag tcatatcatt ggatgggact agtacacatt      300
ccaacaaatg gatcttggca gtgggaagat ggctccattc tctacccaa cctactaaca      360
ataattgaaa tgcagaaggg agactgtgca ctctatgctt cgagctttaa aggctatata      420
gaaaactggt caactccaaa tacgtacatc tgcatgcaaa ggactgtgac caccaccct      480
gctcccagac cccctacacc tgcccctaca atcgccagcc agcccctgag cctgagacct      540
gaggcctgca gacctgctgc tggaggcgct gtgcacacia ggggcctcga cttegcctgc      600
gaccccaaac tctgctacct gctggatgga atcctcttca tctatggtgt cattctcact      660
gccttgttcc tgctttactg caagcggggc agaaagaagc tgctgtatat cttcaagcag      720
cccttcatgc ggcccgtgca gacaaccag gaggaagacg gctgctcatg tagatttcct      780
gaagaagaag aagggggctg tgaactgca ctgaagatcc aagtgcgaaa ggcagctata      840
accagctatg agaaatcaga tgggtgttac acgggcctga gcaccaggaa ccaggagact      900
tacgagactc tgaagcatga gaaaccacca cag      933
    
```

<210> 87

<211> 311

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> 尚未归类的特征

<223> 氨基酸序列NK39_8

<400> 87

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu

1	5	10	15
His Ala Ala Arg Pro Leu Phe Asn Gln Glu Val Gln Ile Pro Leu Thr			
	20	25	30
Glu Ser Tyr Cys Gly Pro Cys Pro Lys Asn Trp Ile Cys Tyr Lys Asn			
	35	40	45
Asn Cys Tyr Gln Phe Phe Asp Glu Ser Lys Asn Trp Tyr Glu Ser Gln			
	50	55	60
Ala Ser Cys Met Ser Gln Asn Ala Ser Leu Leu Lys Val Tyr Ser Lys			
65	70	75	80
Glu Asp Gln Asp Leu Leu Lys Leu Val Lys Ser Tyr His Trp Met Gly			
	85	90	95
Leu Val His Ile Pro Thr Asn Gly Ser Trp Gln Trp Glu Asp Gly Ser			
	100	105	110
Ile Leu Ser Pro Asn Leu Leu Thr Ile Ile Glu Met Gln Lys Gly Asp			
	115	120	125
Cys Ala Leu Tyr Ala Ser Ser Phe Lys Gly Tyr Ile Glu Asn Cys Ser			
	130	135	140
Thr Pro Asn Thr Tyr Ile Cys Met Gln Arg Thr Val Thr Thr Thr Pro			
145	150	155	160
Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu			
	165	170	175
Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His			
	180	185	190
Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Pro Lys Leu Cys Tyr Leu Leu			
	195	200	205
Asp Gly Ile Leu Phe Ile Tyr Gly Val Ile Leu Thr Ala Leu Phe Leu			
	210	215	220
Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln			
225	230	235	240
Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser			
	245	250	255
Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Leu Lys			
	260	265	270
Ile Gln Val Arg Lys Ala Ala Ile Thr Ser Tyr Glu Lys Ser Asp Gly			
	275	280	285
Val Tyr Thr Gly Leu Ser Thr Arg Asn Gln Glu Thr Tyr Glu Thr Leu			
	290	295	300
Lys His Glu Lys Pro Pro Gln			
305	310		

<210>	88	
<211>	1605	
<212>	DNA	
<213>	智人	
<220>		
<221>	尚未归类的特征	
<223>	DNA序列 NK39_9	
<400>	88	
atgagaattt	cgaaacaca	ttgagaagt atttccatcc agtgctactt gtgtttactt 60
ctaaacagtc	atthttctaac	tgaagctggc attcatgtct tcattttggg ctgtttcagt 120
gcaggccttc	ctaaaacaga	agccaactgg gtcaacgtga ttagcgattt gaagaaaatc 180
gaggacctta	tacagtctat	gcatattgac gctacactgt atactgagag tgatgtacac 240
ccgtcctgta	aggtaacggc	catgaaatgc tttctctctgg agctccaggt catcagcttg 300
gagtctgggg	acgcaagcat	ccacgatacg gttgaaaacc tcatcatcct tgcgaacaac 360
tctctctcat	ctaatggaaa	cgttacagag agtgggtgta aggagtgcga agagttggaa 420
gaaaaaaaca	tcaaagaatt	tcttcaatcc ttcgttcaca tagtgcaaat gttcattaac 480
acgtccggcg	gaggaggcag	cggcggcggc ggcagcggcg gcggcggcag cttattcaac 540
caagaagttc	aaattccctt	gaccgaaagt tactgtggcc catgtcctaa aaactggata 600
tgttacaaaa	ataactgcta	ccaatthttt gatgagagta aaaactggta tgagagccag 660
gcttcttgta	tgtctcaaaa	tgccagcctt ctgaaagtat acagcaaaga ggaccaggat 720
ttacttaaac	tggtgaagtc	atatcattgg atgggactag tacacattcc aacaaatgga 780
tcttggcagt	gggaagatgg	ctccattctc tcaccaacc tactaacaat aattgaaatg 840
cagaagggag	actgtgact	ctatgcctcg agctthaaag gctatataga aaactgttca 900
actccaaata	cgtacatctg	catgcaaagg actgtgacca cgacgccagc gccgcgacca 960
ccaacaccgg	cgcccacat	cgcgctgcag cccctgtccc tgcgcccaga ggcgtgccgg 1020
ccagcggcgg	ggggcgcagt	gcacacgagg gggctggact tcgcctgtga tatctacatc 1080
tgggcgccct	tggccgggac	ttgtggggtc cttctctgt cactggttat caccctttac 1140
tgcaaacggg	gcagaaagaa	actcctgtat atattcaaac aaccatttat gagaccagta 1200
caaactactc	aagaggaaga	tggtgttagc tgccgatttc cagaagaaga agaaggagga 1260
tgtgaactga	gagtgaagtt	cagcaggagc gcagacgcc ccgctacca gcagggccag 1320
aaccagctct	ataacgagct	caatctagga cgaagagagg agtacgatgt tttggacaag 1380
agacgtggcc	gggacctga	gatgggggga aagccgagaa ggaagaacc tcaggaaggc 1440
ctgtacaatg	aactgcagaa	agataagatg gcggaggcct acagtgagat tgggatgaaa 1500
ggcagcgc	ggaggggcaa	ggggcacgat ggcttttacc aggttctcag tacagccacc 1560
aaggacacct	acgacgcct	tcacatgcag gccctgcccc ctcgc 1605
<210>	89	
<211>	535	
<212>	PRT	
<213>	智人	

<220>

<221> 尚未归类的特征

<223> 氨基酸序列NK39_9

<400> 89

Met	Arg	Ile	Ser	Lys	Pro	His	Leu	Arg	Ser	Ile	Ser	Ile	Gln	Cys	Tyr
1				5					10					15	
Leu	Cys	Leu	Leu	Leu	Asn	Ser	His	Phe	Leu	Thr	Glu	Ala	Gly	Ile	His
				20				25					30		
Val	Phe	Ile	Leu	Gly	Cys	Phe	Ser	Ala	Gly	Leu	Pro	Lys	Thr	Glu	Ala
				35				40					45		
Asn	Trp	Val	Asn	Val	Ile	Ser	Asp	Leu	Lys	Lys	Ile	Glu	Asp	Leu	Ile
								55				60			
Gln	Ser	Met	His	Ile	Asp	Ala	Thr	Leu	Tyr	Thr	Glu	Ser	Asp	Val	His
65					70						75				80
Pro	Ser	Cys	Lys	Val	Thr	Ala	Met	Lys	Cys	Phe	Leu	Leu	Glu	Leu	Gln
					85					90					95
Val	Ile	Ser	Leu	Glu	Ser	Gly	Asp	Ala	Ser	Ile	His	Asp	Thr	Val	Glu
								105							110
Asn	Leu	Ile	Ile	Leu	Ala	Asn	Asn	Ser	Leu	Ser	Ser	Asn	Gly	Asn	Val
								120							125
Thr	Glu	Ser	Gly	Cys	Lys	Glu	Cys	Glu	Glu	Leu	Glu	Glu	Lys	Asn	Ile
								135							140
Lys	Glu	Phe	Leu	Gln	Ser	Phe	Val	His	Ile	Val	Gln	Met	Phe	Ile	Asn
145								150							160
Thr	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly
															175
Ser	Leu	Phe	Asn	Gln	Glu	Val	Gln	Ile	Pro	Leu	Thr	Glu	Ser	Tyr	Cys
															190
Gly	Pro	Cys	Pro	Lys	Asn	Trp	Ile	Cys	Tyr	Lys	Asn	Asn	Cys	Tyr	Gln
															205
Phe	Phe	Asp	Glu	Ser	Lys	Asn	Trp	Tyr	Glu	Ser	Gln	Ala	Ser	Cys	Met
															220
Ser	Gln	Asn	Ala	Ser	Leu	Leu	Lys	Val	Tyr	Ser	Lys	Glu	Asp	Gln	Asp
225															240
Leu	Leu	Lys	Leu	Val	Lys	Ser	Tyr	His	Trp	Met	Gly	Leu	Val	His	Ile
															255
Pro	Thr	Asn	Gly	Ser	Trp	Gln	Trp	Glu	Asp	Gly	Ser	Ile	Leu	Ser	Pro
															270
Asn	Leu	Leu	Thr	Ile	Ile	Glu	Met	Gln	Lys	Gly	Asp	Cys	Ala	Leu	Tyr

275	280	285
Ala Ser Ser Phe Lys Gly Tyr Ile Glu Asn Cys Ser Thr Pro Asn Thr		
290	295	300
Tyr Ile Cys Met Gln Arg Thr Val Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro		
305	310	315
Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro		
325	330	335
Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu		
340	345	350
Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys		
355	360	365
Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly		
370	375	380
Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val		
385	390	395
Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu		
405	410	415
Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp		
420	425	430
Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn		
435	440	445
Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg		
450	455	460
Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly		
465	470	475
Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu		
485	490	495
Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu		
500	505	510
Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His		
515	520	525
Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg		
530	535	
<210>	90	
<211>	1122	
<212>	DNA	
<213>	智人	
<220>		
<221>	尚未归类的特征	

<223> DNA序列	NKG2D-Ox40-CD3ζ	
<400>	90	
atggccttac	cagtgaccgc	cttgctcctg
ccgttgctcca	cgccgccagg	60
ccgttattca	accaagaagt	tcaaattccc
ttgaccgaaa	gttactgtgg	cccatgtcct
120		
aaaaactgga	tatgttacia	aaataactgc
taccaatfff	ttgatgagag	taaaaactgg
180		
tatgagagcc	aggcttcttg	tatgtctcaa
aatgccagcc	ttctgaaagt	atacagcaaa
240		
gaggaccagg	atttacttaa	actggtgaag
tcataatcatt	ggatgggact	agtacacatt
300		
ccaacaaatg	gatcttggca	gtgggaagat
ggctccattc	tctcaccaa	cctactaaca
360		
ataattgaaa	tgcaagaagg	agactgtgca
ctctatgcct	cgagctttaa	aggctatata
420		
gaaaactggt	caactccaaa	tacgtacatc
tgcatgcaaa	ggactgtgac	cacgacgcca
480		
gcgccgcgac	caccaacacc	ggcgccccacc
atcgcgtegc	agccccgtgc	cctgcgcccc
540		
gaggcgtgcc	ggccagcggc	ggggggcgca
gtgcacacga	gggggctgga	cttcgcctgt
600		
gatatctaca	tctgggcgcc	cttggccggg
acttgtgggg	tccttctcct	gtcactggtt
660		
atcacccttt	actgccggag	ggaccagagg
ctgcccccg	atgccacaa	gccccctggg
720		
ggaggcagtt	tccggacccc	catccaagag
gagcaggccg	acgcccactc	caccctggcc
780		
aagatcagag	tgaagttag	caggagcgca
gacgccccg	cgtaccagca	gggccagaac
840		
cagctctata	acgagctcaa	tctaggacga
agagaggagt	acgatgtttt	ggacaagaga
900		
cgtggccggg	accctgagat	ggggggaaaag
ccgagaagga	agaaccctca	ggaaggcctg
960		
tacaatgaac	tgcaaaaaga	taagatggcg
gaggcctaca	gtgagattgg	gatgaaaggc
1020		
gagcgccgga	ggggcaaggg	gcacgatggc
ctttaccagg	gtctcagtac	agccaccaag
1080		
gacacctacg	acgcccttca	catgcaggcc
ctgccccctc	gc	1122
<210>	91	
<211>	341	
<212>	PRT	
<213>	智人	
<220>		
<221>	尚未归类的特征	
<223>	氨基酸序列NKG2D-Ox40-CD3ζ	
<400>	91	
Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu		
1	5	10
15		
His Ala Ala Arg Pro Leu Phe Asn Gln Glu Val Gln Ile Pro Leu Thr		
20	25	30
Glu Ser Tyr Cys Gly Pro Cys Pro Lys Asn Trp Ile Cys Tyr Lys Asn		
35	40	45
Asn Cys Tyr Gln Phe Phe Asp Glu Ser Lys Asn Trp Tyr Glu Ser Gln		
50	55	60
Ala Ser Cys Met Ser Gln Asn Ala Ser Leu Leu Lys Val Tyr Ser Lys		
65	70	75
80		

<221> 尚未归类的特征

<223> DNA序列 NKG2D-CD28 - CD3ζ

<400> 92

```

atggccttac cagtgaccgc cttgctcctg ccgctggcct tgctgctcca cgccgccagg      60
ccgttattca accaagaagt tcaaattccc ttgaccgaaa gttactgtgg cccatgtcct      120
aaaaactgga tatgttacia aaataactgc taccaatttt ttgatgagag taaaaactgg      180
tatgagagcc aggccttctg tatgtctcaa aatgccagcc ttctgaaagt atacagcaaa      240
gaggaccagg atttacttaa actggtgaag tcatatcatt ggatgggact agtacacatt      300
ccaacaaatg gatccttgca gtgggaagat ggctccattc tctacccaa cctactaaca      360
ataattgaaa tgcagaaggg agactgtgca ctctatgect cgagctttaa aggctatata      420
gaaaactgtt caactccaaa tacgtacatc tgcatgcaaa ggactgtgac cacgacgcca      480
gcgccgcgac caccaacacc ggcgcccacc atcgcgtegc agcccctgtc cctgcgcccc      540
gaggcgtgcc ggccagcggc ggggggcgca gtgcacacga gggggctgga cttegcctgt      600
gatttttggg tgctggtggt ggttggtgga gtcttgctt gctatagctt gctagtaaca      660
gtggccttta ttattttctg ggtgaggagt aagaggagca ggctcctgca cagtgactac      720
atgaacatga ctccccgccg ccccgggccc acccgcaagc attaccagcc ctatgcccc      780
ccacgcgact tcgcagccta tcgctccaga gtgaagtcca gcaggagcgc agacgcccc      840
gcgtaccagc agggccagaa ccagctctat aacgagctca atctaggacg aagagaggag      900
tacgatgttt tggacaagag acgtggccgg gaccctgaga tggggggaaa gccgagaagg      960
aagaaccctc aggaaggcct gtacaatgaa ctgcagaaag ataagatggc ggaggcctac     1020
agtgagattg ggatgaaagg cgagcgcggc aggggcaagg ggcacgatgg cttttaccag     1080
ggtctcagta cagccaccaa ggacacctac gacgccttc acatgcaggc cctgccccct     1140
cgc                                                                                   1143

```

<210> 93

<211> 381

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> 尚未归类的特征

<223> 氨基酸序列NKG2D-CD28 - CD3ζ

<400> 93

```

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
1           5           10           15
His Ala Ala Arg Pro Leu Phe Asn Gln Glu Val Gln Ile Pro Leu Thr
           20           25           30
Glu Ser Tyr Cys Gly Pro Cys Pro Lys Asn Trp Ile Cys Tyr Lys Asn
           35           40           45
Asn Cys Tyr Gln Phe Phe Asp Glu Ser Lys Asn Trp Tyr Glu Ser Gln
           50           55           60

```


370	375	380				
<210>	94					
<211>	1269					
<212>	DNA					
<213>	智人					
<220>						
<221>	尚未归类的特征					
<223>	DNA序列 NKG2D - CD28 - 41BB - CD3ζ					
<400>	94					
atggccttac	cagtgaccgc	cttgctcctg	ccgctggcct	tgctgctcca	cgccgccagg	60
ccgttattca	accaagaagt	tcaaattccc	ttgaccgaaa	gttactgtgg	cccatgtcct	120
aaaaactgga	tatgttacaa	aaataactgc	taccaatfff	ttgatgagag	taaaaactgg	180
tatgagagcc	aggttcttg	tatgtctcaa	aatgccagcc	ttctgaaagt	atacagcaaa	240
gaggaccagg	atttacttaa	actggtgaag	tcatatcatt	ggatgggact	agtacacatt	300
ccaacaaatg	gatcttggca	gtgggaagat	ggctccattc	tctcaccaa	cctactaaca	360
ataattgaaa	tgcagaaggg	agactgtgca	ctctatgcct	cgagctttaa	aggctatata	420
gaaaactggt	caactccaaa	tacgtacatc	tgcatgcaaa	ggactgtgac	cacgacgcca	480
gcgccgcgac	caccaacacc	ggcgcccacc	atcgcgtcgc	agcccctgtc	cctgcgcccc	540
gaggcgtgcc	ggccagcggc	ggggggcgca	gtgcacacga	gggggctgga	cttcgcctgt	600
gatttttggg	tgctggtggt	ggttggtgga	gtcctggctt	gctatagctt	gctagtaaca	660
gtggccttta	ttatfctctg	ggtgaggagt	aagaggagca	ggctcctgca	cagtgactac	720
atgaacatga	ctccccgccg	ccccgggccc	accgcgaagc	attaccagcc	ctatgcccc	780
ccacgcgact	tcgcagccta	tcgctccaaa	cggggcagaa	agaaactcct	gtatatattc	840
aaacaacat	ttatgagacc	agtacaaact	actcaagagg	aagatggctg	tagctgccga	900
tttccagaag	aagaagaagg	aggatgtgaa	ctgagagtga	agttcagcag	gagcgcagac	960
gccccgcgt	accagcaggg	ccagaaccag	ctctataacg	agctcaatct	aggacgaaga	1020
gaggagtacg	atgttttgg	caagagacgt	ggccgggacc	ctgagatggg	gggaaagccg	1080
agaaggaaga	accctcagga	aggcctgtac	aatgaactgc	agaaagataa	gatggcggag	1140
gcctacagtg	agattgggat	gaaaggcgag	cgccggaggg	gcaaggggca	cgatggcctt	1200
taccagggtc	tcagtacagc	caccaaggac	acctacgacg	cccttcacat	gcaggccctg	1260
ccccctcgc						1269
<210>	95					
<211>	423					
<212>	PRT					
<213>	智人					
<220>						
<221>	尚未归类的特征					
<223>	氨基酸序列NKG2D - CD28 - 41BB - CD3ζ					
<400>	95					

305	310	315	320
Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn			
	325	330	335
Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg			
	340	345	350
Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly			
	355	360	365
Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu			
	370	375	380
Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu			
385	390	395	400
Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His			
	405	410	415
Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg			
	420		

- <210> 96
- <211> 1038
- <212> DNA
- <213> 智人
- <220>
- <221> 尚未归类的特征
- <223> DNA序列 NKG2D(短铰链) - 41BB - CD3ζ
- <400> 96

atggccttac cagtgaccgc cttgctcctg ccgctggcct tgctgctcca cgccgccagg	60
ccgttattca accaagaagt tcaaattccc ttgaccgaaa gttactgtgg cccatgtcct	120
aaaaactgga tatgttacia aaataactgc taccaatttt ttgatgagag taaaaactgg	180
tatgagagcc aggcttcttg tatgtctcaa aatgccagcc ttctgaaagt atacagcaaa	240
gaggaccagg atttacttaa actgggtgaag tcatatcatt ggatgggact agtacacatt	300
ccaacaaatg gatcttggca gtgggaagat ggetccattc tctcaccaa cctactaaca	360
ataattgaaa tgcagaaggg agactgtgca ctctatgctt cgagctttaa aggctatata	420
gaaaactgtt caactccaaa tacgtacatc tgcattgcaa ggactgtgga gtccaaatat	480
ggcccccat gcccattcat cccaatttac atctgggcgc ccttggccgg gacttgtggg	540
gtccttctcc tgtcaactgt taccacctt tactgcaaac ggggcagaaa gaaactcctg	600
tatatattca aacaaccatt tatgagacca gtacaaacta ctcaagagga agatggctgt	660
agctgccgat ttccagaaga agaagaagga ggatgtgaac tgagagtga gttcagcagg	720
agcgcagacg cccccgcgta ccagcagggc cagaaccagc tctataacga gctcaatcta	780
ggacgaagag aggagtacga tgttttggac aagagacgtg gccgggacc tgagatgggg	840
ggaaagccga gaaggaagaa ccctcaggaa ggctgtaca atgaactgca gaaagataag	900
atggcggagg cctacagtga gattgggatg aaaggcagc gccggagggg caaggggcac	960

gatggccttt accaggtct cagtacagcc accaaggaca cctacgacgc cttcacatg 1020
caggccctgc cccctcgc 1038
<210> 97
<211> 346
<212> PRT
<213> 智人
<220>
<221> 尚未归类的特征
<223> 氨基酸序列NKG2D(短铰链) - 41BB - CD3ζ
<400> 97
Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
1 5 10 15
His Ala Ala Arg Pro Leu Phe Asn Gln Glu Val Gln Ile Pro Leu Thr
20 25 30
Glu Ser Tyr Cys Gly Pro Cys Pro Lys Asn Trp Ile Cys Tyr Lys Asn
35 40 45
Asn Cys Tyr Gln Phe Phe Asp Glu Ser Lys Asn Trp Tyr Glu Ser Gln
50 55 60
Ala Ser Cys Met Ser Gln Asn Ala Ser Leu Leu Lys Val Tyr Ser Lys
65 70 75 80
Glu Asp Gln Asp Leu Leu Lys Leu Val Lys Ser Tyr His Trp Met Gly
85 90 95
Leu Val His Ile Pro Thr Asn Gly Ser Trp Gln Trp Glu Asp Gly Ser
100 105 110
Ile Leu Ser Pro Asn Leu Leu Thr Ile Ile Glu Met Gln Lys Gly Asp
115 120 125
Cys Ala Leu Tyr Ala Ser Ser Phe Lys Gly Tyr Ile Glu Asn Cys Ser
130 135 140
Thr Pro Asn Thr Tyr Ile Cys Met Gln Arg Thr Val Glu Ser Lys Tyr
145 150 155 160
Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala
165 170 175
Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys
180 185 190
Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met
195 200 205
Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe
210 215 220
Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg

225	230	235	240
Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn			
	245	250	255
Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg			
	260	265	270
Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro			
	275	280	285
Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala			
	290	295	300
Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His			
305	310	315	320
Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp			
	325	330	335
Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg			
	340	345	

<210> 98

<211> 1044

<212> DNA

<213> 智人

<220>

<221> 尚未归类的特征

<223> DNA序列 NKG2D (SH)-CD28 - CD3ζ

<400> 98

atggccttac cagtgaccgc cttgctcctg ccgctggcct tgctgctcca cgccgccagg	60
ccgttattca accaagaagt tcaaattccc ttgaccgaaa gttactgtgg cccatgtcct	120
aaaaactgga tatgttacia aaataactgc taccaatttt ttgatgagag taaaaactgg	180
tatgagagcc aggcttcttg tatgtctcaa aatgccagcc ttctgaaagt atacagcaaa	240
gaggaccagg atttacttaa actggtgaag tcatatcatt ggatgggact agtacacatt	300
ccaacaaatg gatccttgca gtgggaagat ggetccattc tctcaccaa cctactaaca	360
ataattgaaa tgcagaaggg agactgtgca ctctatgctt cgagctttaa aggctatata	420
gaaaactggt caactccaaa tacgtacatc tgcattgcaa ggactgtgga gtccaaatat	480
ggcccccat gcccattcat gccattttgg gtgctggtgg tggttggtgg agtctctggct	540
tgctatagct tgctagtaac agtggccttt attattttct gggtgaggag taagaggagc	600
aggctcctgc acagtgaact catgaacatg actccccgcc gccccgggcc caccgcgaag	660
cattaccagc cctatgcccc accacgcgac ttgcagcct atcgctccag agtgaagttc	720
agcaggagcg cagacgcccc cgcgtaccag cagggccaga accagctcta taacgagctc	780
aatctaggac gaagagagga gtacgatggt ttggacaaga gacgtggccg ggaccctgag	840
atgggggggaa agccgagaag gaagaaccct caggaaggcc tgtacaatga actgcagaaa	900
gataagatgg cggaggccta cagtgagatt gggatgaaag gcgagcgcgg gaggggcaag	960

```

gggcacgatg gcctttacca gggctctcagt acagccacca aggacaccta cgacgccctt      1020
cacatgcagg ccctgcccc tcgc                                             1044
<210> 99
<211> 348
<212> PRT
<213> 智人
<220>
<221> 尚未归类的特征
<223> 氨基酸序列NKG2D (SH)-CD28 - CD3ζ
<400> 99
Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
1           5           10           15
His Ala Ala Arg Pro Leu Phe Asn Gln Glu Val Gln Ile Pro Leu Thr
           20           25           30
Glu Ser Tyr Cys Gly Pro Cys Pro Lys Asn Trp Ile Cys Tyr Lys Asn
           35           40           45
Asn Cys Tyr Gln Phe Phe Asp Glu Ser Lys Asn Trp Tyr Glu Ser Gln
           50           55           60
Ala Ser Cys Met Ser Gln Asn Ala Ser Leu Leu Lys Val Tyr Ser Lys
65           70           75           80
Glu Asp Gln Asp Leu Leu Lys Leu Val Lys Ser Tyr His Trp Met Gly
           85           90           95
Leu Val His Ile Pro Thr Asn Gly Ser Trp Gln Trp Glu Asp Gly Ser
           100          105          110
Ile Leu Ser Pro Asn Leu Leu Thr Ile Ile Glu Met Gln Lys Gly Asp
           115          120          125
Cys Ala Leu Tyr Ala Ser Ser Phe Lys Gly Tyr Ile Glu Asn Cys Ser
           130          135          140
Thr Pro Asn Thr Tyr Ile Cys Met Gln Arg Thr Val Glu Ser Lys Tyr
145          150          155          160
Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly
           165          170          175
Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile
           180          185          190
Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met
           195          200          205
Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro
           210          215          220
Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Val Lys Phe

```

225	230	235	240
Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu			
	245	250	255
Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp			
	260	265	270
Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys			
	275	280	285
Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala			
	290	295	300
Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys			
305	310	315	320
Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr			
	325	330	335
Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg			
	340	345	

<210> 100

<211> 1023

<212> DNA

<213> 智人

<220>

<221> 尚未归类的特征

<223> DNA序列 NKG2D (SH) - 0X40 - CD3ζ

<400> 100

atggccttac cagtgaccgc cttgctcctg ccgctggcct tgctgctcca cgccgccagg	60
ccgttattca accaagaagt tcaaattccc ttgaccgaaa gttactgtgg cccatgtcct	120
aaaaactgga tatgttacia aaataactgc taccaatttt ttgatgagag taaaaactgg	180
tatgagagcc aggcttcttg tatgtctcaa aatgccagcc ttctgaaagt atacagcaaa	240
gaggaccagg atttacttaa actggtgaag tcatatcatt ggatgggact agtacacatt	300
ccaacaaatg gatcttggca gtgggaagat ggetccattc tctcaccaa cctactaaca	360
ataattgaaa tgcagaaggg agactgtgca ctctatgctt cgagctttaa aggctatata	420
gaaaactggt caactccaaa tacgtacatc tgcatgcaaa ggactgtgga gtccaaatat	480
ggtcccccat gcccacatg cccaatctac atctgggccc ccttggccgg gacttgtggg	540
gtccttctcc tgtcactggt taccaccett tactgcccga gggaccagag gctgcccccc	600
gatgcccaca agccccctgg gggaggcagt ttccggacc ccatccaaga ggagcaggcc	660
gacgcccact ccaccctggc caagatcaga gtgaagtcca gcaggagcgc agacgcccc	720
gcgtaccagc agggccagaa ccagctctat aacgagctca atctaggacg aagagaggag	780
tacgatgttt tggacaagag acgtggcccg gaccctgaga tggggggaaa gccgagaagg	840
aagaaccctc aggaaggcct gtacaatgaa ctgcagaaag ataagatggc ggaggcctac	900
agtgagattg ggatgaaagg cgagcggccc aggggcaagg ggcacgatgg cctttaccag	960

```

gggtctcagta cagccaccaa ggacacctac gacgccttc acatgcaggc cctgccccct 1020
cgc 1023
<210> 101
<211> 346
<212> PRT
<213> 智人
<220>
<221> 尚未归类的特征
<223> 氨基酸序列NKG2D (SH) - OX40 - CD3ζ
<400> 101
Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
1          5          10          15
His Ala Ala Arg Pro Leu Phe Asn Gln Glu Val Gln Ile Pro Leu Thr
          20          25          30
Glu Ser Tyr Cys Gly Pro Cys Pro Lys Asn Trp Ile Cys Tyr Lys Asn
          35          40          45
Asn Cys Tyr Gln Phe Phe Asp Glu Ser Lys Asn Trp Tyr Glu Ser Gln
          50          55          60
Ala Ser Cys Met Ser Gln Asn Ala Ser Leu Leu Lys Val Tyr Ser Lys
65          70          75          80
Glu Asp Gln Asp Leu Leu Lys Leu Val Lys Ser Tyr His Trp Met Gly
          85          90          95
Leu Val His Ile Pro Thr Asn Gly Ser Trp Gln Trp Glu Asp Gly Ser
          100         105         110
Ile Leu Ser Pro Asn Leu Leu Thr Ile Ile Glu Met Gln Lys Gly Asp
          115         120         125
Cys Ala Leu Tyr Ala Ser Ser Phe Lys Gly Tyr Ile Glu Asn Cys Ser
          130         135         140
Thr Pro Asn Thr Tyr Ile Cys Met Gln Arg Thr Val Glu Ser Lys Tyr
145         150         155         160
Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly
          165         170         175
Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile
          180         185         190
Phe Trp Val Arg Ser Arg Arg Asp Gln Arg Leu Pro Pro Asp Ala His
          195         200         205
Lys Pro Pro Gly Gly Gly Ser Phe Arg Thr Pro Ile Gln Glu Glu Gln
          210         215         220
Ala Asp Ala His Ser Thr Leu Ala Lys Ile Arg Val Lys Phe Ser Arg

```

225	230	235	240
Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn			
	245	250	255
Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg			
	260	265	270
Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro			
	275	280	285
Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala			
	290	295	300
Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His			
305	310	315	320
Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp			
	325	330	335
Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg			
	340	345	

- <210> 102
- <211> 1125
- <212> DNA
- <213> 智人
- <220>
- <221> 尚未归类的特征
- <223> DNA序列 NKG2D-CD3TM -CD28 - CD3ζ
- <400> 102

atggccttac cagtgaccgc cttgctcctg ccgctggcct tgctgctcca cgccgccagg	60
ccgttattca accaagaagt tcaaattccc ttgaccgaaa gttactgtgg cccatgtcct	120
aaaaactgga tatgttacia aaataactgc taccaatttt ttgatgagag taaaaactgg	180
tatgagagcc aggcttcttg tatgtctcaa aatgccagcc ttctgaaagt atacagcaaa	240
gaggaccagg atttacttaa actggtgaag tcatatcatt ggatgggact agtacacatt	300
ccaacaaatg gatcttggca gtgggaagat ggetccattc tctcaccaa cctactaaca	360
ataattgaaa tgcagaaggg agactgtgca ctctatgctt cgagctttaa aggctatata	420
gaaaactggt caactccaaa tacgtacatc tgcattgcaa ggactgtgac cacgacgcca	480
gcgccgcgac caccaacacc ggcgccccacc atcgcgtcgc agcccctgtc cctgcgcccc	540
gaggcgtgcc ggccagcggc ggggggcgca gtgcacacga gggggctgga cttegcctgt	600
gatcccaaac tctgctacct getggatgga atctcttcca tctatggtgt cattctcact	660
gccttgttcc tgaagaggag caggetcctg cacagtgact acatgaacat gactccccgc	720
cgccccgggc ccaccgcaa gcattaccag ccctatgccc caccacgca cttegcagcc	780
tatcgtcca gagtgaagtt cagcaggagc gcagacgccc ccgctacca gcagggccag	840
aaccagctct ataacgagct caatctagga cgaagagagg agtacgatgt tttggacaag	900
agacgtggcc gggaccctga gatgggggga aagccgagaa ggaagaacc tcaggaaggc	960

ctgtacaatg aactgcagaa agataagatg gcggaggcct acagtgagat tgggatgaaa 1020
 ggcgagcgcc ggaggggcaa ggggcacgat ggcctttacc aggggtctcag tacagccacc 1080
 aaggacacct acgacgccct tcacatgcag gccctgcccc ctcgc 1125
 <210> 103
 <211> 375
 <212> PRT
 <213> 智人
 <220>
 <221> 尚未归类的特征
 <223> 氨基酸序列NKG2D-CD3TM -CD28 - CD3ζ
 <400> 103
 Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15
 His Ala Ala Arg Pro Leu Phe Asn Gln Glu Val Gln Ile Pro Leu Thr
 20 25 30
 Glu Ser Tyr Cys Gly Pro Cys Pro Lys Asn Trp Ile Cys Tyr Lys Asn
 35 40 45
 Asn Cys Tyr Gln Phe Phe Asp Glu Ser Lys Asn Trp Tyr Glu Ser Gln
 50 55 60
 Ala Ser Cys Met Ser Gln Asn Ala Ser Leu Leu Lys Val Tyr Ser Lys
 65 70 75 80
 Glu Asp Gln Asp Leu Leu Lys Leu Val Lys Ser Tyr His Trp Met Gly
 85 90 95
 Leu Val His Ile Pro Thr Asn Gly Ser Trp Gln Trp Glu Asp Gly Ser
 100 105 110
 Ile Leu Ser Pro Asn Leu Leu Thr Ile Ile Glu Met Gln Lys Gly Asp
 115 120 125
 Cys Ala Leu Tyr Ala Ser Ser Phe Lys Gly Tyr Ile Glu Asn Cys Ser
 130 135 140
 Thr Pro Asn Thr Tyr Ile Cys Met Gln Arg Thr Val Thr Thr Thr Pro
 145 150 155 160
 Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu
 165 170 175
 Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His
 180 185 190
 Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Pro Lys Leu Cys Tyr Leu Leu
 195 200 205
 Asp Gly Ile Leu Phe Ile Tyr Gly Val Ile Leu Thr Ala Leu Phe Leu
 210 215 220

Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser
 20 25

<210> 106

<211> 39

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> 尚未归类的特征

<223> 氨基酸序列CD28 IC 结构域

<400> 106

Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg
 1 5 10 15
 Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg
 20 25 30

Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser
 35

<210> 107

<211> 37

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> 尚未归类的特征

<223> 氨基酸序列OX40 IC 结构域

<400> 107

Arg Arg Asp Gln Arg Leu Pro Pro Asp Ala His Lys Pro Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Gly Ser Phe Arg Thr Pro Ile Gln Glu Glu Gln Ala Asp Ala His Ser
 20 25 30

Thr Leu Ala Lys Ile
 35

<210> 108

<211> 1140

<212> DNA

<213> 智人

<220>

<221> 尚未归类的特征

<223> NKG2D-P-frag/CD8a/4-1BB/CD3ζ

<400> 108

atggccttac cagtgaccgc cttgctcctg ccgctggcct tgctgctcca cgccgccagg

60

ccgttattca accaagaagt tcaaattccc ttgaccgaaa gttactgtgg cccatgtcct 120
 aaaaactgga tatgttaciaa aaataactgc taccaatttt ttgatgagag taaaaactgg 180
 tatgagagcc aggcttcttg tatgtctcaa aatgccagcc ttctgaaagt atacagcaaa 240
 gaggaccagg atttacttaa actggtgaag tcatatcatt ggatgggact agtacacatt 300
 ccaacaaatg gatcttggca gtgggaagat ggctccattc tctcacccaa cctactaaca 360
 ataattgaaa tgcagaaggg agactgtgca ctctatgcct cgagctttaa aggctatata 420
 gaaaactggt caactccaaa tacgtacatc tgcattgcaa ggactgtgac cacgacgcca 480
 gcgcccgcgac caccaacacc ggcgcccacc atcgcgtcgc agcccctgtc cctgcgcccc 540
 gaggcgtgcc ggccagcggc ggggggcgca gtgcacacga gggggctgga cttgcctgt 600
 gatattctaca tctgggcgcc cttggccggg acttgtgggg tccttctcct gtcactggtt 660
 atcacccttt actgcaaacg gggcagaaag aaactcctgt atatattcaa acaaccattt 720
 atgagaccag taaaaactac tcaagaggaa gatggctgta gctgccgatt tccagaagaa 780
 gaagaaggag gatgtgaact gagagtgaag ttcagcagga gcgcagacgc cccgcgtac 840
 cagcagggcc agaaccagct ctataacgag ctcaatctag gacgaagaga ggagtacgat 900
 gttttggaca agagacgtgg ccgggaccct gagatggggg gaaagccgag aaggaagaac 960
 cctcaggaag gcctgtaciaa tgaactgcag aaagataaga tggcggaggc ctacagtgag 1020
 attgggatga aaggcgagcg ccggaggggc aaggggcacg atggccttta ccagggtctc 1080
 agtacagcca ccaaggacac ctacgacgcc cttccatgc aggcctgcc ccctcgctaa 1140

<210> 109

<211> 374

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> 尚未归类的特征

<223> NKG2D-V2-0X40-CD3ζ

<400> 109

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15
 His Ala Ala Arg Pro Leu Phe Asn Gln Glu Val Gln Ile Pro Leu Thr
 20 25 30
 Glu Ser Tyr Cys Gly Pro Cys Pro Lys Asn Trp Ile Cys Tyr Lys Asn
 35 40 45
 Asn Cys Tyr Gln Phe Phe Asp Glu Ser Lys Asn Trp Tyr Glu Ser Gln
 50 55 60
 Ala Ser Cys Met Ser Gln Asn Ala Ser Leu Leu Lys Val Tyr Ser Lys
 65 70 75 80
 Glu Asp Gln Asp Leu Leu Lys Leu Val Lys Ser Tyr His Trp Met Gly
 85 90 95
 Leu Val His Ile Pro Thr Asn Gly Ser Trp Gln Trp Glu Asp Gly Ser

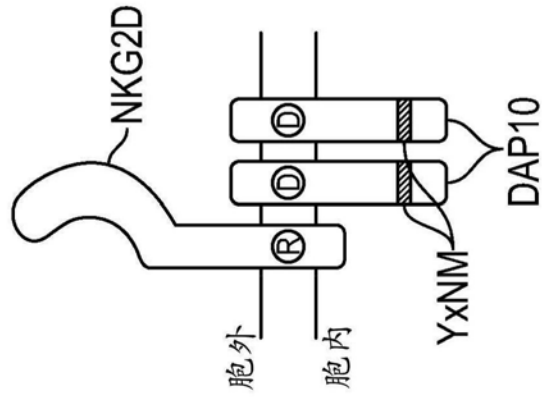


图1A

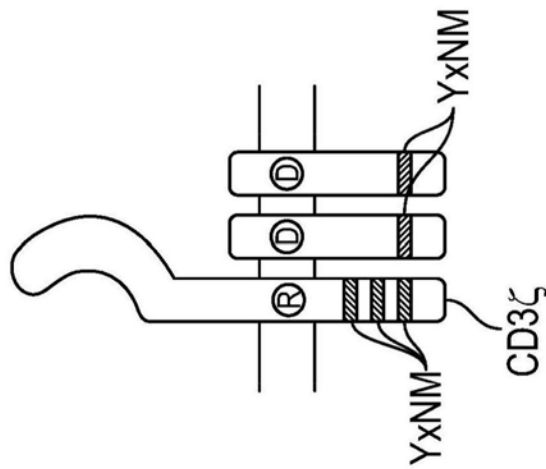


图1B

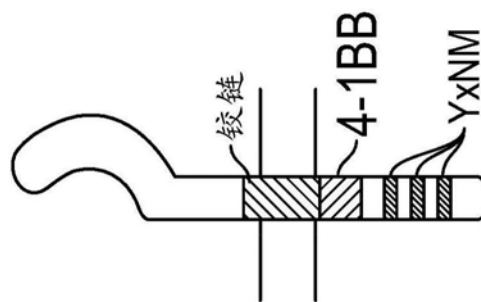


图1C

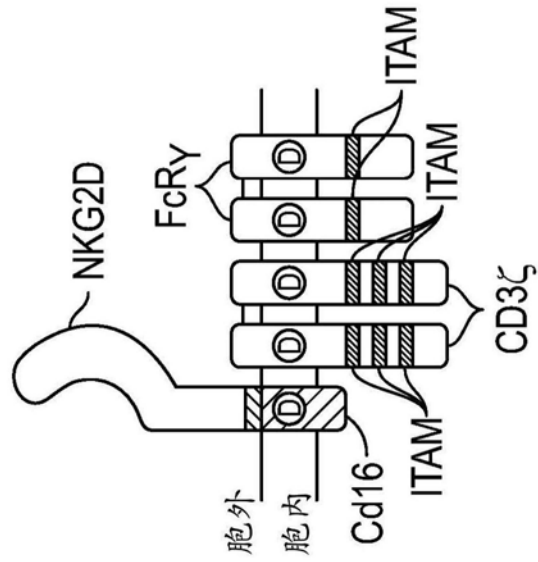


图2A

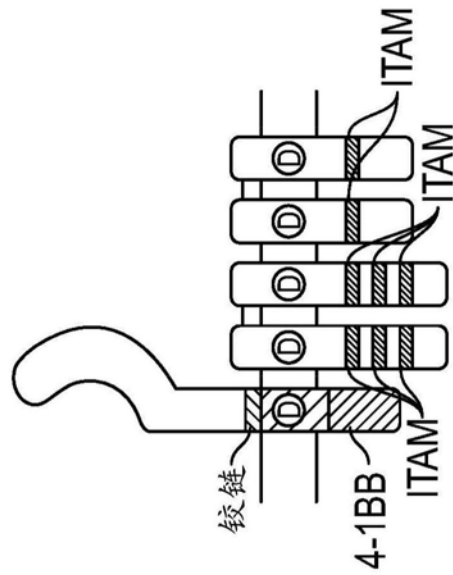


图2B

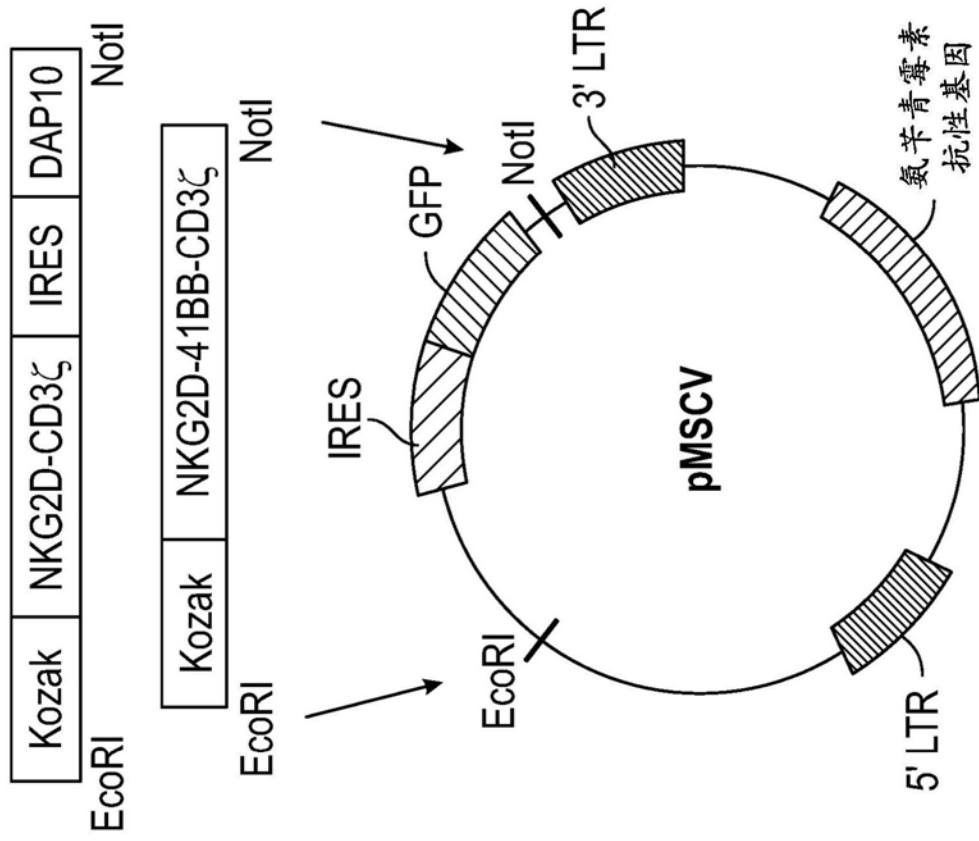


图3A

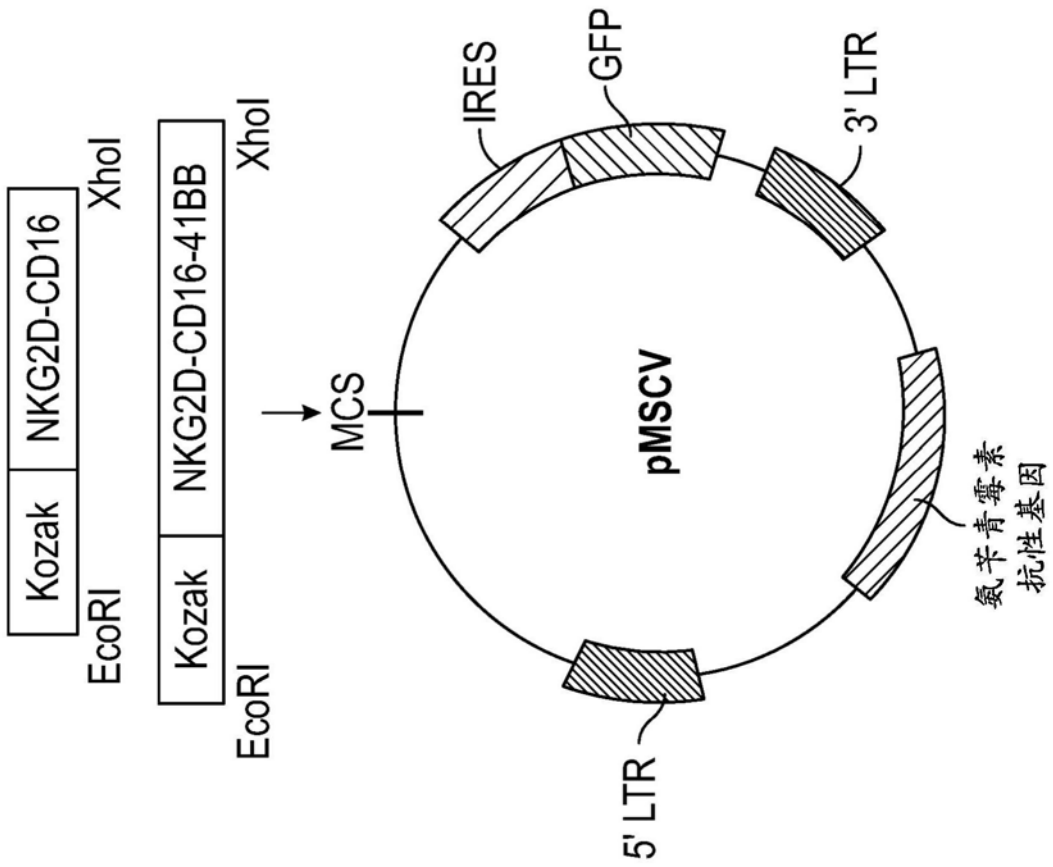


图3B

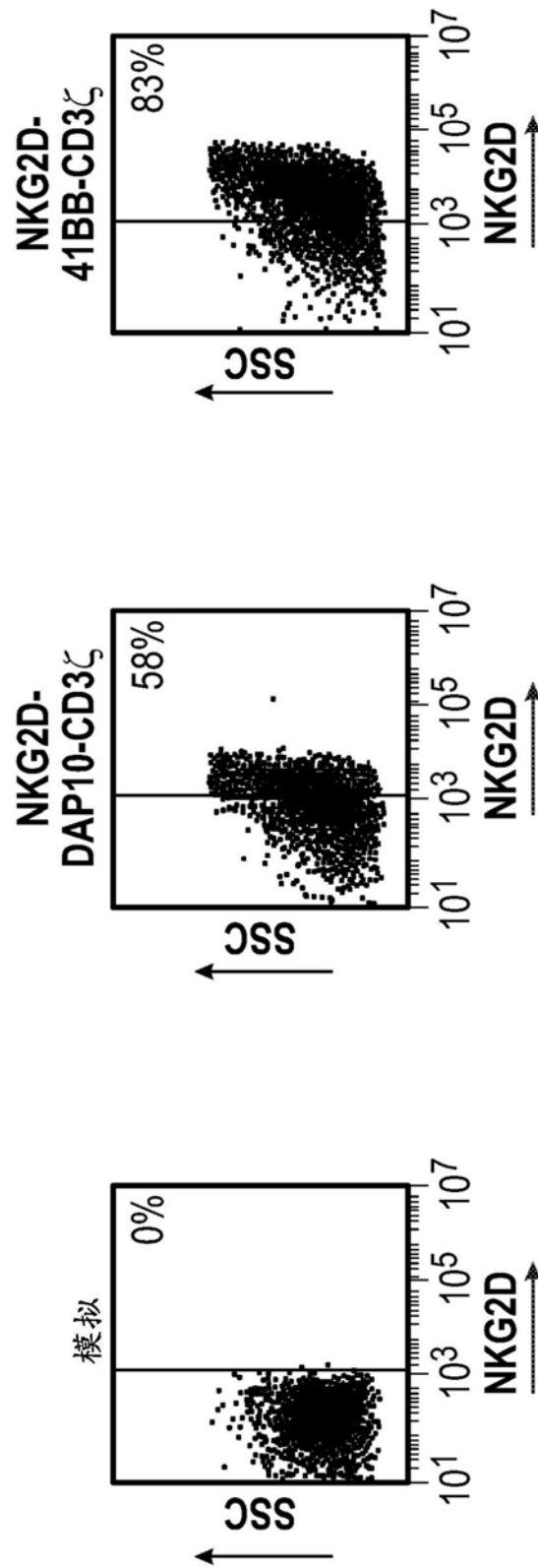


图4A

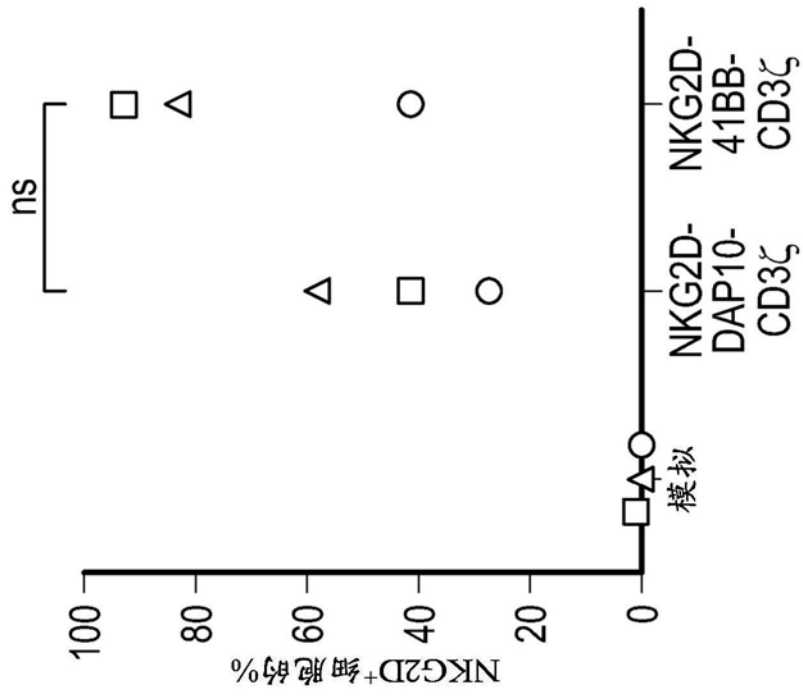


图4B

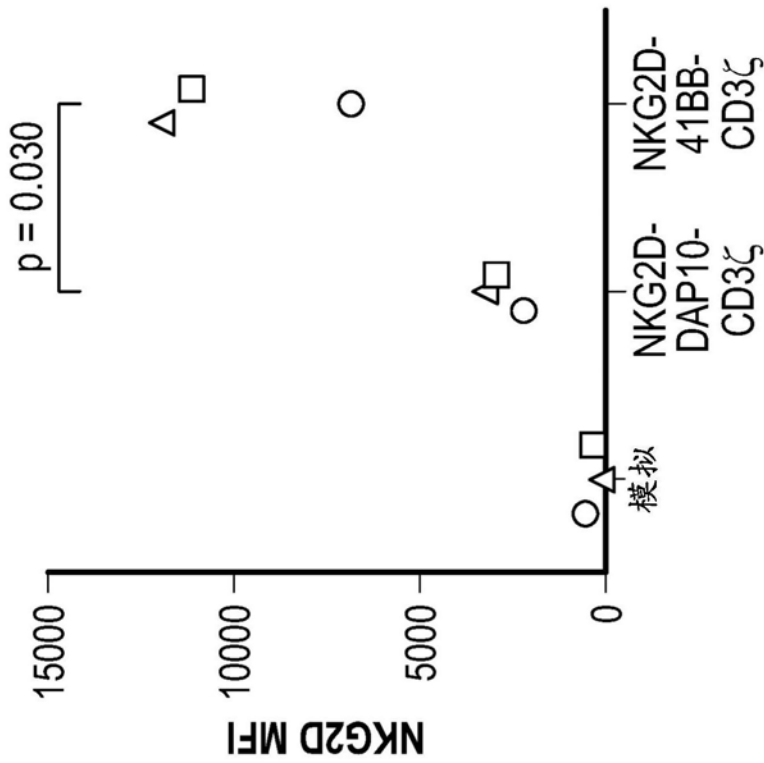


图4C

-□- NKG2D-DAP10-CD3ζ
-Δ- NKG2D-41BB-CD3ζ
-○- 模拟

供体3

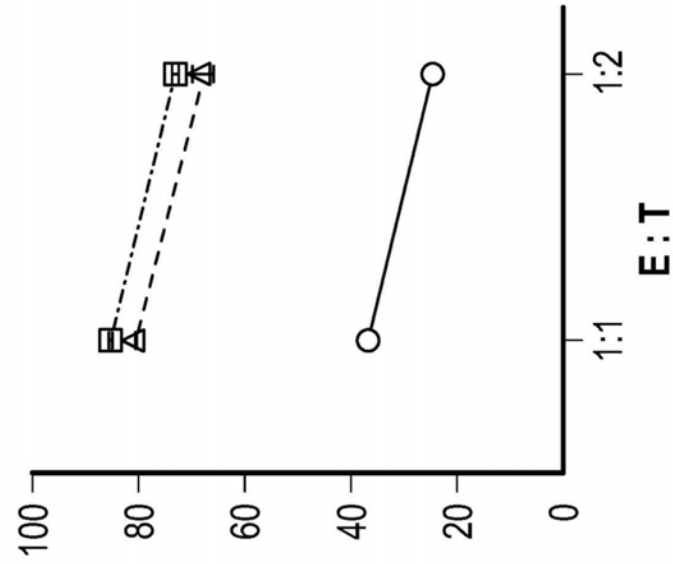


图 5C

供体2

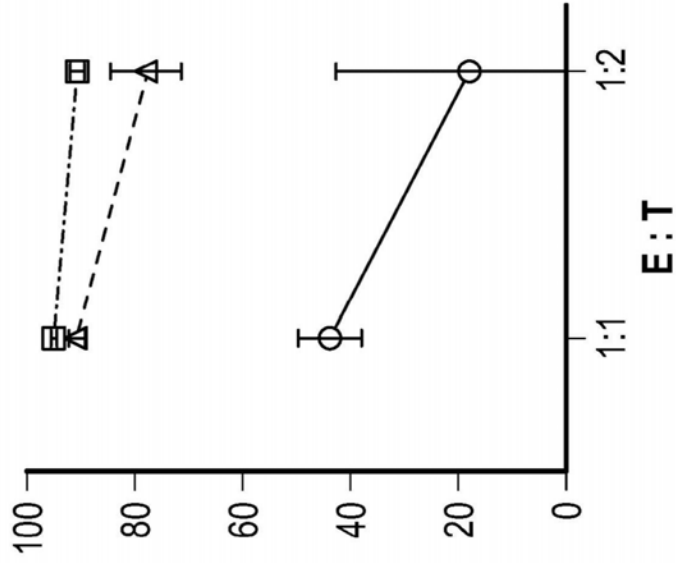


图 5B

供体1

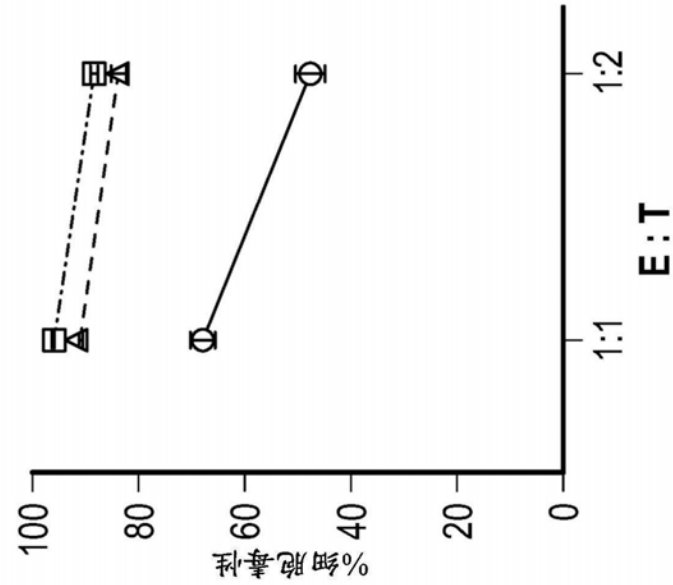


图 5A

-□- NKG2D-DAP10-CD3ζ
-△- NKG2D-41BB-CD3ζ
-○- 模拟

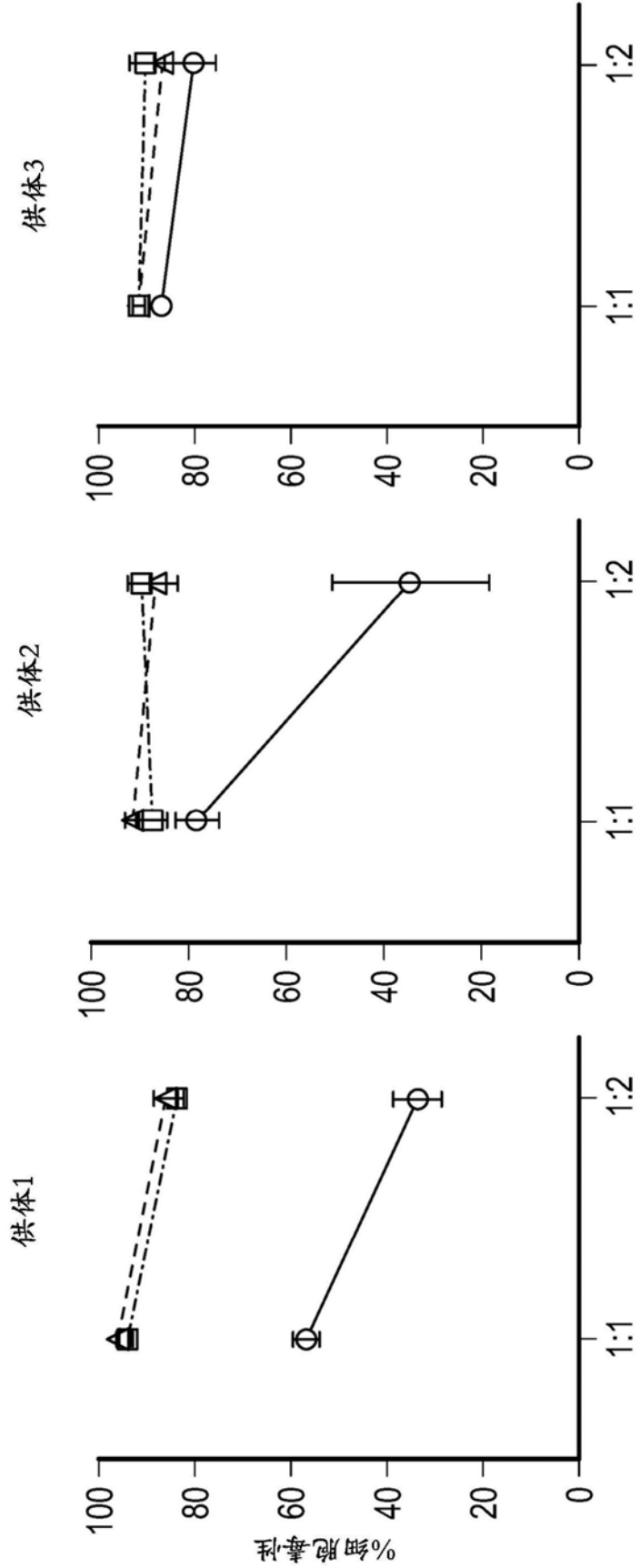


图 6A

图 6B

图 6C

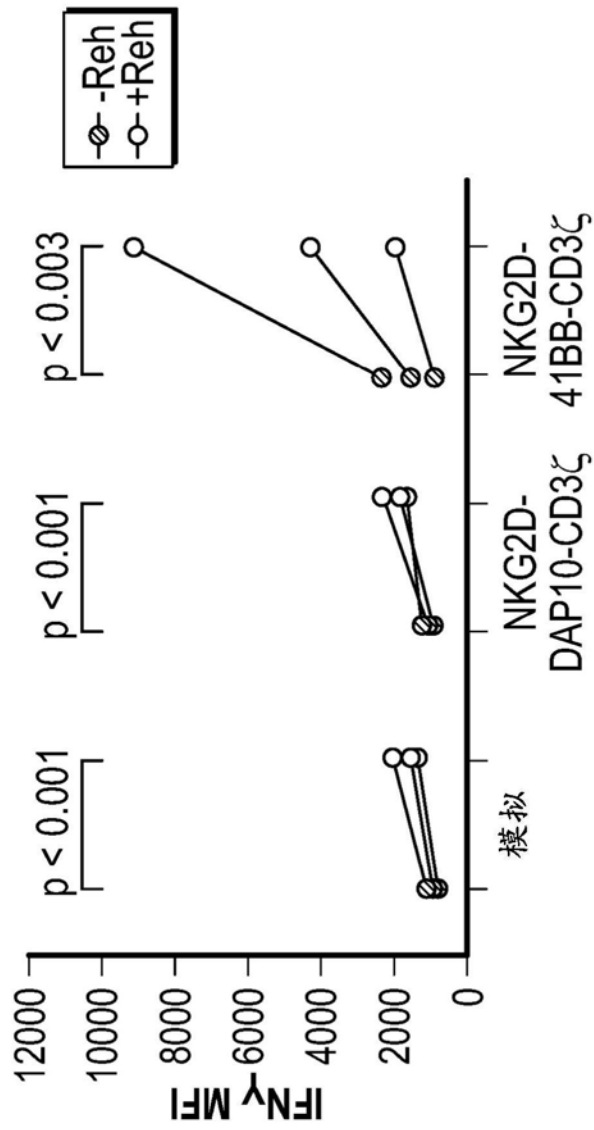


图7A

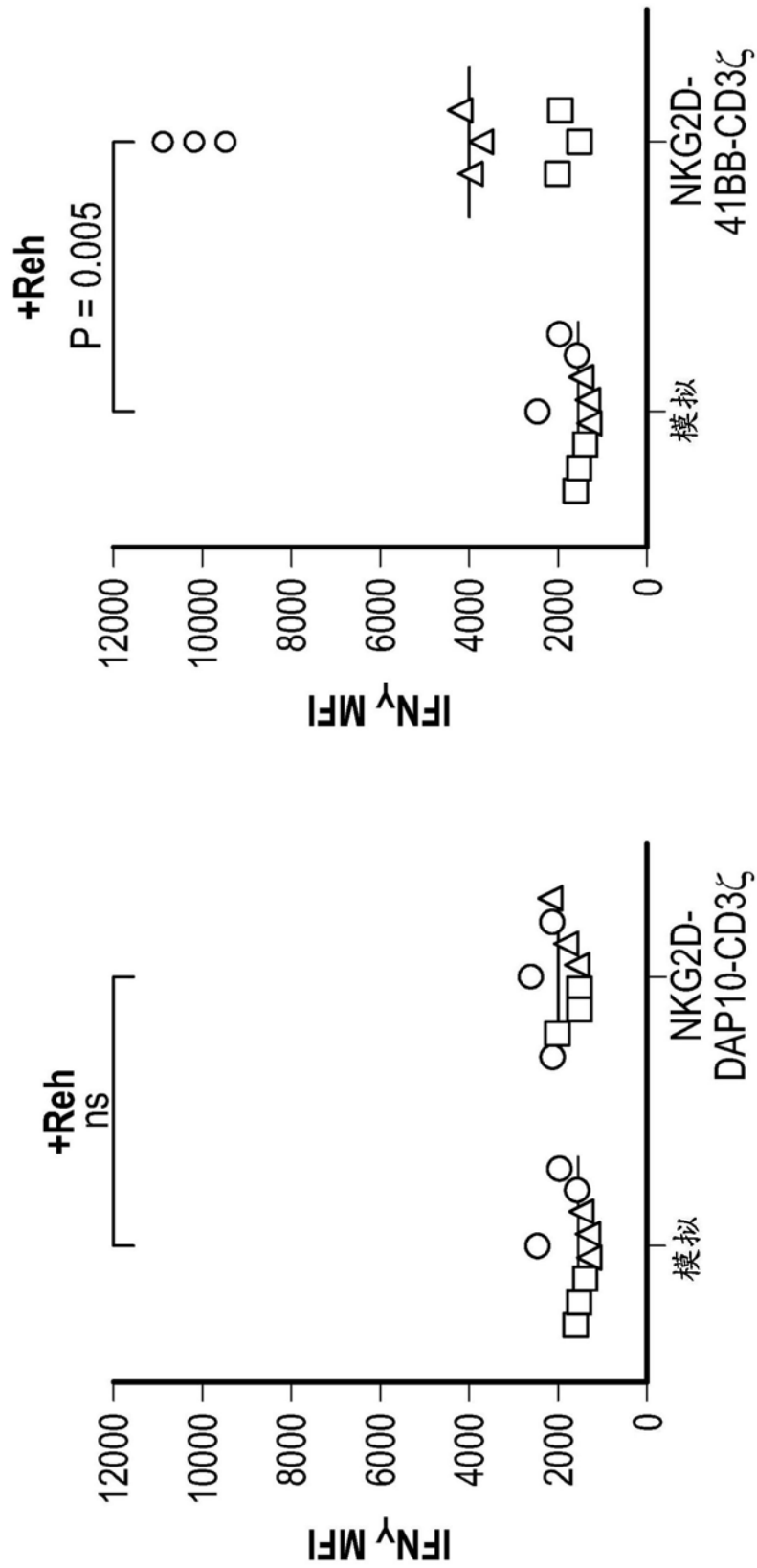


图7B

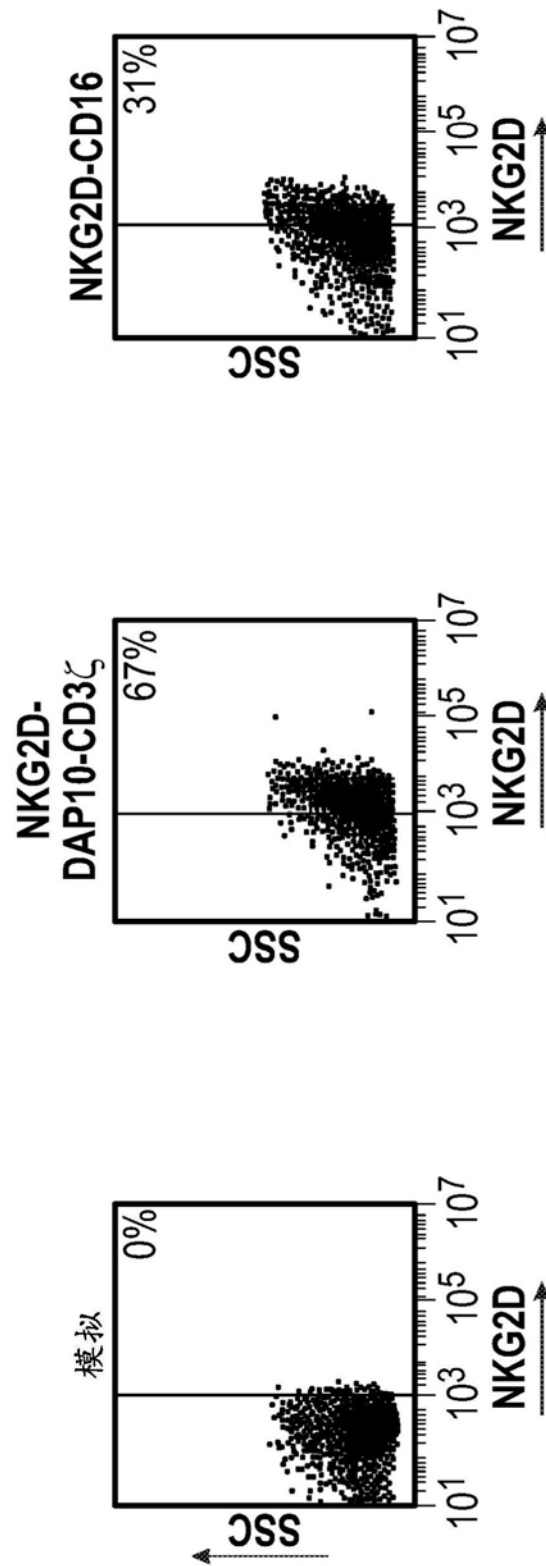


图8A

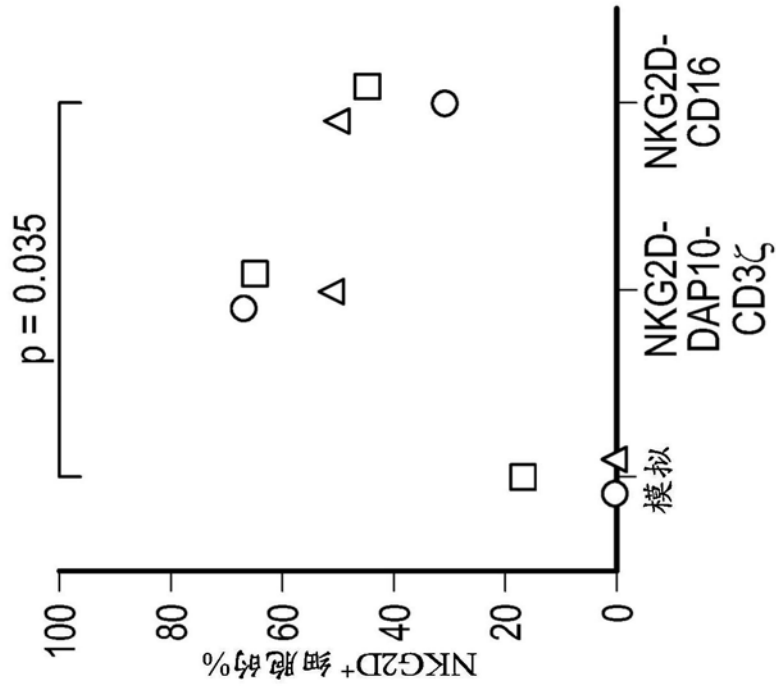


图8B

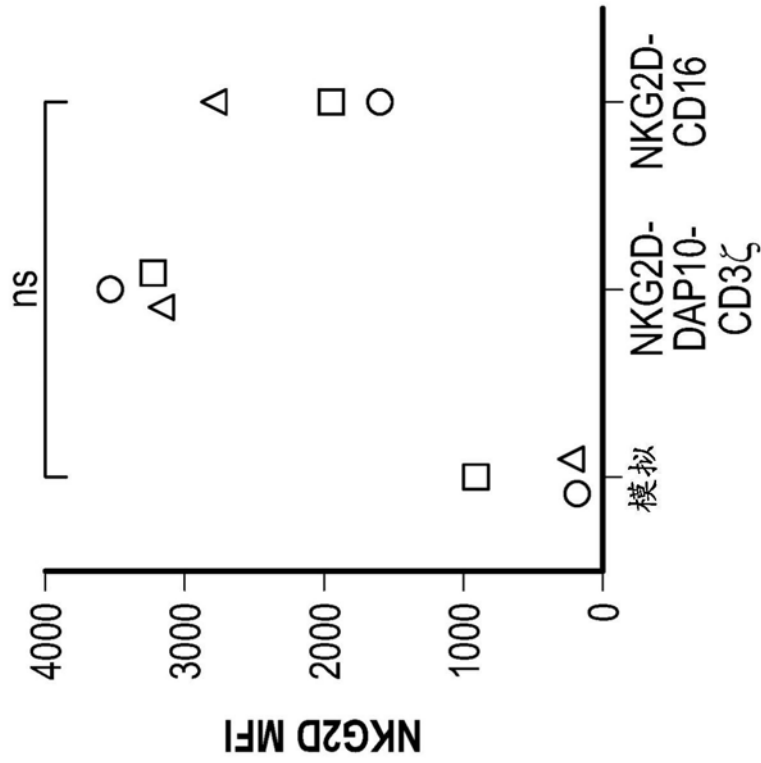


图8C

—□— NKG2D-DAP10-CD3ζ
—Δ— NKG2D-CD16
—○— 模拟

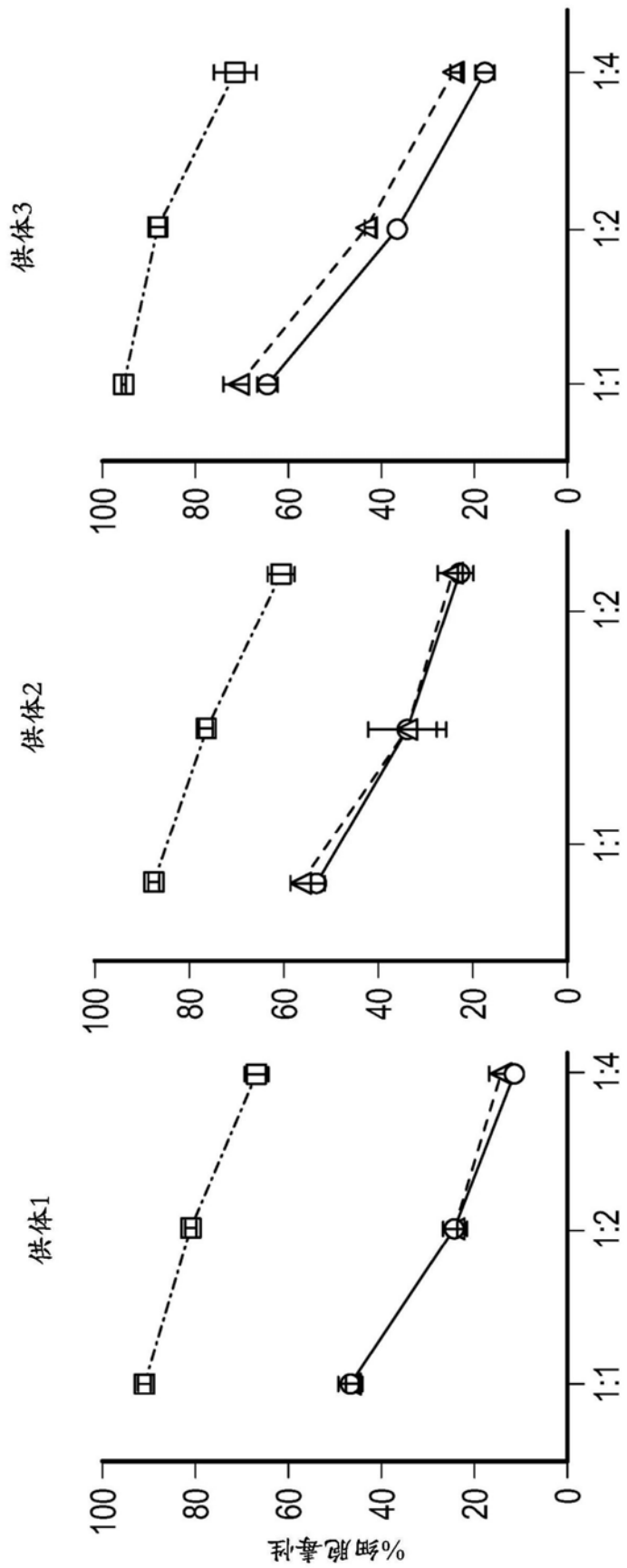


图 9C

图 9B

图 9A



供体3

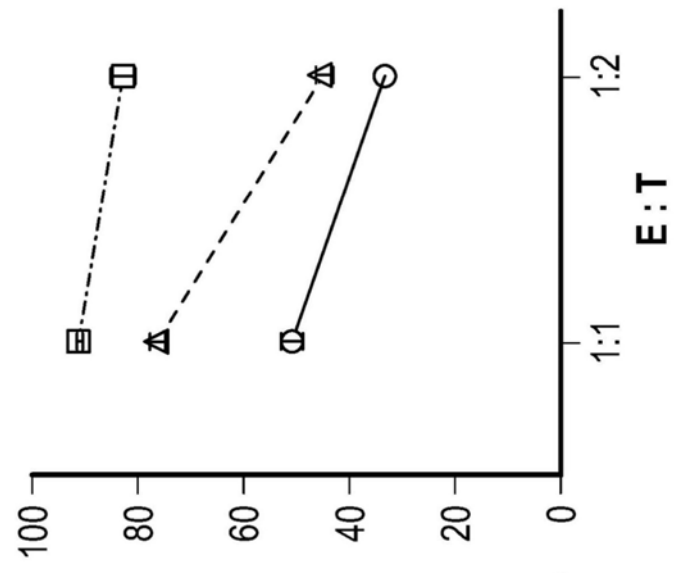


图 10C

供体2

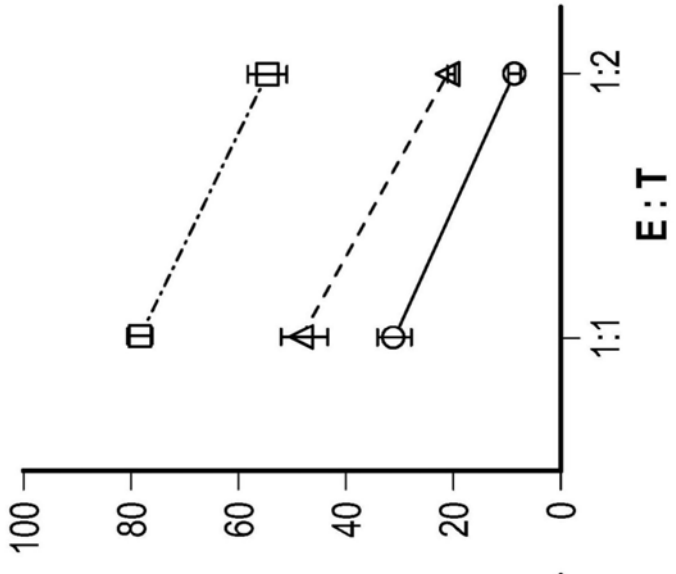


图 10B

供体1

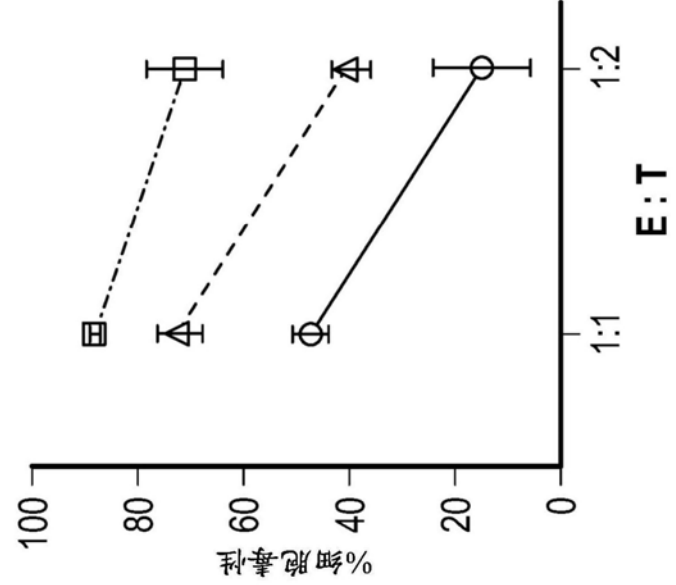


图 10A

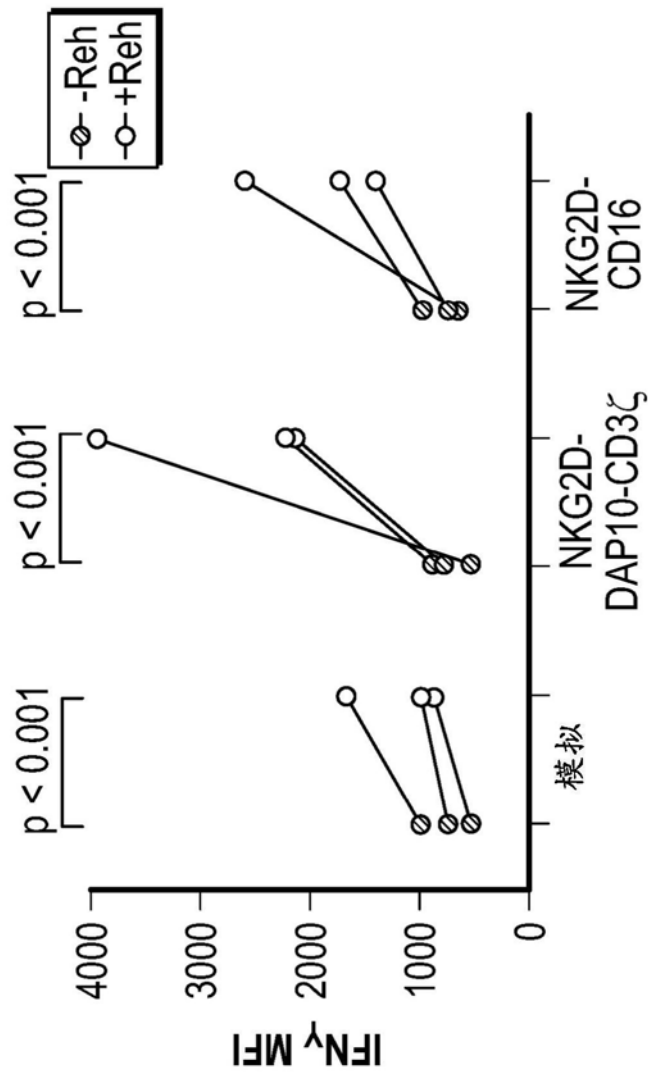


图11

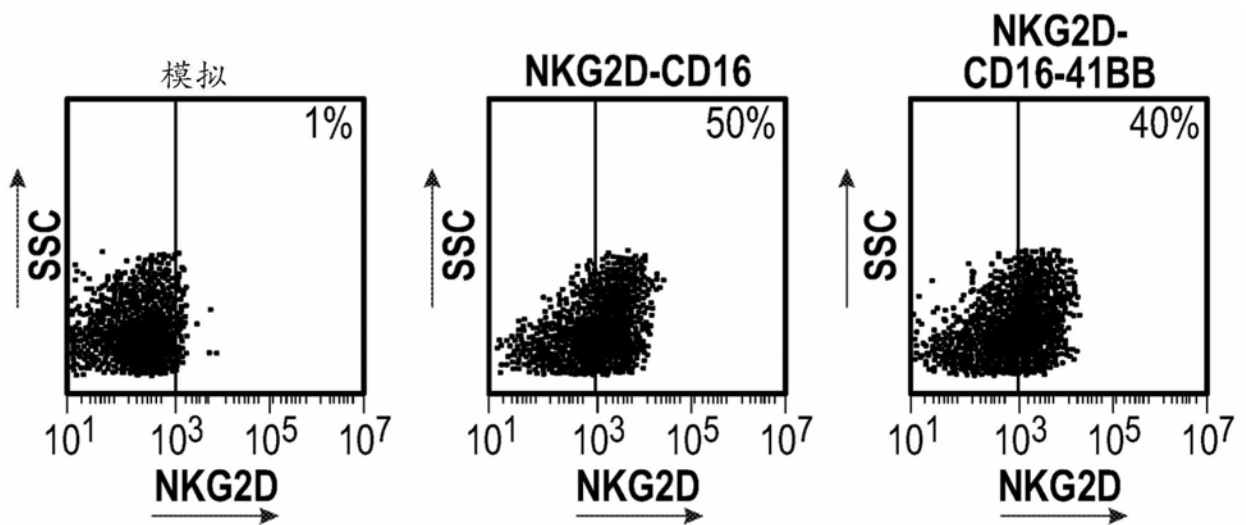


图12A

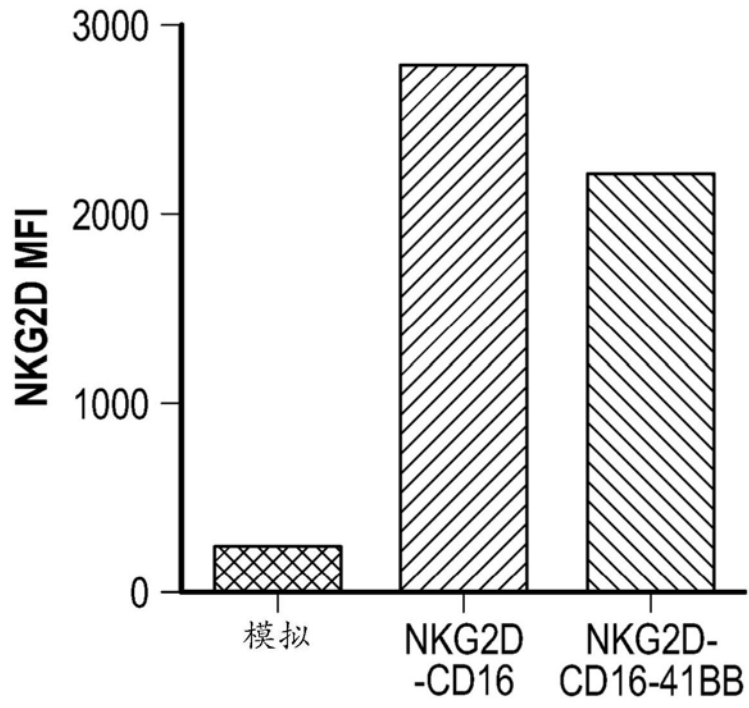


图12B

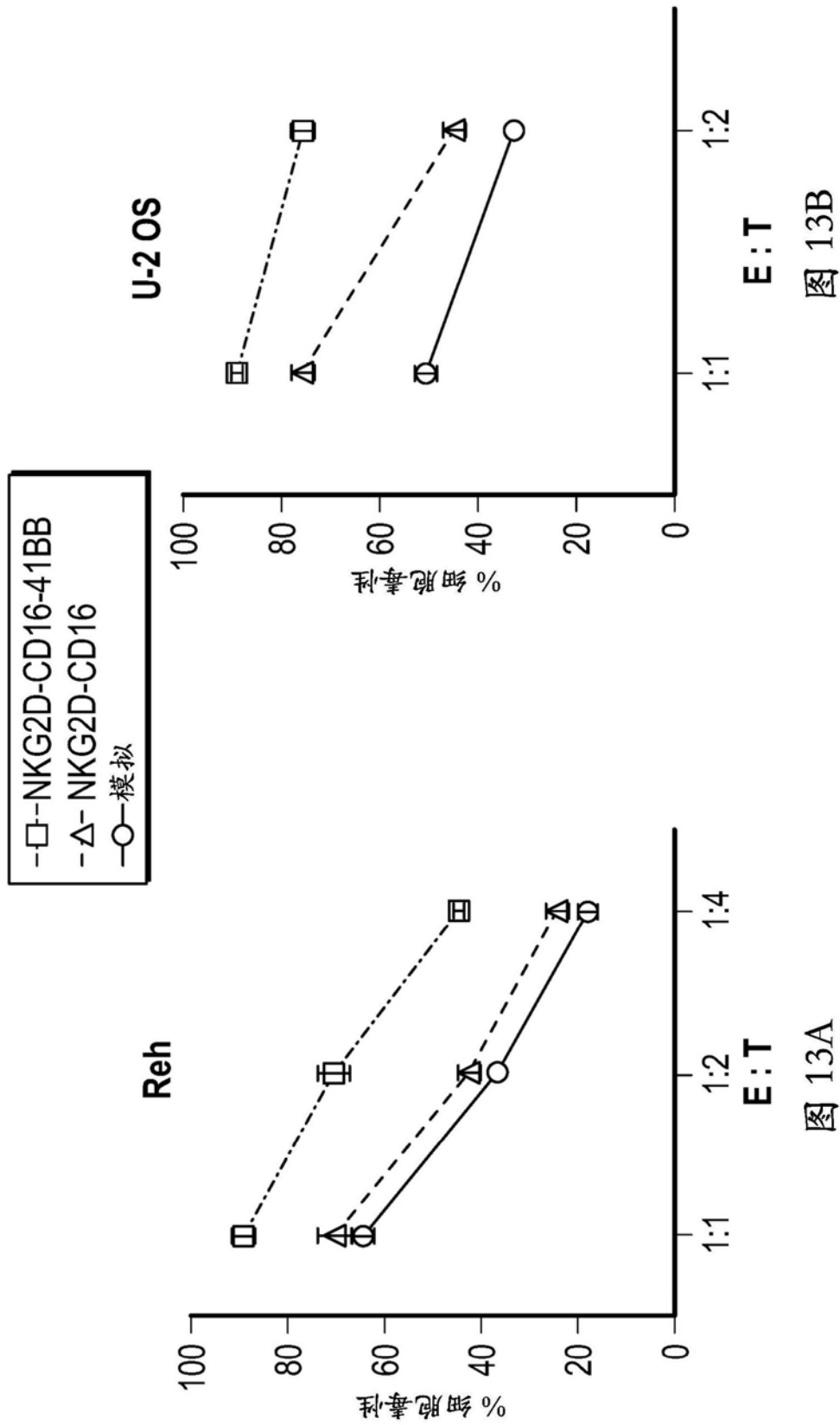


图 13B

图 13A

NK15	NKG2D EC (密码子优化的)	CD8 α 铰链	CD16 TM/IC	4-1BB
变体 1	NKG2D EC (密码子优化的)	GS ₃ CD8 α 铰链	CD16 TM/IC	4-1BB
变体 2	NKG2D EC (密码子优化的)	GS ₃ CD16 TM/IC	4-1BB	
变体 3	NKG2D EC (密码子优化的)	CD16 TM/IC	4-1BB	
变体 4	NKG2D EC	CD8 α 铰链	CD8 α TM	4-1BB 2B4
变体 5	NKG2D EC	ADRB2 EC	ADRB2 TM	4-1BB 2B4
变体 6	NKG2D EC	CD8 α 铰链	CD8 α TM	4-1BB 2B4 GS ₃ NKp80
变体 7	NKG2D EC	CD8 α 铰链	CD8 α TM	4-1BB GS ₃ NKp80
变体 8	NKG2D EC (密码子优化的)	GS ₃ NKG2D EC	ADRB2 EC	ADRB2 TM 4-1BB GS ₃ NKp80
变体 9	NKG2D EC (密码子优化的)	GS ₃ NKG2D EC	CD8 α 铰链	CD8 α TM 4-1BB GS ₃ NKp80
变体 10	NKG2D EC (密码子优化的)	GS ₃ NKG2D EC	CD8 α 铰链	CD16 TM/IC 4-1BB
变体 11	NKG2D EC (密码子优化的)	CD8 α 铰链	CD16 TM/IC	4-1BB 2B4
变体 12	NKG2D EC (密码子优化的)	CD8 α 铰链	CD16 TM/IC	4-1BB GS ₃ NKp80

图14

NK16	NKG2D EC	CD8 α 铰链	CD8 α TM	4-1BB	CD3 ζ ITAM
变体 13	NKG2D EC	CD8 α 铰链	CD8 α TM	4-1BB 2B4	CD3 ζ ITAM
变体 14	NKG2D EC	CD8 α 铰链	CD8 α TM	4-1BB	DAP10 IC
变体 15	NKG2D EC	CD8 α 铰链	CD8 α TM	4-1BB	DAP10 IC 2B4
变体 16	NKG2D EC	CD8 α 铰链	CD8 α TM	4-1BB 2B4	DAP10 IC
变体 17	NKG2D EC (密码子优化的)	GS ₃ NKG2D EC	CD8 α 铰链	CD8 α TM	4-1BB CD3 ζ ITAM
变体 18 (NK39)	NKG2D EC (密码子优化的)	CD8 α 铰链	CD3 ζ TM	CD16 IC	4-1BB
NK39_1	NKG2D EC (密码子优化的)	GS ₃ NKG2D EC	CD8 α 铰链	CD3 ζ TM	CD16 IC 4-1BB 2A
NK39_2	NKG2D EC	CD8 α 铰链	CD3 ζ TM	CD16 IC	4-1BB GS ₃ NKp80 2A

图15

NK39_3	NKG2D EC (密码子优化的)	GS ₃ NKG2D EC	CD8 α 铰链	CD3 ζ TM	CD16 IC	4-1BB	GS ₃ NKp80	mIL-15
NK39_4	NKG2D EC (密码子优化的)	CD8 α 铰链	CD3 ζ TM	4-1BB	2A	mIL-15		
NK39_5	NKG2D EC (密码子优化的)	CD8 α 铰链	CD3 ζ TM	4-1BB	CD3 ζ	2A	mIL-15	
NK39_6	NKG2D EC (密码子优化的)	CD8 α 铰链	CD3 ζ TM	4-1BB	GS ₃ NKp80	2A	mIL-15	
NK39_7	NKG2D EC (密码子优化的)	CD8 α 铰链	CD3 ζ TM	4-1BB	GS ₃ CD16 IC	2A	mIL-15	
NK39_8	NKG2D EC	CD8 α 铰链	CD3 ζ TM	4-1BB	FC γ	2A	mIL-15	
NK39_9	IL-15	GS ₃ NKG2D EC	CD8 α 铰链	CD8 α TM	4-1BB	Cd3 ζ ITAM		
NK39_10	NKG2D EC (密码子优化的)	CD8 α 铰链	CD3 ζ TM	CD16 IC	4-1BB	2A	mIL-15	
NK16_7	NKG2D EC (密码子优化的)	GS ₃ NKG2D EC	CD8 α 铰链	CD8 α TM	4-1BB	Cd3 ζ ITAM	2A	mIL-15

图15(续)

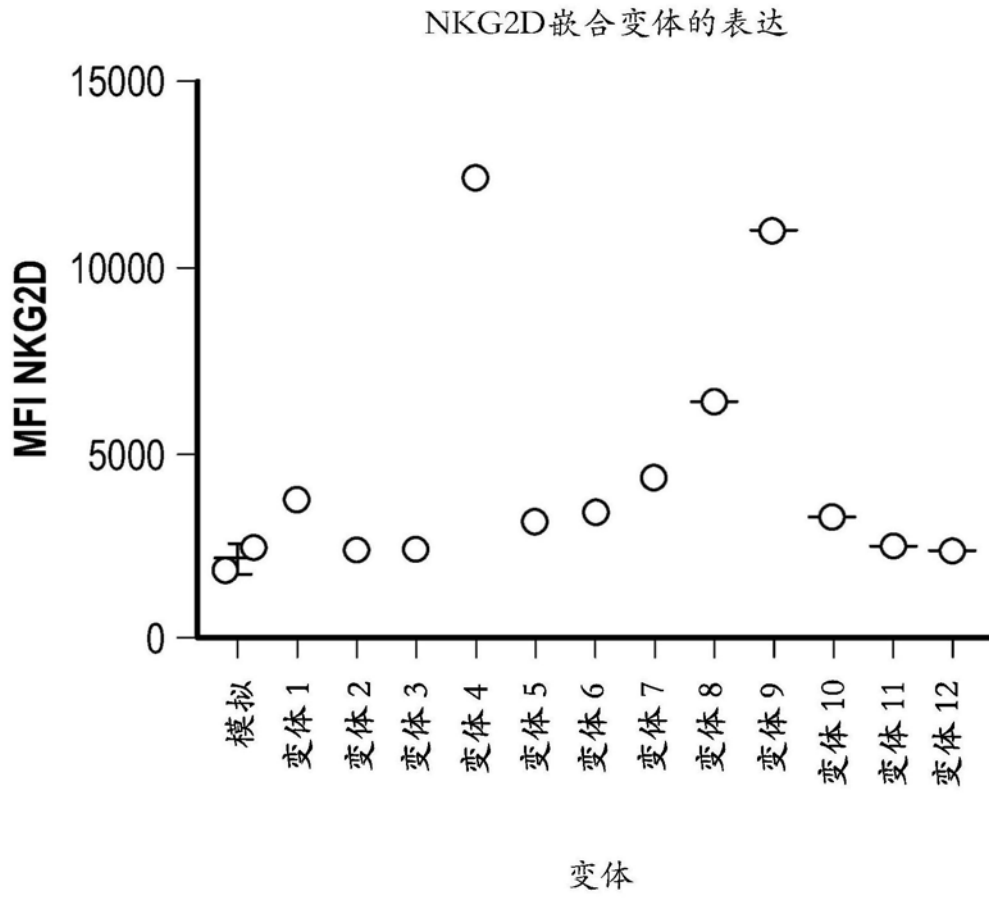


图16A

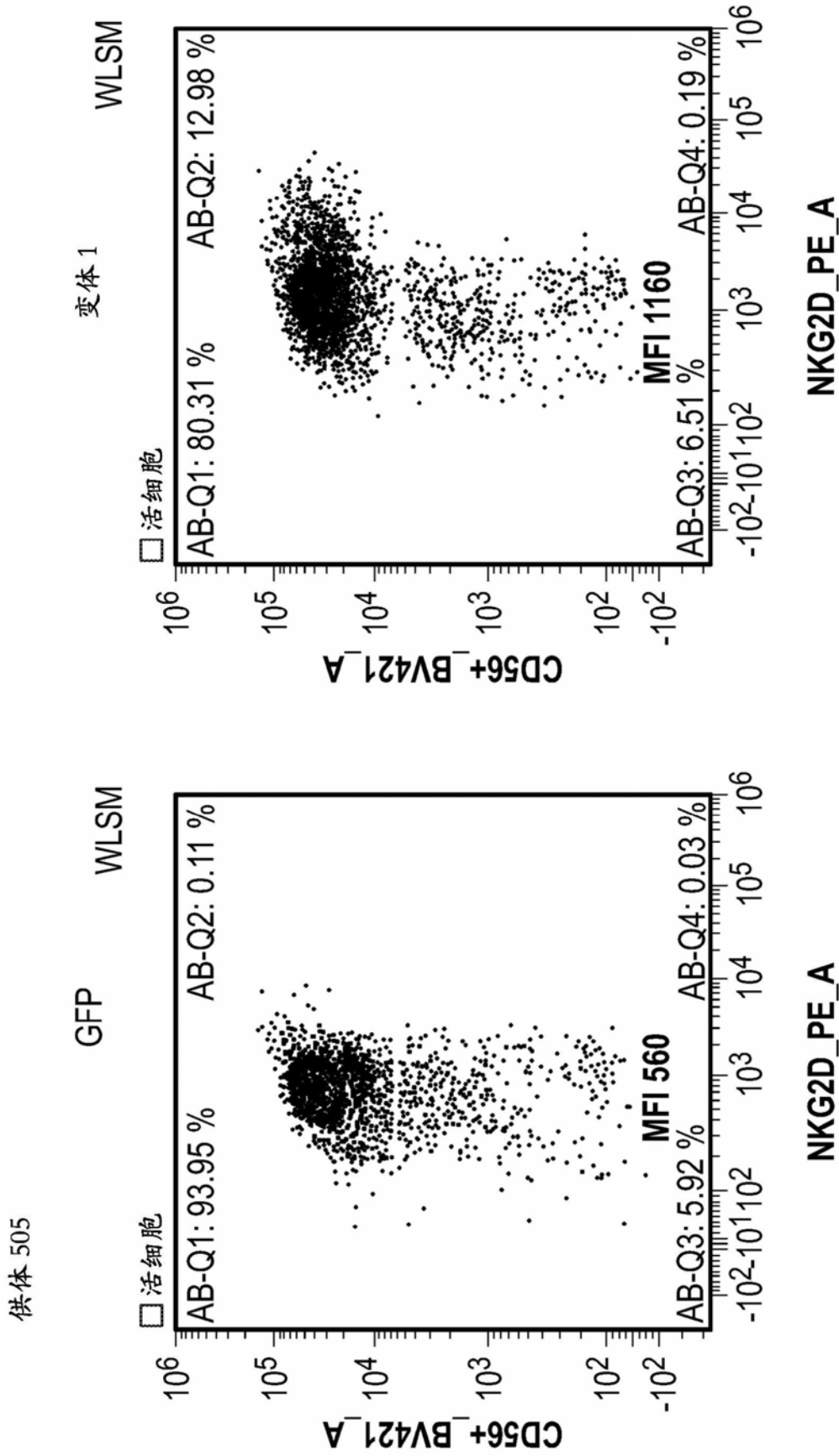


图16B

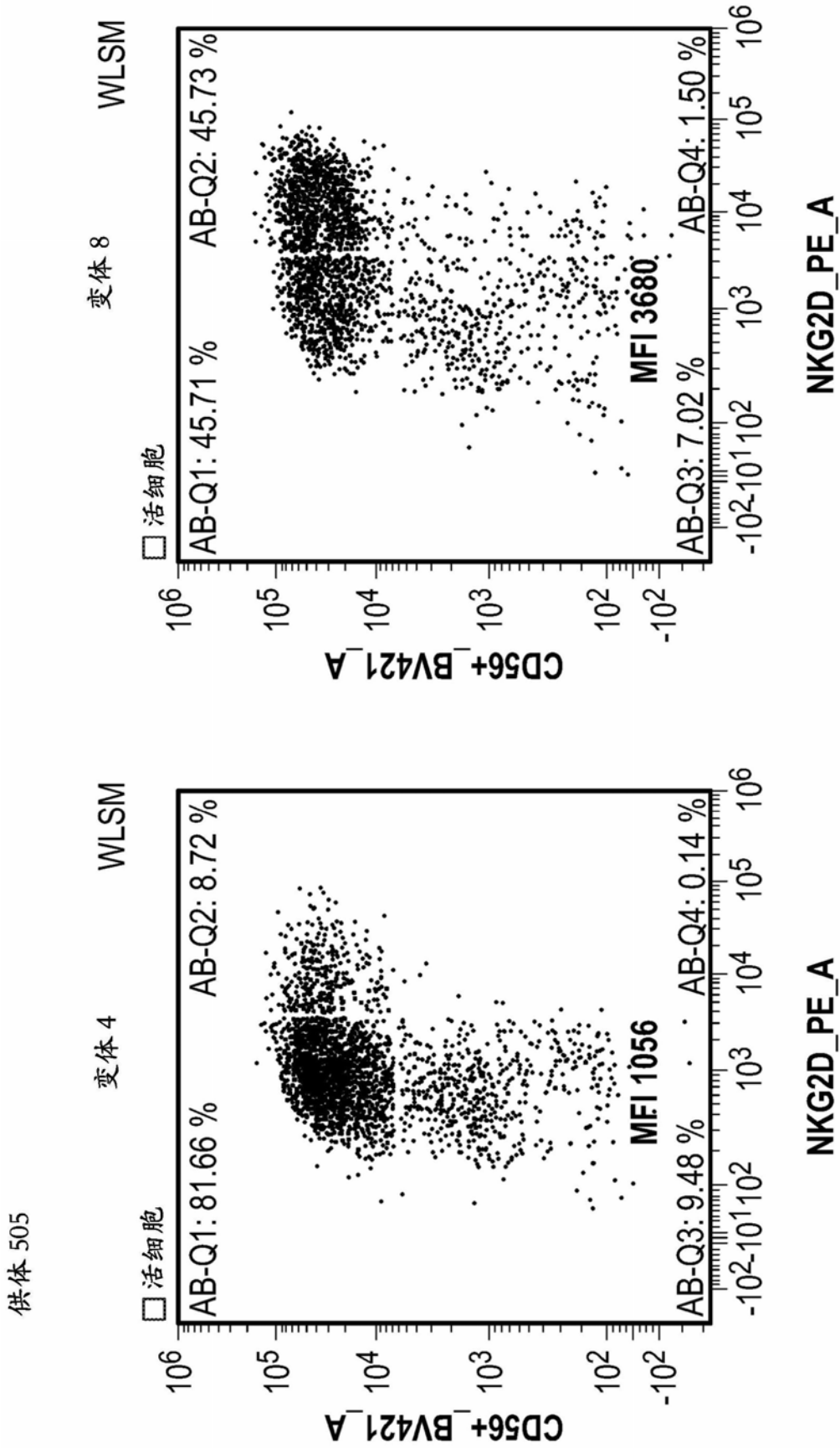


图16B(续)

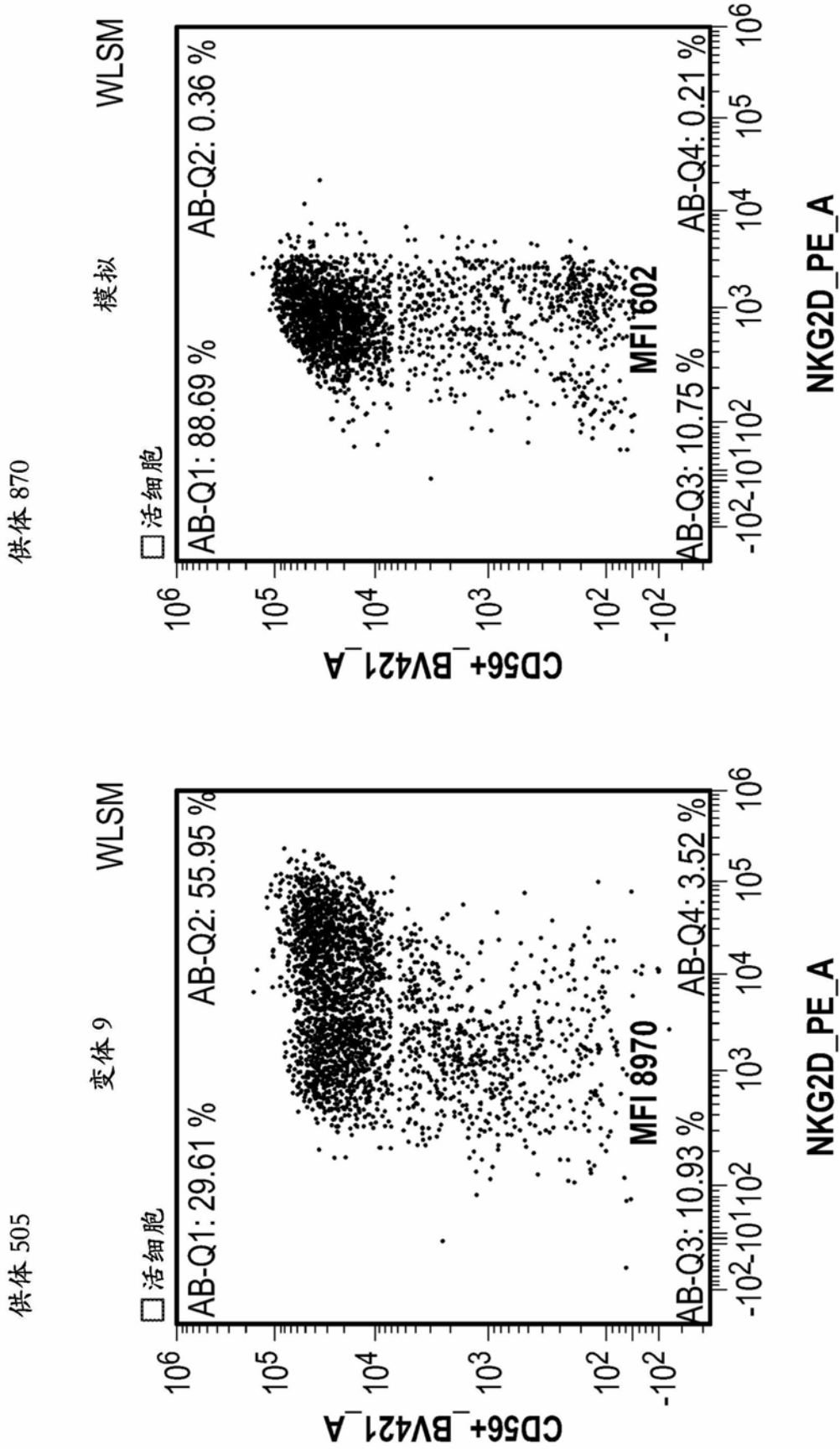


图16B (续)

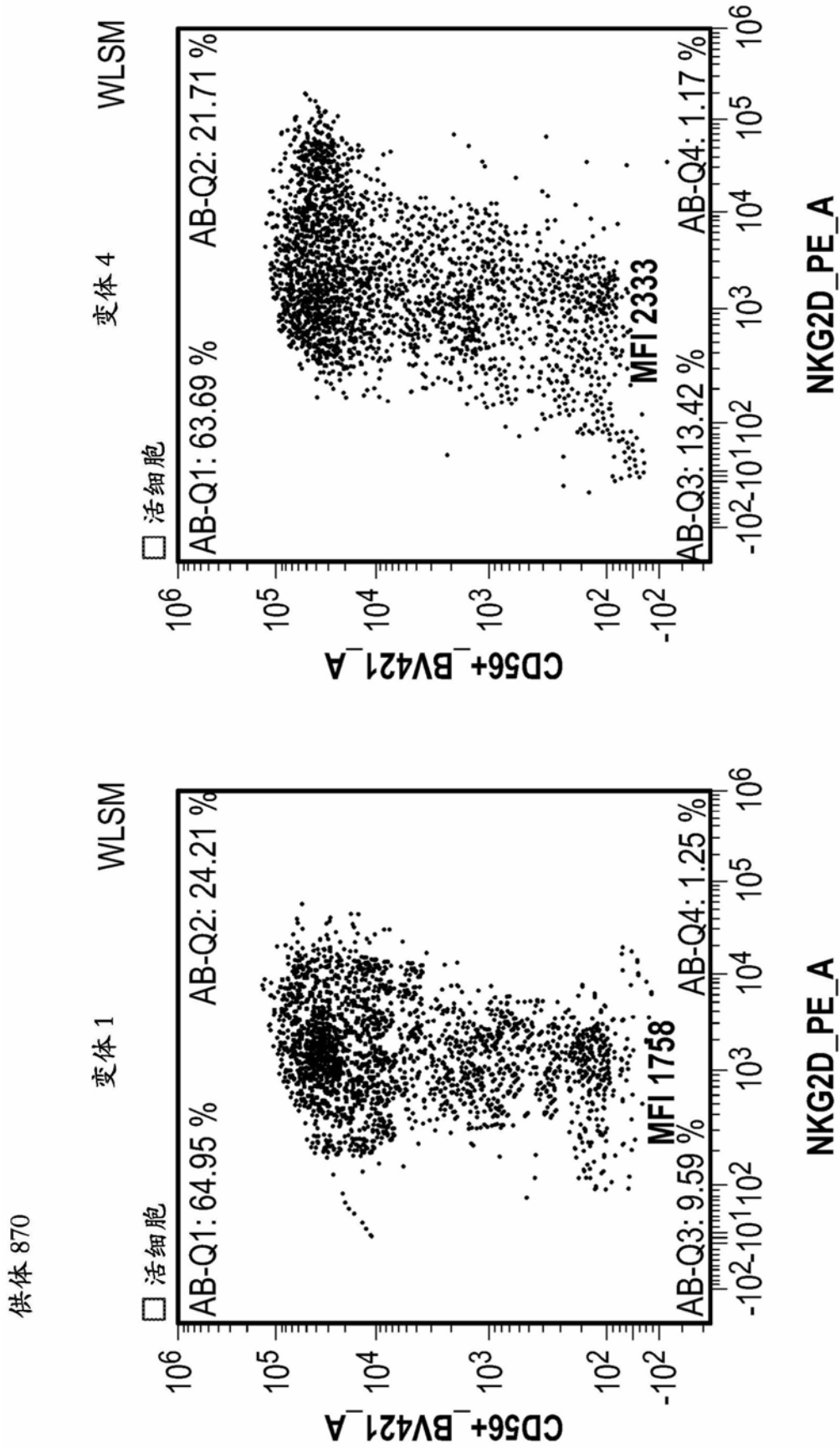


图16B (续)

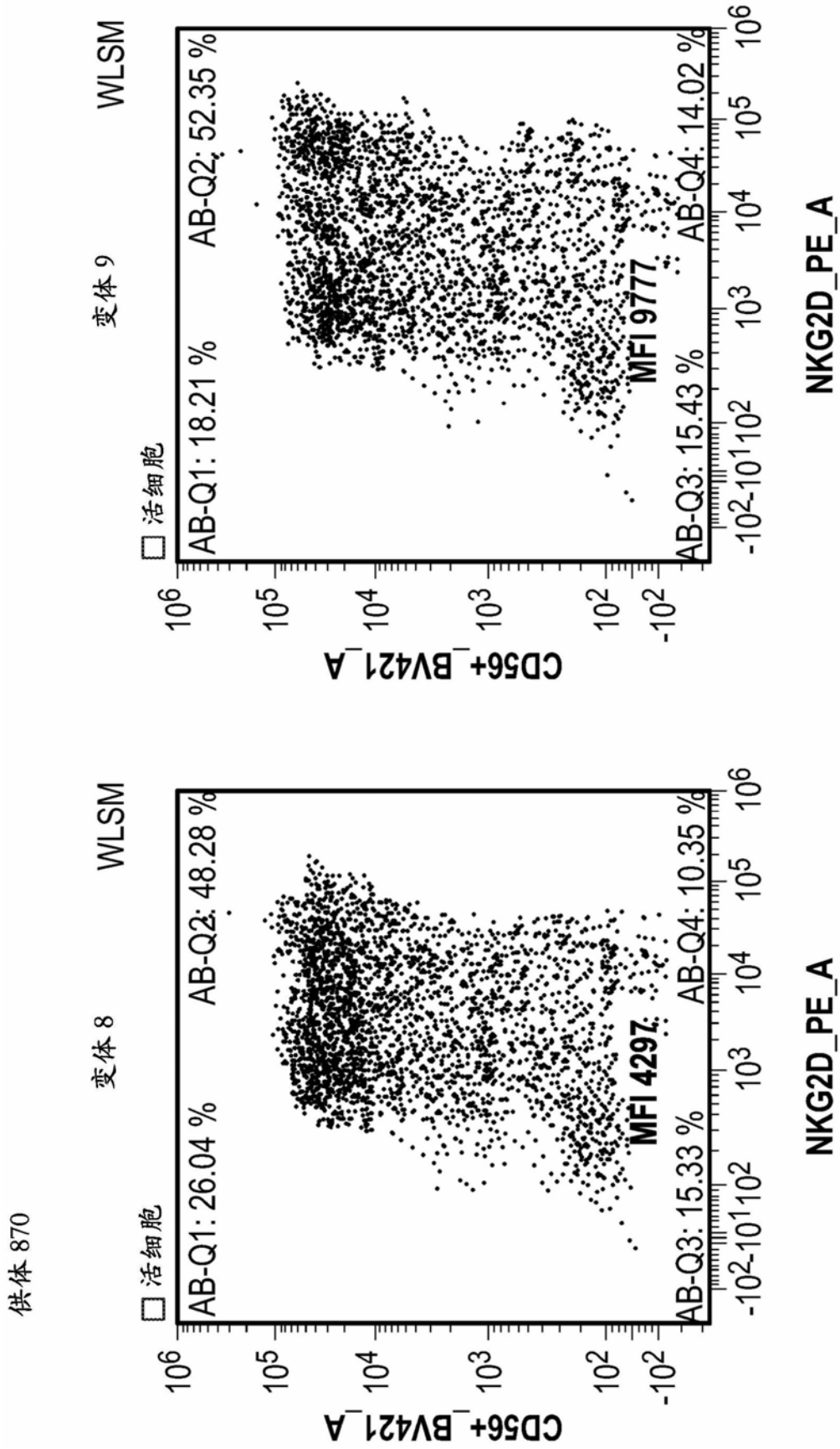


图16B (续)

转导后7天在2个供体中的变体表达

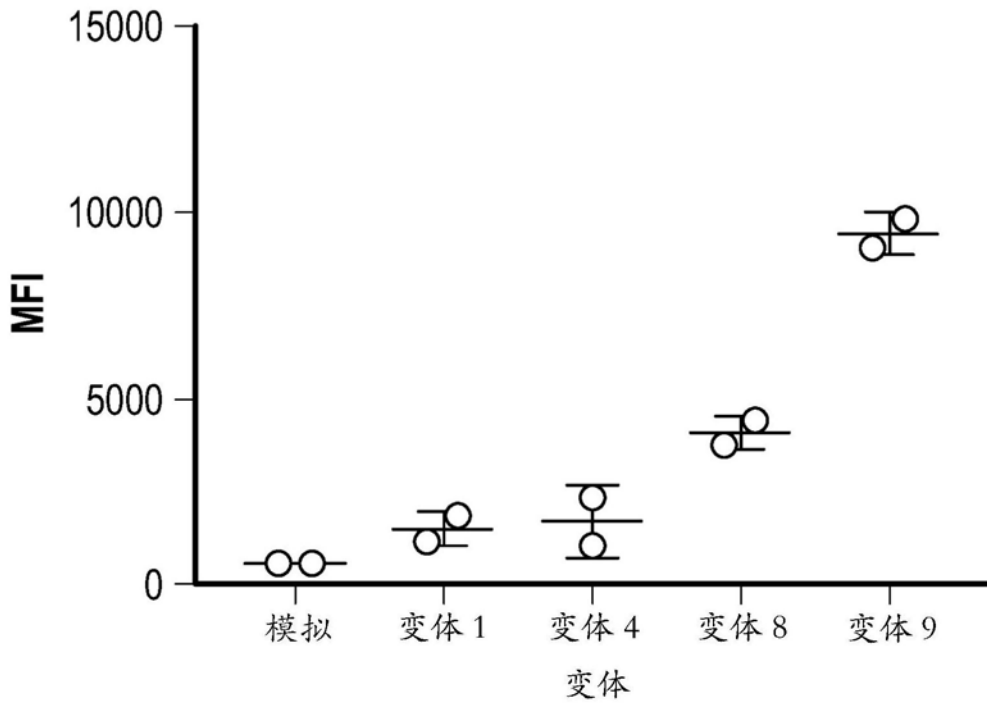


图16C

转导后14天以1:1 E:T比率的变体细胞毒性

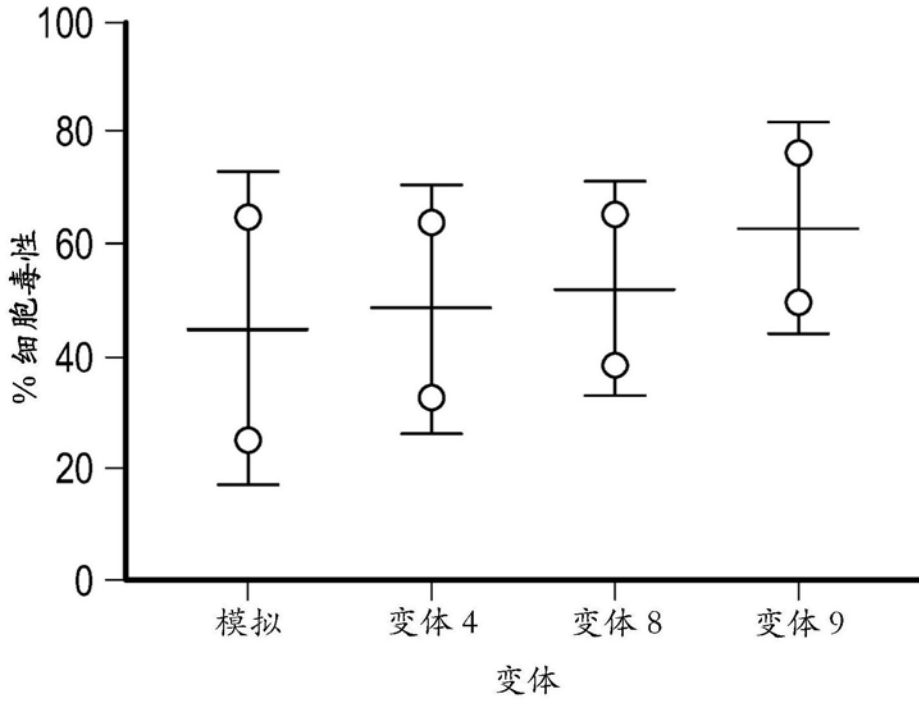


图17

转导后7天的NKG2D变体表达

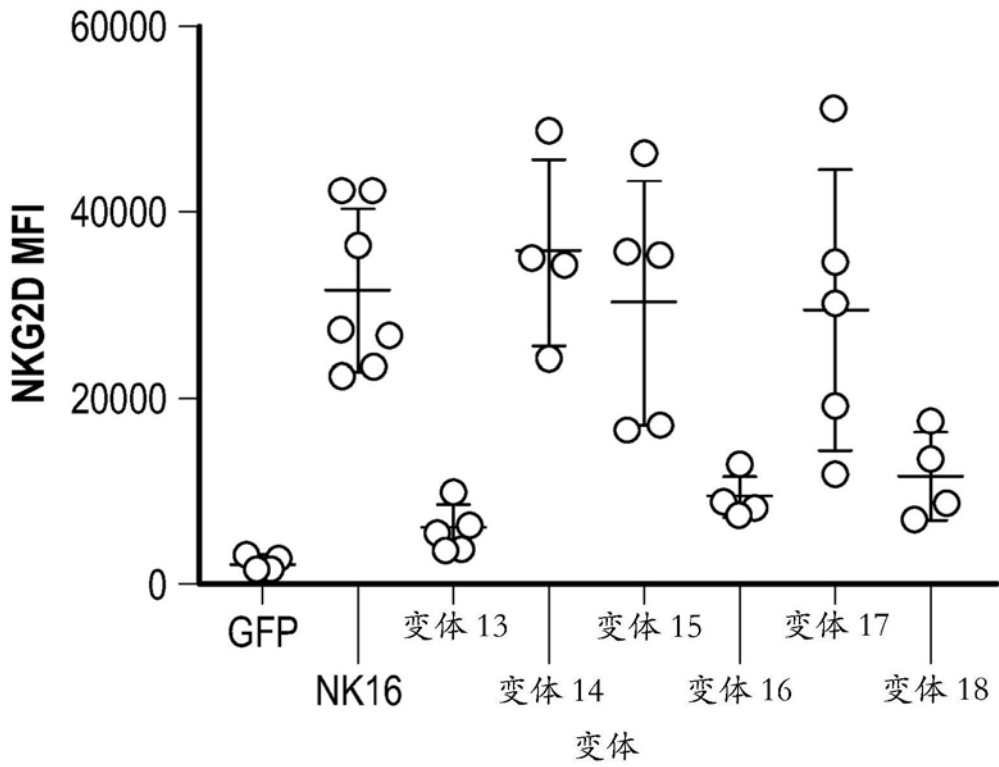


图18A

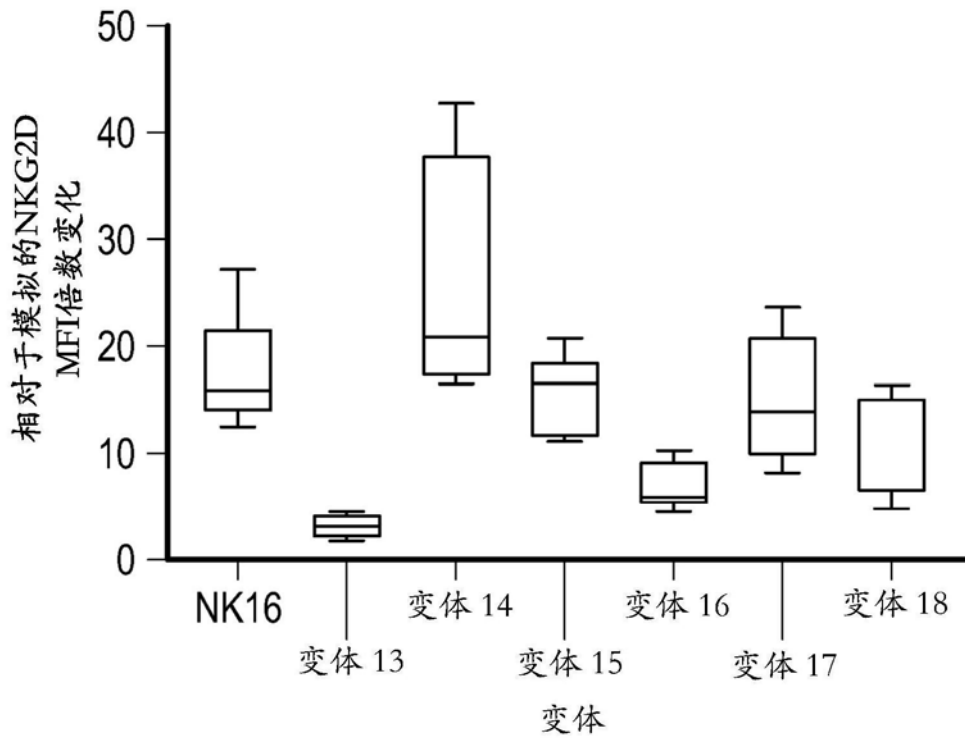


图18B

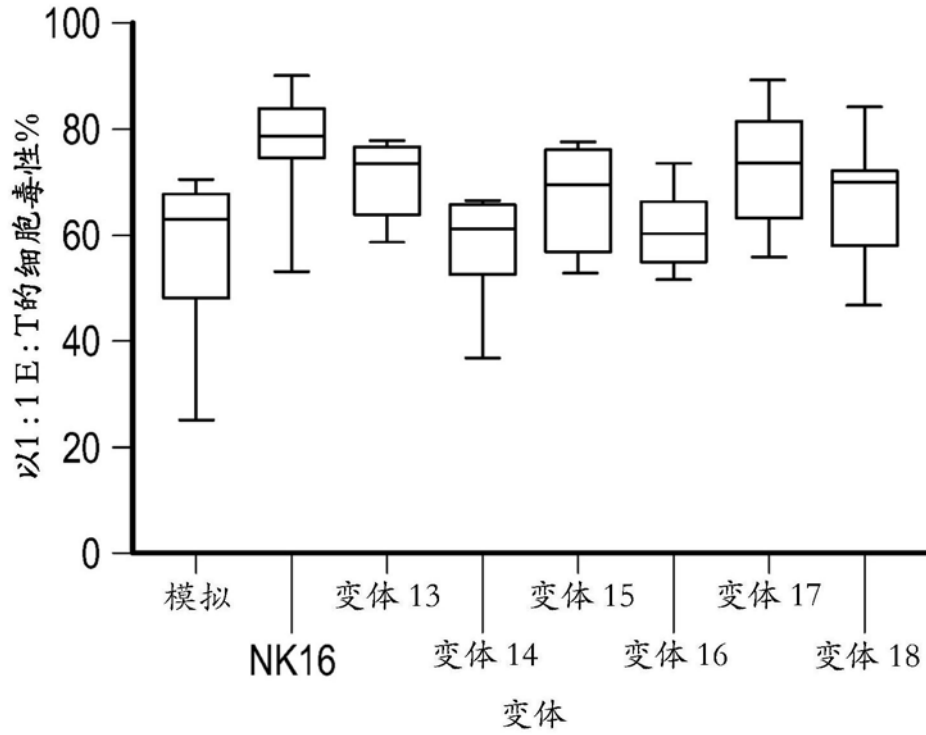


图19A

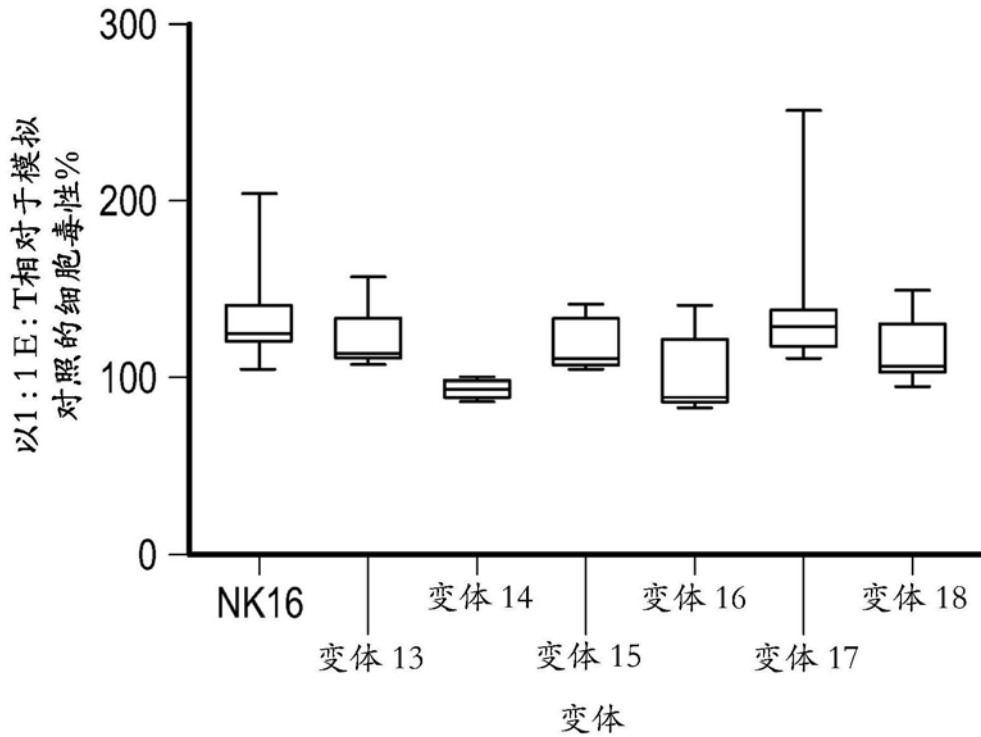


图19B

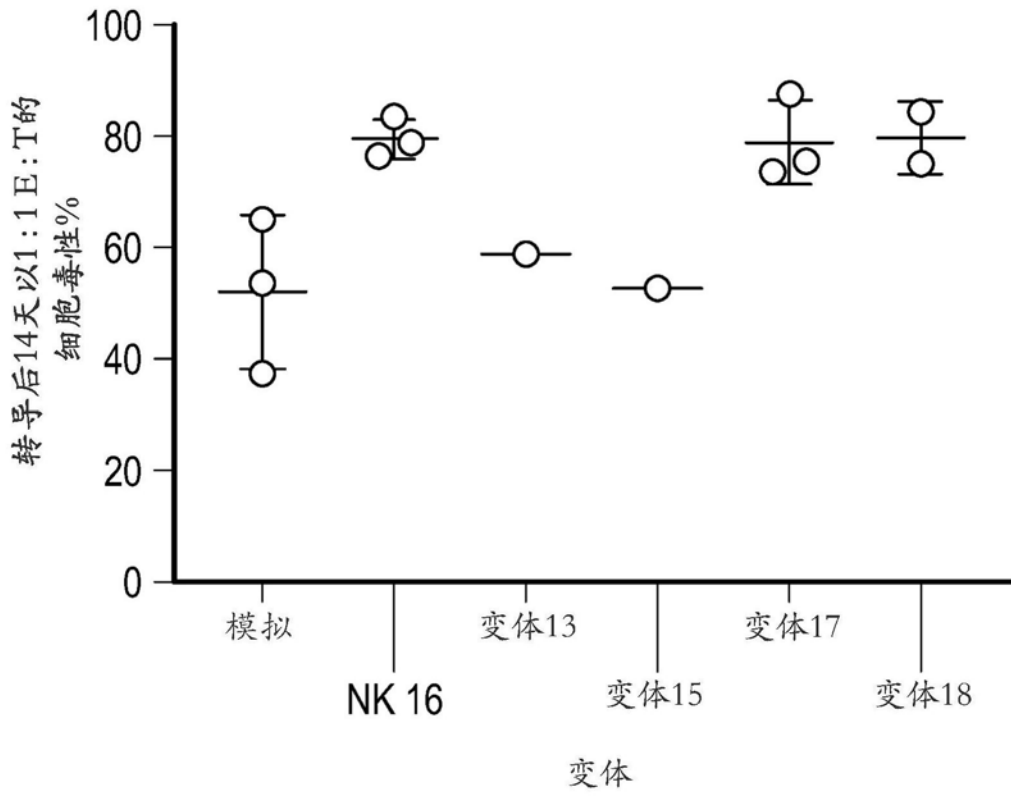


图20

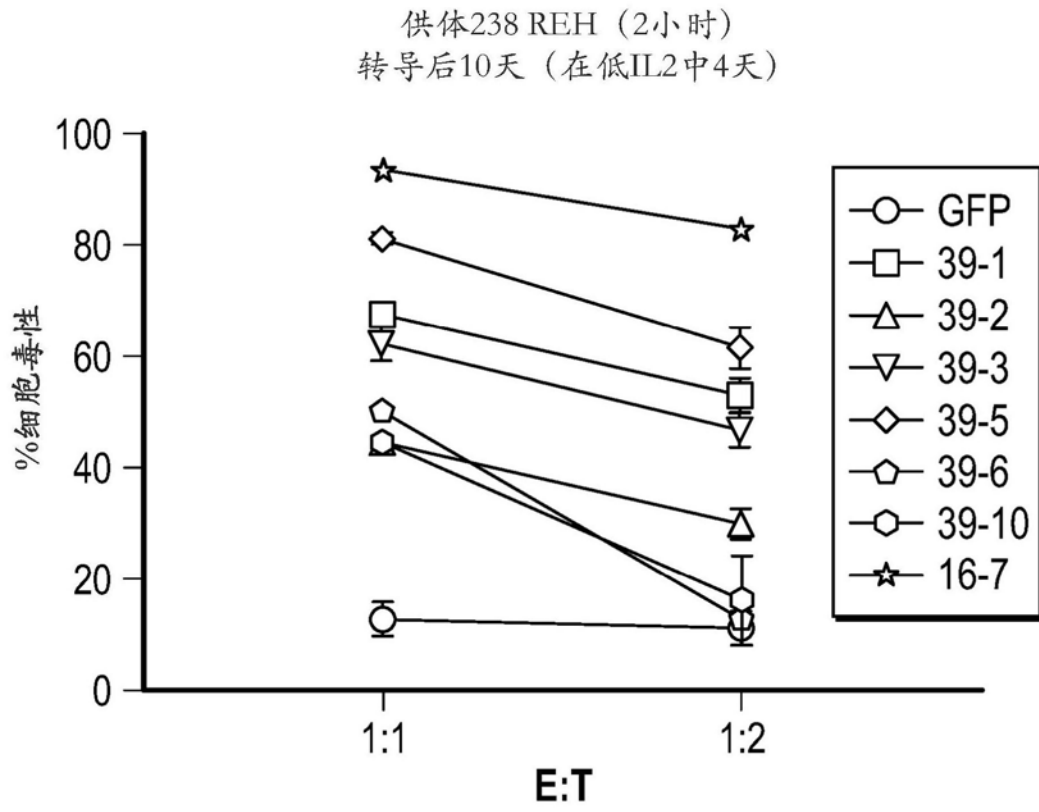


图21

NK45-1	NKG2D(短铰链) - 41BB - Cd3z IgG4 铰链 : ESKYGPPCPSCP)						
	NKG2D EC	Ig4 SH	CD8 α TM	4-1BB	Cd3 ζ ITAM	2A	mIL-15
NK45-2	NKG2D-CD28-CD3z						
	NKG2D EC	CD8 α 铰链	CD28 TM	CD28	Cd3 ζ ITAM	2A	mIL-15
NK45-3	NKG2D (SH)-CD28 - CD3z						
	NKG2D EC	Ig4SH	CD28 TM	CD28	Cd3 ζ ITAM	2A	mIL-15
NK45-4	NKG2D-OX40-CD3z						
	NKG2D EC	CD8 α 铰链	CD8 α TM	OX40	Cd3 ζ ITAM	2A	mIL-15
NK45-5	NKG2D (SH)-OX40-CD3z						
	NKG2D EC	Ig4SH	CD8 α TM	OX40	Cd3 ζ ITAM	2A	mIL-15
NK45-6	NKG2D-CD3TM-CD28-CD3z						
	NKG2D EC	CD8 α 铰链	CD3 α TM	CD28	Cd3 ζ ITAM	2A	mIL-15
NK45-7	NKG2D-CD28-41BB-CD3z						
	NKG2D EC	CD8 α 铰链	CD28 TM	CD28	4-1BB	Cd3 ζ ITAM	2A mIL-15

图22

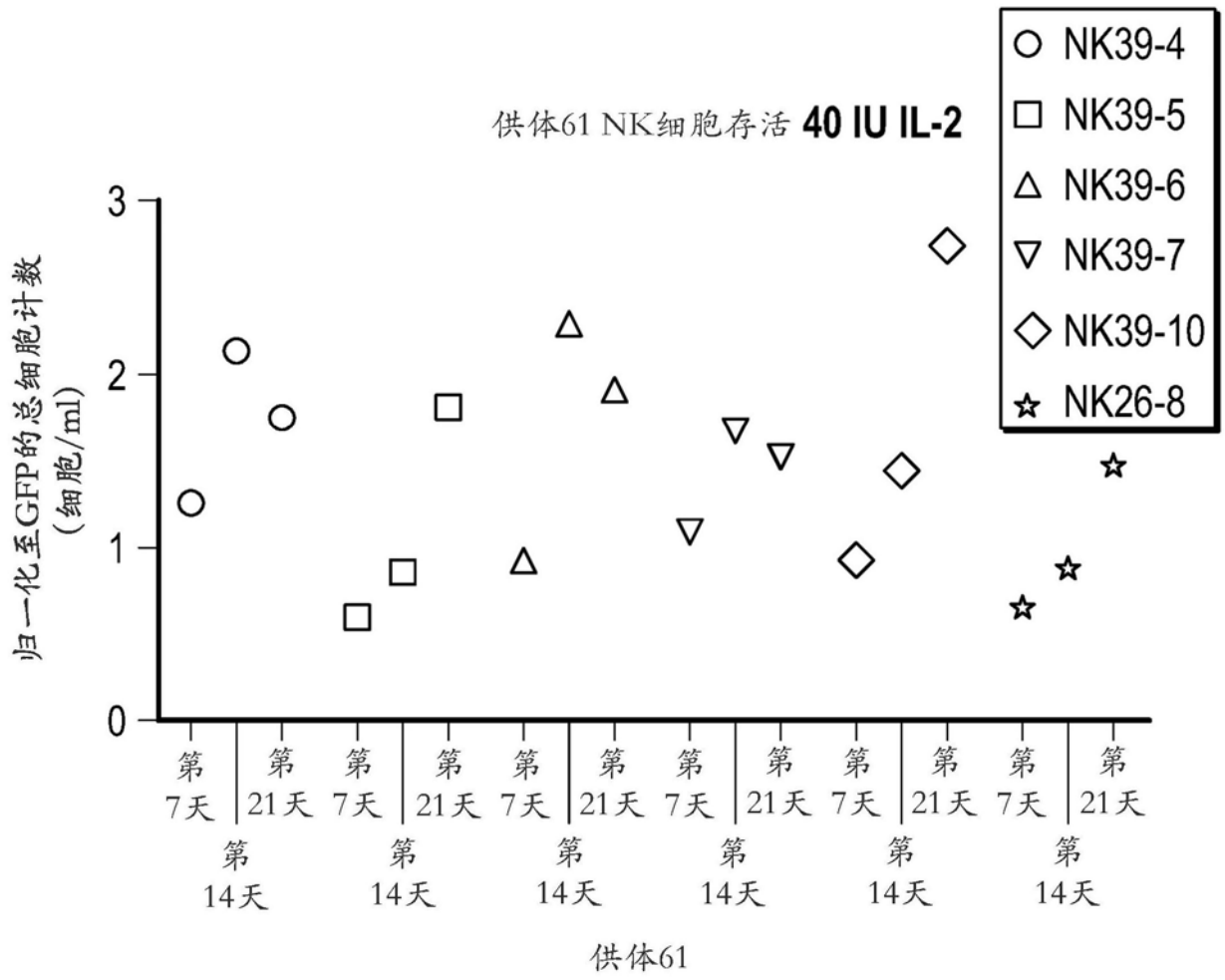


图23A

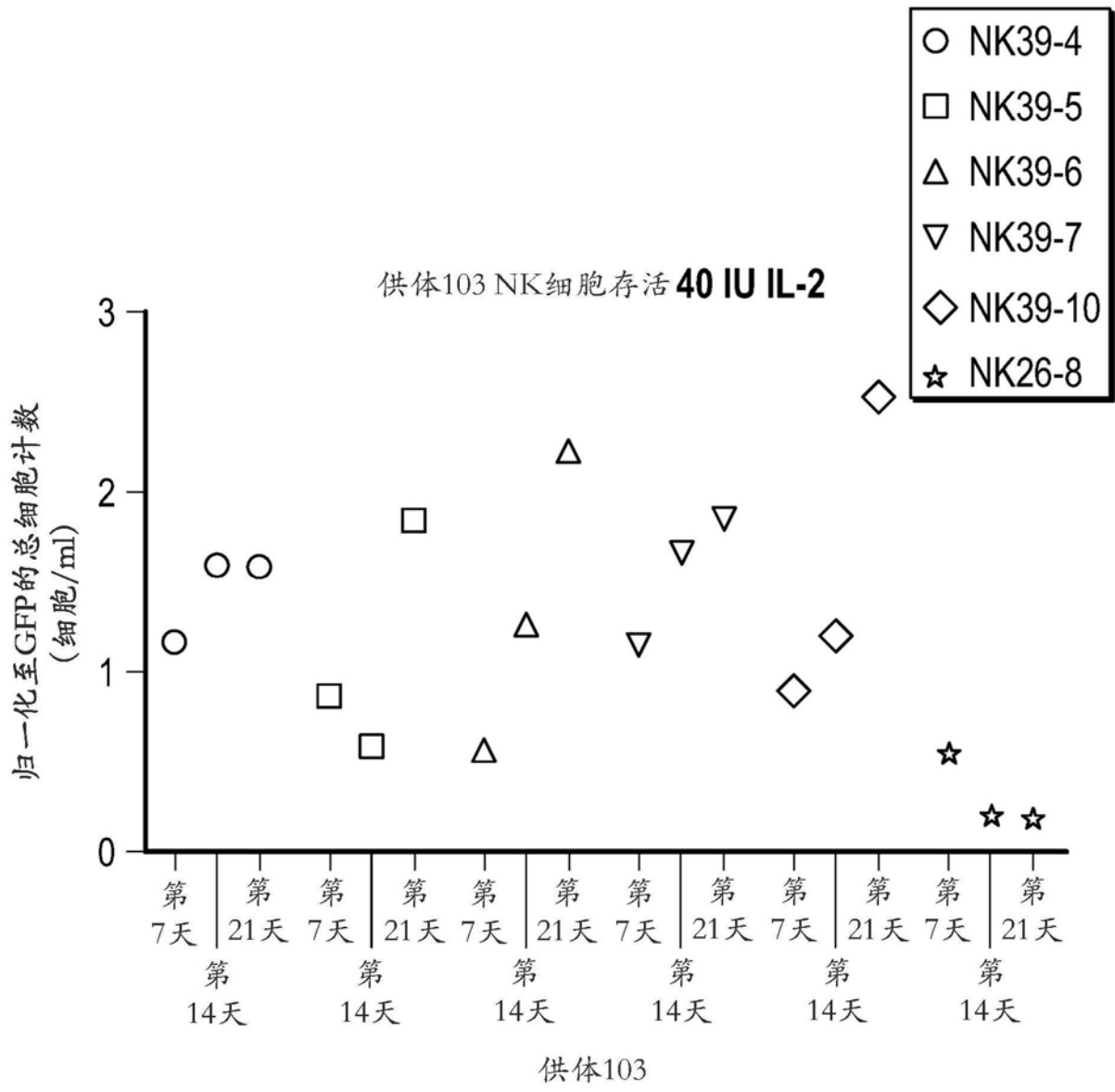


图23B

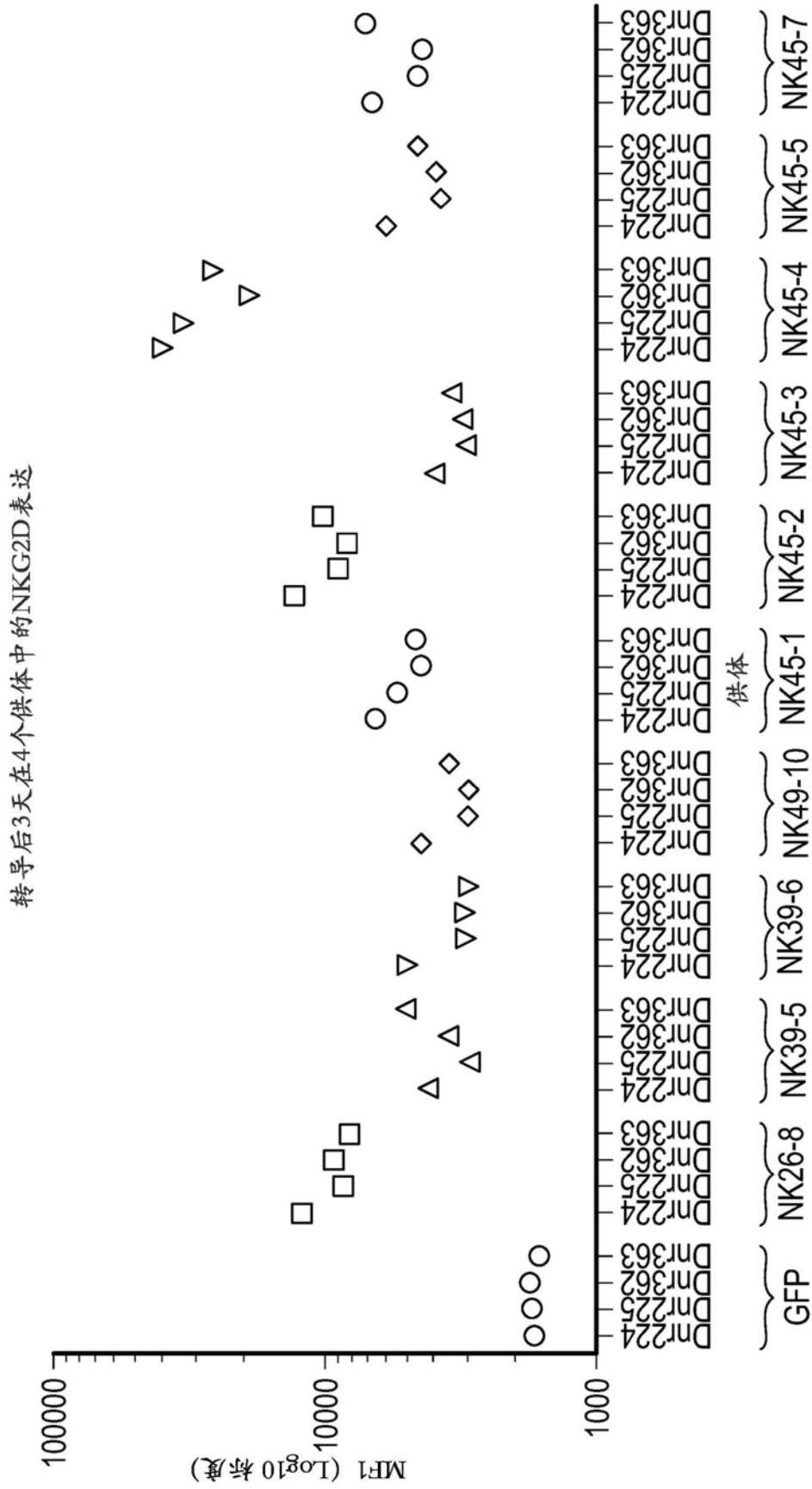


图24

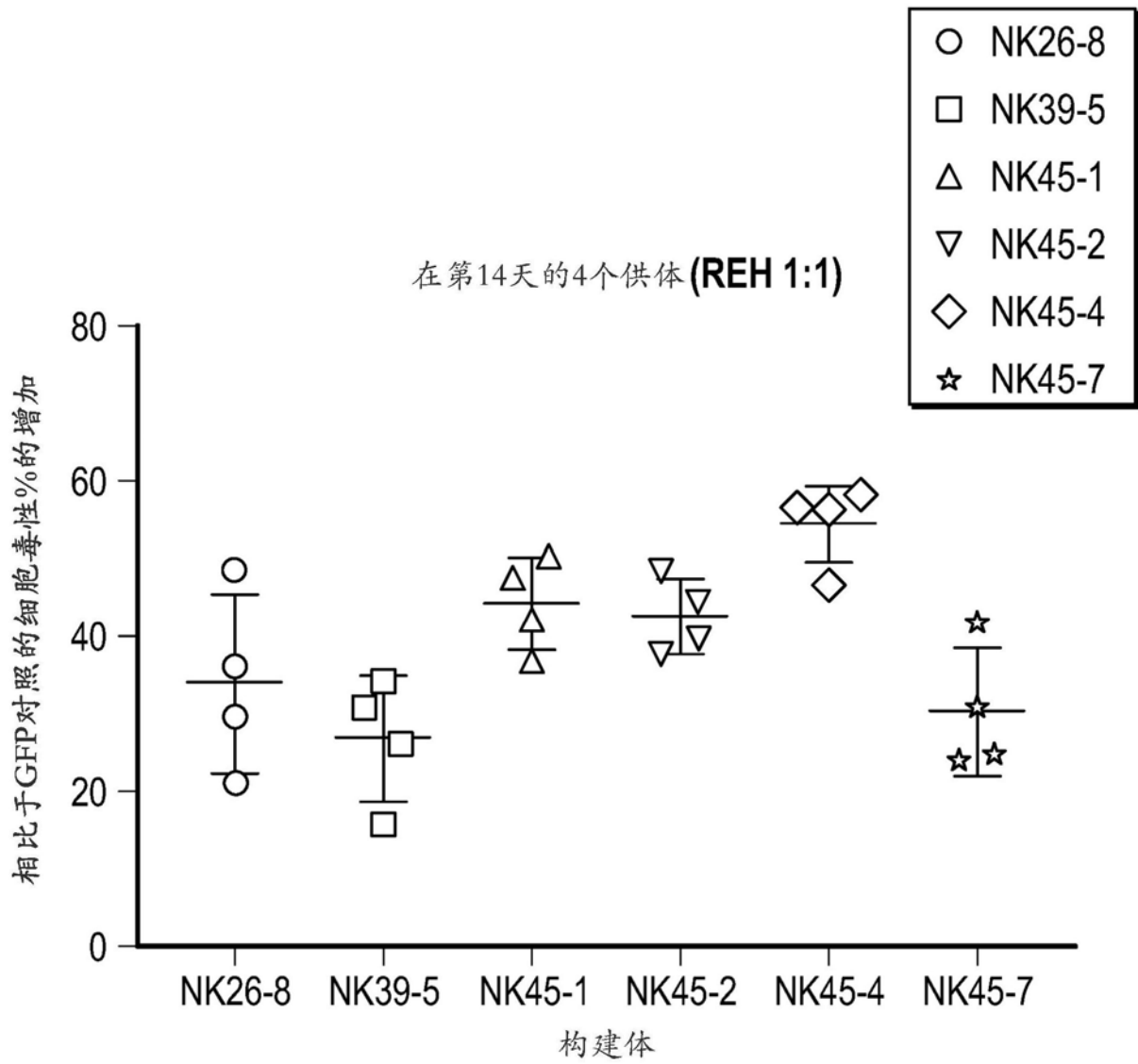


图25A

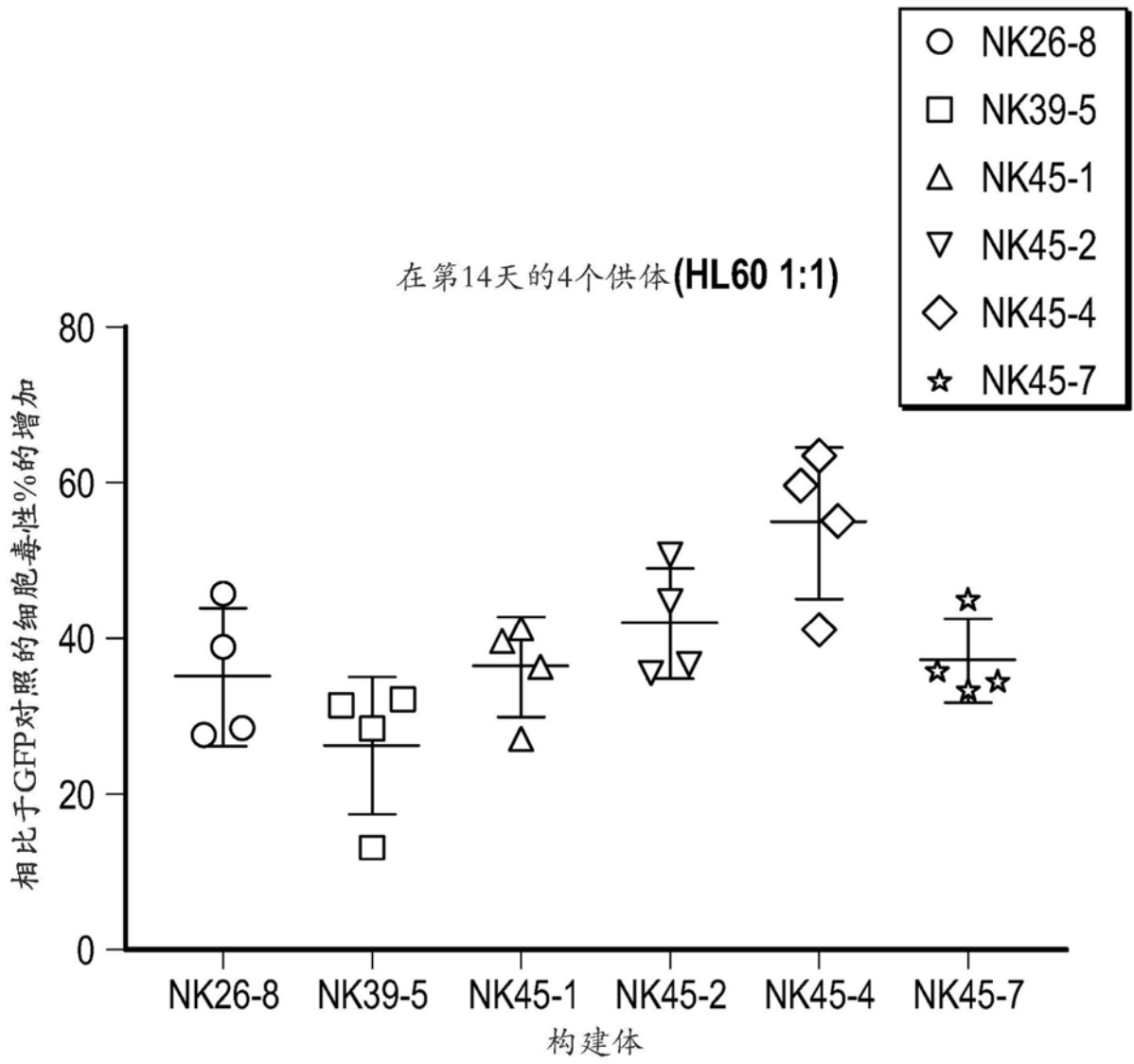


图25B

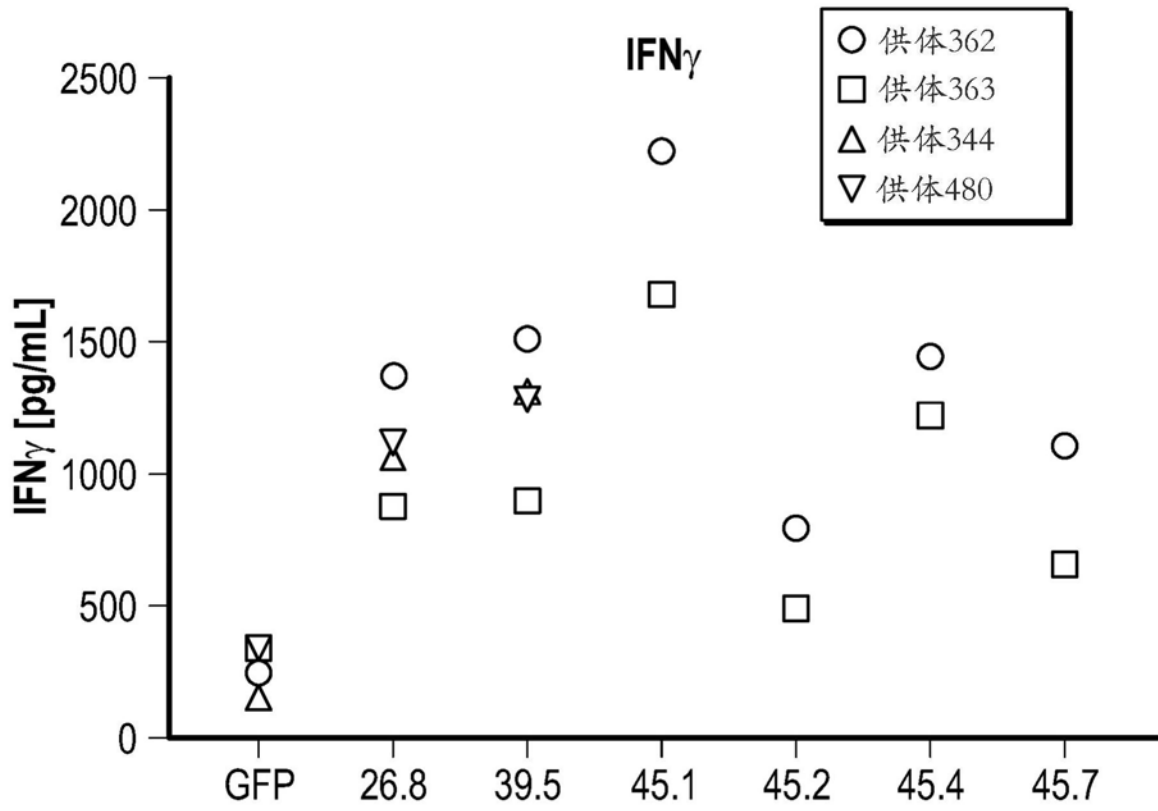


图26A

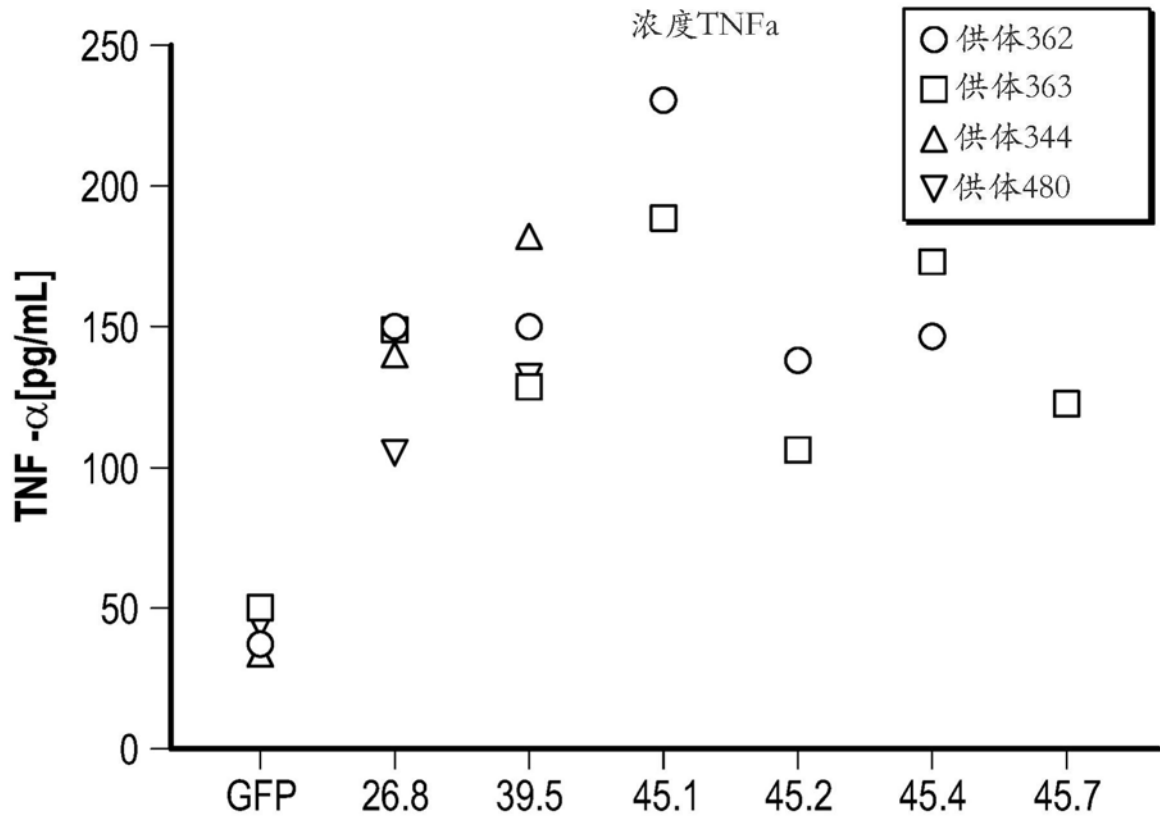


图26B

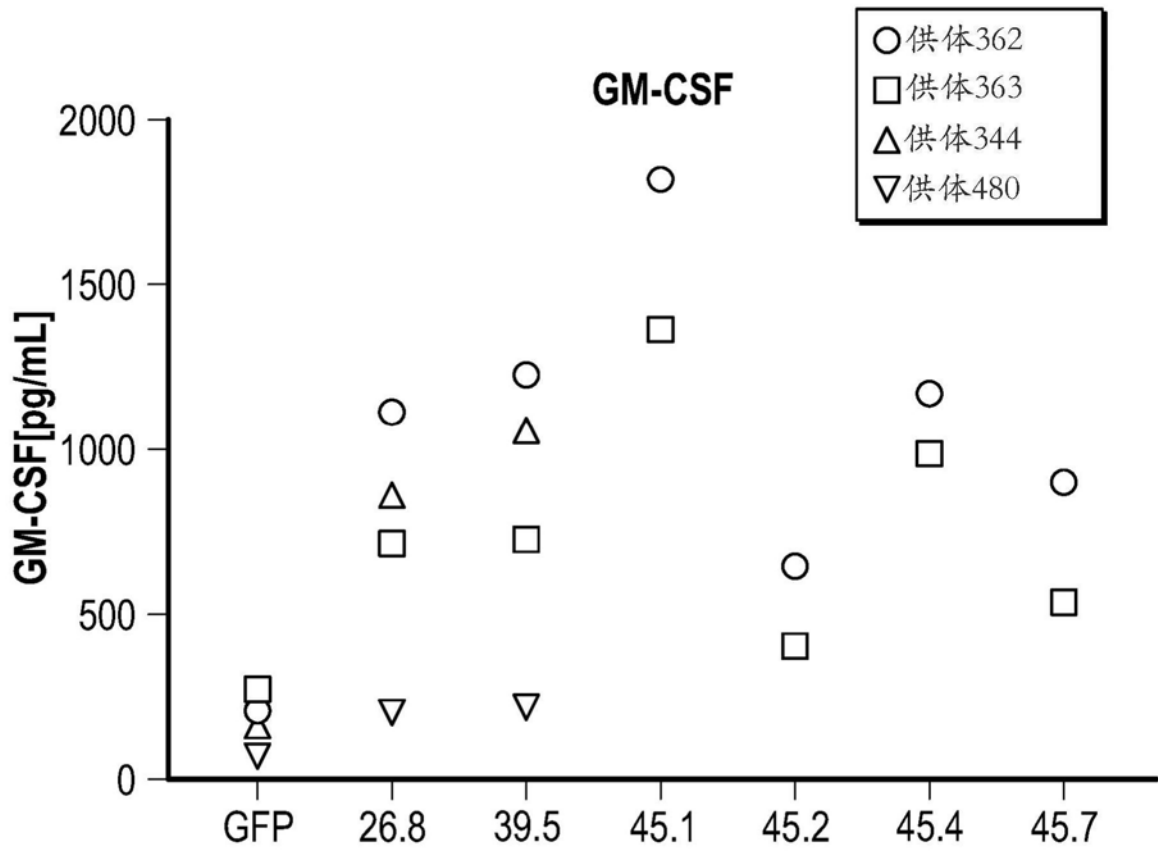


图26C

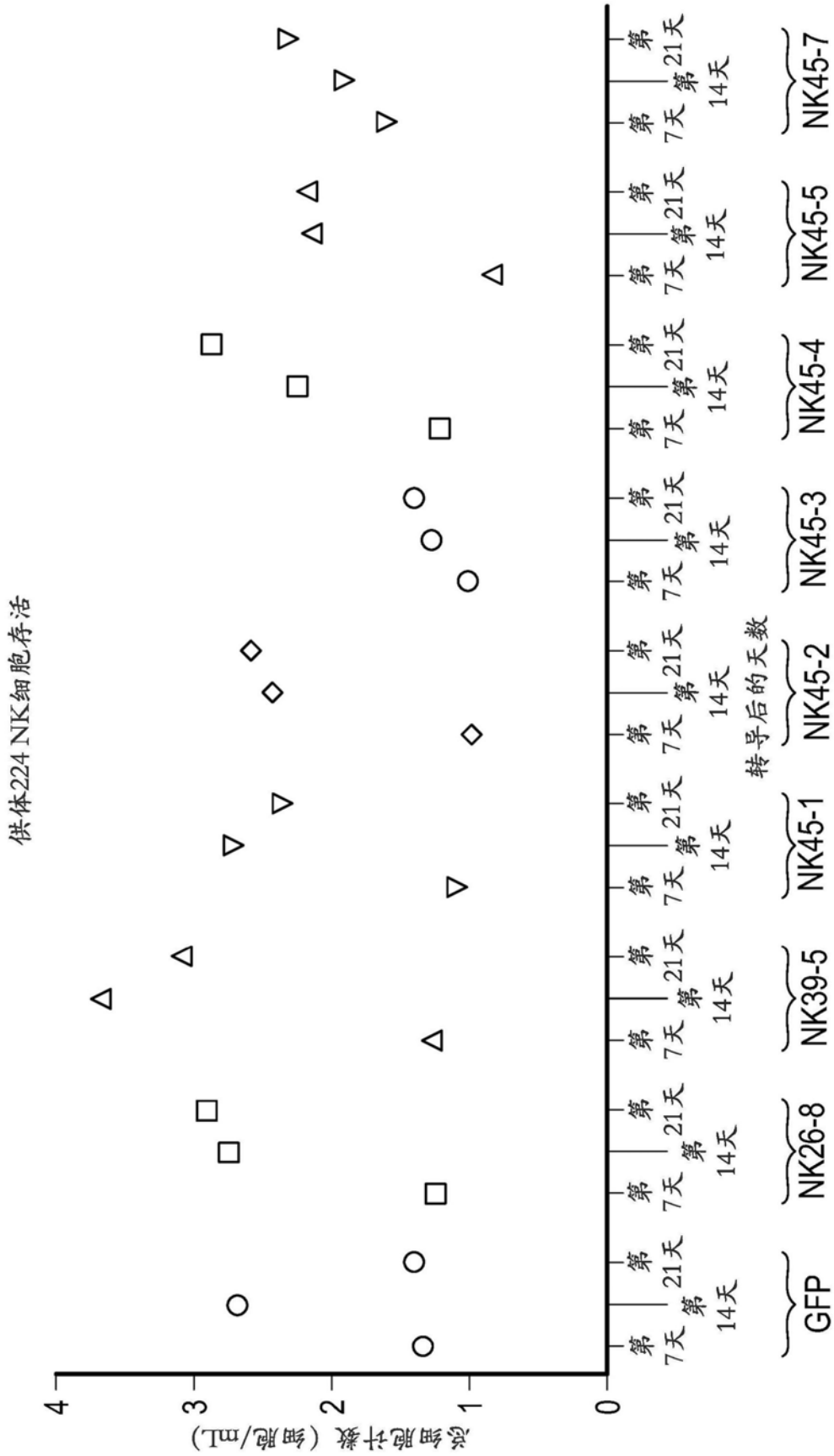


图27A

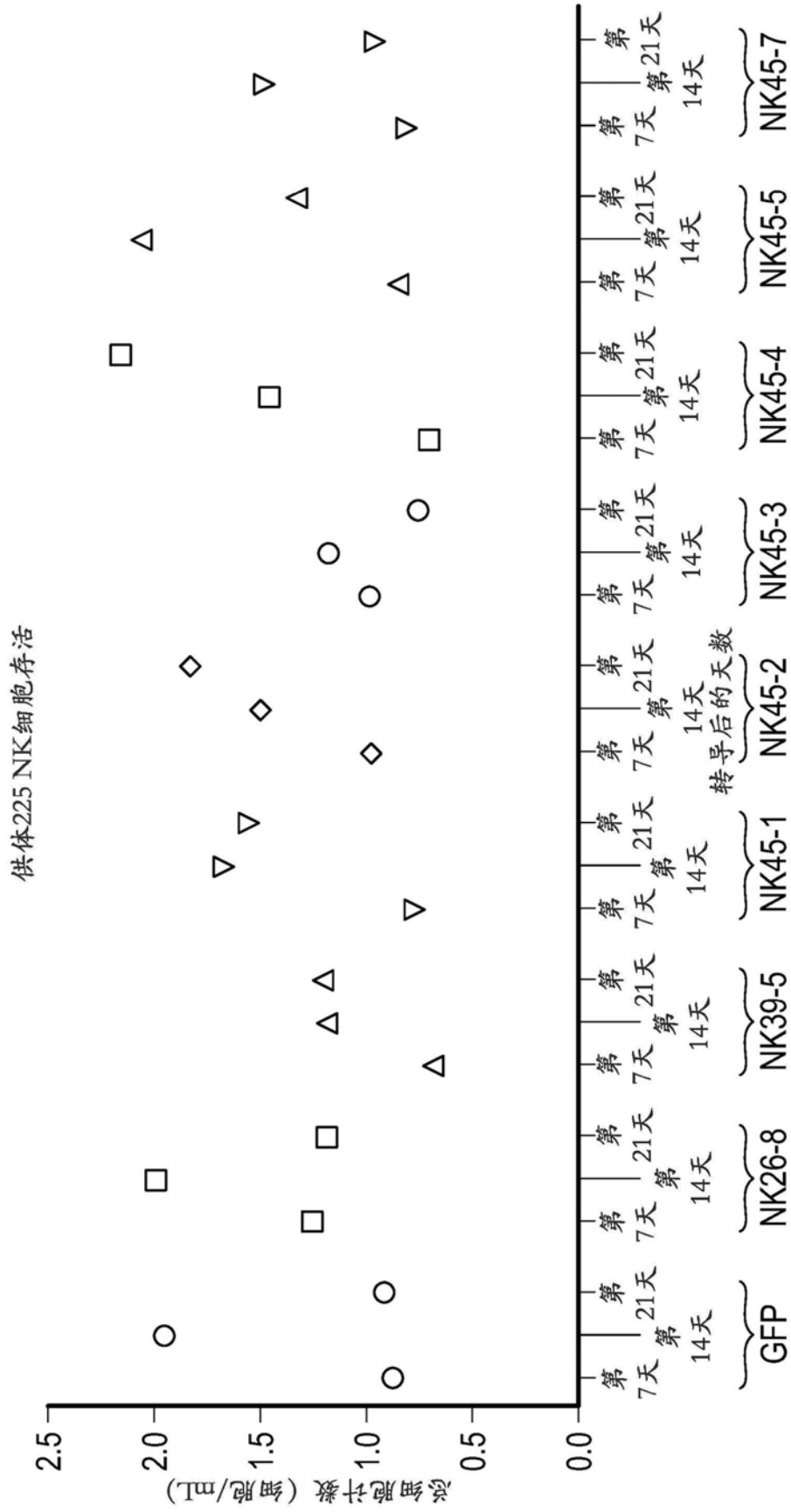


图27B

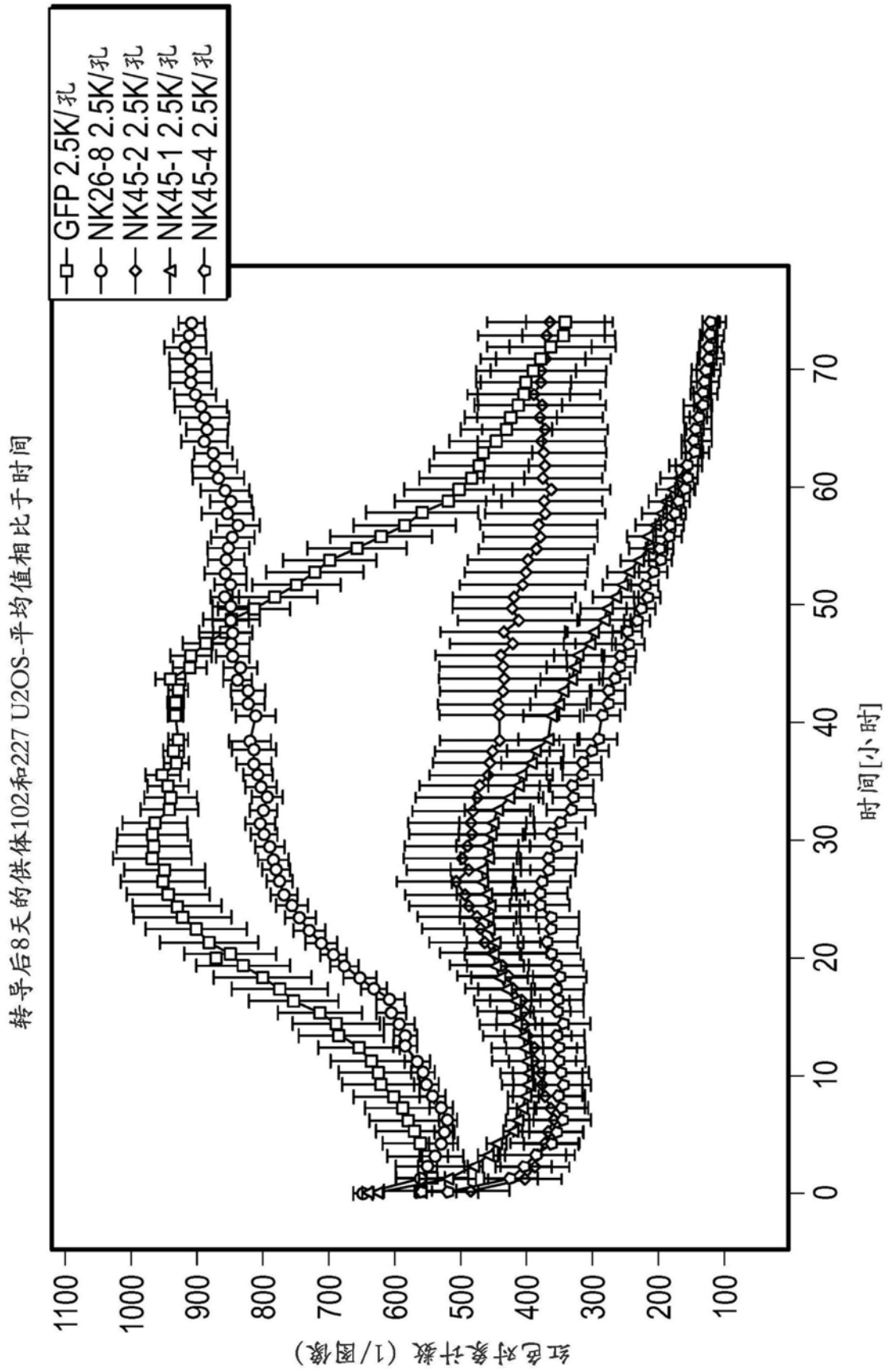


图28A

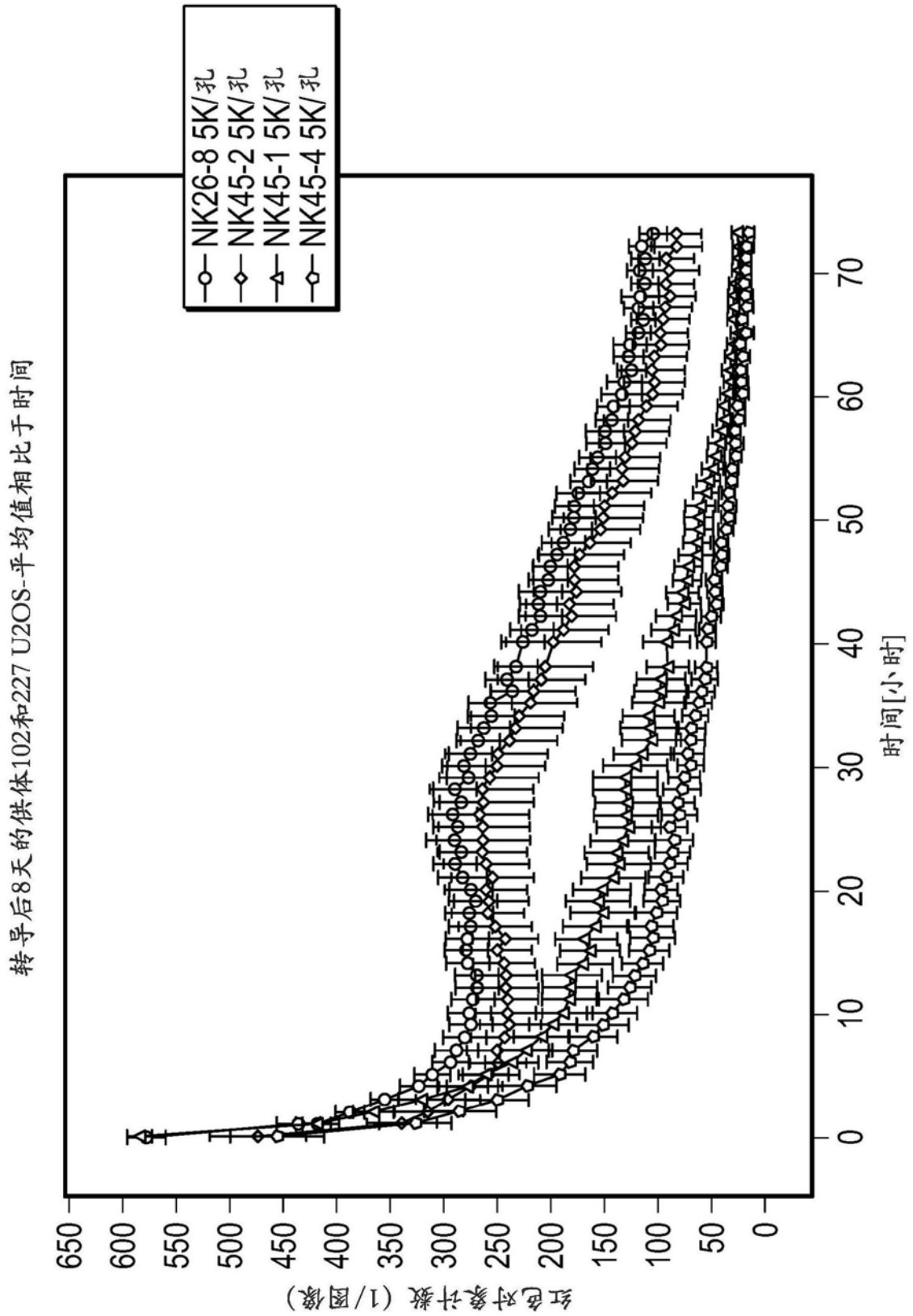


图28B