



## (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110267666 A

(43)申请公布日 2019. 09. 20

(21)申请号 201780079696.3

(22)申请日 2017.12.21

(30)优先权数据

62/438106 2016.12.22 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019.06.21

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2017/067830 2017.12.21

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/119198 EN 2018.06.28

(71)申请人 温德弥尔治疗公司

地址 美国马里兰州

(72)发明人 K.A.努南 E.R.卢茨 I.博雷洛

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

代理人 初明明 黄希贵

(51)Int.Cl.

A61K 35/17(2006.01)

A61K 35/13(2006.01)

A61K 39/00(2006.01)

权利要求书2页 说明书19页  
序列表21页

(54)发明名称

用于调节免疫系统的组合物和方法

(57)摘要

本文提供的实施方案涉及与可用于调节受试者免疫系统和例如治疗癌症的嵌合蛋白有关的组合物和方法。

1. 一种蛋白质,其包含:  
PD-1的胞外结构域;  
跨膜结构域,其选自:4-1BB跨膜结构域、CD28跨膜结构域、CD27跨膜结构域和ICOS跨膜结构域;和  
胞内信号转导结构域,其选自:4-1BB胞内信号转导结构域、CD28胞内信号转导结构域、CD27胞内信号转导结构域和ICOS胞内信号转导结构域,及其任何组合。
2. 权利要求1的蛋白质,其中跨膜结构域是4-1BB跨膜结构域。
3. 权利要求2的蛋白质,其中胞内信号转导结构域选自:4-1BB胞内信号转导结构域、CD28胞内信号转导结构域、CD27胞内信号转导结构域和ICOS胞内信号转导结构域。
4. 权利要求2的蛋白质,其中胞内信号转导结构域是4-1BB的胞内结构域和选自CD28胞内信号转导结构域、CD27胞内信号转导结构域和ICOS胞内信号转导结构域的胞内结构域。
5. 权利要求1的蛋白质,其中跨膜结构域是CD28跨膜结构域。
6. 权利要求5的蛋白质,其中胞内信号转导结构域选自:4-1BB跨膜结构域、CD28跨膜结构域、CD27跨膜结构域和ICOS跨膜结构域。
7. 权利要求5的蛋白质,其中胞内信号转导结构域是4-1BB的胞内结构域和选自CD28胞内信号转导结构域、CD27胞内信号转导结构域和ICOS胞内信号转导结构域的胞内结构域。
8. 权利要求1的蛋白质,其中跨膜结构域是CD27跨膜结构域。
9. 权利要求8的蛋白质,其中胞内信号转导结构域选自:4-1BB胞内信号转导结构域、CD28胞内信号转导结构域、CD27胞内信号转导结构域和ICOS胞内信号转导结构域。
10. 权利要求8的蛋白质,其中胞内信号转导结构域是4-1BB的胞内结构域和选自CD28胞内信号转导结构域、CD27胞内信号转导结构域和ICOS胞内信号转导结构域的胞内结构域。
11. 权利要求1的蛋白质,其中跨膜结构域是ICOS跨膜结构域。
12. 权利要求11的蛋白质,其中胞内信号转导结构域选自:4-1BB胞内信号转导结构域、CD28胞内信号转导结构域、CD27胞内信号转导结构域和ICOS胞内信号转导结构域。
13. 权利要求11的蛋白质,其中胞内信号转导结构域是4-1BB的胞内结构域和选自CD28胞内信号转导结构域、CD27胞内信号转导结构域和ICOS胞内信号转导结构域的胞内结构域。
14. 权利要求1的蛋白质,其中蛋白质包含SEQ ID NO: 21、23、25、27、29或31的序列。
15. 权利要求1-14的任一项的蛋白质,其中蛋白质包含前导序列。
16. 权利要求15的蛋白质,其中蛋白质包含CD8前导序列。
17. 权利要求16的蛋白质,其中CD8前导序列包含SEQ ID NO: 1。
18. 一种编码任一项前述权利要求的蛋白质的核酸分子。
19. 一种包含SEQ ID NO: 22、24、26、28、30或32的序列的核酸分子。
20. 权利要求19的核酸分子,其还包含由SEQ ID NO: 2编码的前导序列。
21. 一种重组细胞,其包含权利要求19或20的核酸分子。
22. 一种重组细胞,其包含权利要求18的核酸分子。
23. 一种重组细胞,其包含权利要求1-17的任一项的蛋白质。
24. 权利要求21或22的细胞,其中所述细胞是淋巴细胞或T细胞。

25. 权利要求21或22的细胞,其中所述细胞是肿瘤浸润淋巴细胞(“TIL”)。
26. 权利要求21或22的细胞,其中所述细胞是骨髓浸润淋巴细胞(“MIL”)。
27. 权利要求26的细胞,其中MIL是低氧性MIL。
28. 一种制备重组细胞的方法,其包括用编码权利要求1-17的任一项的蛋白质的核酸分子转染或感染细胞。
29. 权利要求28的方法,其中所述细胞是MIL。
30. 权利要求28或29的方法,其还包括在用编码所述蛋白质的核酸分子转染或感染细胞之前,在低氧条件下培养MIL。
31. 权利要求30的方法,其中低氧条件包括约0.5%-约5%氧气。
32. 权利要求30的方法,其中低氧条件包括约1%-约2%氧气。
33. 权利要求30-32的任一项的方法,其还包括在低氧培养后在常氧条件下培养细胞。
34. 权利要求28-33的任一项的方法,其还包括使细胞与抗-CD3/抗-CD28珠接触。
35. 一种增强受试者的免疫反应的方法,其包括给予受试者权利要求21-27的任一项的重组细胞。
36. 权利要求35的方法,其还包括制备重组细胞,其中制备重组细胞包括用编码所述蛋白质的核酸转染细胞。
37. 权利要求35的方法,其还包括从受试者分离细胞。
38. 权利要求35的方法,其中受试者患有肿瘤。
39. 权利要求35的方法,其中肿瘤是白血病、淋巴瘤或多发性骨髓瘤。
40. 权利要求35的方法,其中受试者是人。
41. 一种治疗受试者的肿瘤的方法,其包括给予受试者权利要求21-27的任一项的重组细胞。
42. 权利要求41的方法,其还包括制备重组细胞,其中制备重组细胞包括用编码嵌合跨膜蛋白的核酸转染细胞。
43. 权利要求41的方法,其还包括从受试者分离细胞。
44. 权利要求41的方法,其中受试者患有肿瘤。
45. 权利要求44的方法,其中肿瘤是多发性骨髓瘤、白血病或淋巴瘤。
46. 权利要求41的方法,其中受试者是人。
47. 权利要求41的方法,其还包括在给予细胞至受试者之前:  
使细胞与抗-CD3/抗-CD28珠接触;  
在低氧条件下培养细胞;和  
在常氧条件下培养细胞。
48. 权利要求47的方法,其中所述细胞在低氧条件下培养约0.5-约4天。
49. 权利要求47的方法,其中所述细胞在常氧条件下培养约0.5-约4天。

## 用于调节免疫系统的组合物和方法

### [0001] 相关申请的交叉参照

本申请要求2016年12月22日提交的美国临时申请号62/438106的优先权,其通过引用以其整体并入本文。

### [0002] 背景

有多种组合物和方法来操纵免疫系统以治疗癌症。然而,仍然需要改进的组合物和方法来治疗癌症。本公开的主题满足了这些需求和对于本领域的技术人员来说是明显的其它需求。

### [0003] 概述

本文公开的实施方案提供了蛋白质,其包含PD-1的胞外结构域;跨膜结构域,其选自4-1BB跨膜结构域、CD28跨膜结构域、CD27跨膜结构域和ICOS跨膜结构域;和胞内信号转导结构域,其选自4-1BB胞内信号转导结构域、CD28胞内信号转导结构域、CD27胞内信号转导结构域和ICOS胞内信号转导结构域,及其任何组合。

[0004] 本文公开的实施方案还提供编码本文提供的蛋白质的核酸分子。

[0005] 在某些实施方案中,提供了包含本文描述的蛋白质或核酸分子的重组细胞。

[0006] 在某些实施方案中,提供了制备重组细胞的方法。

[0007] 还提供了用于增加免疫反应或治疗肿瘤的实施方案。

### [0008] 详细描述

如本文所用的,术语例如“一”、“一个”和“该”包括单数和复数指代,除非文中另外清楚地要求。

[0009] 如本文所用的,术语“包含”、“具有”、“含有”和“包括”及其变化,如本文所用的,意指“包括但不限于”。虽然各种组合物和方法根据“包括”各种组分或步骤(解释为意指“包括但不限于”)来描述,但组合物、方法和设备也可以“基本上由各种组分和步骤组成”或“由各种组分和步骤组成”,这样的术语应解释为定义本质上封闭的成员组。

[0010] 如本文所用的,术语“治疗(treat)”、“治疗(treated)”或“治疗(treating)”均指其中目的是减缓(减轻)不需要的生理状况、紊乱或疾病,或取得有益或需要的临床结果的治疗性治疗。对于本文描述的实施方案的目的,有益或需要的临床结果包括但不限于症状的减轻;病症、紊乱或疾病的程度的减小;病症、紊乱或疾病状况的稳定(即,不恶化);病症、紊乱或疾病进展的发病延迟或减缓;病症、紊乱或疾病状态的改善或缓解(不管是部分或全部),不管是否可检测到;至少一个可测量的身体参数的改善,患者不必然能分辨;或病症、紊乱或疾病的改进或改善。因此,“癌症的治疗”或“治疗癌症”意指缓解或改善与癌症或本文所述的任何其它病症有关的任何主要现象或继发症状的活动。在某些实施方案中,正在治疗的癌症是本文叙述的癌症之一。

[0011] 如本文所用的,术语“自体的”可以用来指源自相同个体的任何材料,这些材料后来又被重新引入到该个体中。

[0012] “同种异体的”是指源自同一物种的不同动物的移植物。

[0013] “异种的”是指源自不同物种的动物的移植物。

[0014] 如本文所用的术语“癌症”被定义为以异常细胞的快速和不受控制的生长为特征的疾病。癌细胞可以局部传播或通过血流和淋巴系统向身体的其它部分传播。各种癌症的例子包括但不限于乳腺癌、前列腺癌、卵巢癌、子宫颈癌、皮肤癌、胰腺癌、结直肠癌、肾癌、肝癌、脑癌、淋巴瘤、白血病、多发性骨髓瘤、肺癌等。癌症的例子还包括但不限于癌、淋巴瘤、母细胞瘤、肉瘤和白血病或淋巴样恶性肿瘤。这样的癌症的更多的例子包括肾(kidney或renal)癌、乳腺癌、结肠癌、直肠癌、结直肠癌、肺癌(包括小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺的腺癌和肺的鳞癌)、鳞状细胞癌(如上皮鳞状细胞癌)、子宫颈癌、卵巢癌、前列腺癌、肝癌、膀胱癌、腹膜癌、肝细胞癌、胃(gastric或stomach)癌(包括胃肠癌)、胃肠道间质瘤(GIST)、胰腺癌、头颈癌、胶质母细胞瘤、视网膜母细胞瘤、星形细胞瘤、泡膜细胞瘤、男性细胞瘤、肝细胞瘤、血液恶性肿瘤(包括非霍奇金淋巴瘤(NHL)、多发性骨髓瘤和急性血液恶性肿瘤)、子宫内膜或子宫癌、子宫内膜异位症、纤维肉瘤、绒毛膜癌、涎腺癌、外阴癌、甲状腺癌、食管癌、肝癌、肛门癌、阴茎癌、鼻咽癌、喉癌、卡波西肉瘤、黑色素瘤、皮肤癌、神经鞘瘤、少突胶质细胞瘤、神经母细胞瘤、横纹肌肉瘤、骨肉瘤、平滑肌肉瘤、尿路癌、甲状腺癌、维尔姆斯瘤以及B-细胞淋巴瘤(包括低级/滤泡性非霍奇金淋巴瘤(NHL);小淋巴细胞(SL) NHL;中级/滤泡性NHL;中级弥漫性NHL;高级免疫母细胞性NHL;高级淋巴母细胞性NHL;高级无分裂小细胞NHL;巨大肿块性(bulky disease) NHL;套细胞淋巴瘤;AIDS-相关淋巴瘤;和瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症);慢性淋巴细胞白血病(CLL);急性成淋巴细胞白血病(ALL);毛细胞白血病、慢性骨髓细胞性白血病;和移植后淋巴增生性疾病(PTLD),以及与癰疽病、水肿(例如与脑肿瘤相关的水肿)和梅格斯氏综合征相关的异常血管增生。如本文所用的,“肿瘤”是指所有赘生性细胞的生长和增殖,无论是恶性的还是良性的,以及所有癌前和癌性细胞和组织。

[0015] “有效量”或“治疗有效量”在此可互换使用,并指如本文所述可有效地达到特定生物学效果的化合物、制剂、材料或组合物的量。这样的结果可包括,但不限于通过本领域合适的任何方式确定的病毒感染的抑制。

[0016] “表达载体”是指包含重组多核苷酸的载体,该重组多核苷酸包含可操作地连接到要表达的核苷酸序列的表达控制序列。表达载体可包含用于表达的足够的顺式作用元件;其它用于表达的元件可由宿主细胞或体外表达系统提供。表达载体包括本领域已知的所有表达载体,如粘粒、质粒(例如,裸的或包含在脂质体中)和病毒(例如,慢病毒、逆转录病毒、腺病毒和腺相关病毒),它们包含重组多核苷酸。

[0017] 除非另有规定,“编码氨基酸序列的核苷酸序列”包括彼此简并版本并编码相同的氨基酸序列的所有核苷酸序列。短语编码蛋白质或RNA的核苷酸序列也可以包括内含子,在某种程度上编码该蛋白质的核苷酸序列在某些版本中可含有内含子。在某些实施方案中,核苷酸序列不包含内含子,仅包含编码序列。

[0018] 如本文所用的“慢病毒”是指逆转录病毒科的一个属。慢病毒是唯一能够感染非分裂细胞的逆转录病毒,它们可以将大量的遗传信息传递到宿主细胞的DNA中,因此它们是基因传递载体的最有效的方法之一。HIV、SIV和FIV都是慢病毒的例子。源自慢病毒的载体可以在体内达到显著的基因转移水平。

[0019] 术语“可操作地连接”指调节序列和异源核酸序列之间的功能连接,导致后者的表达。例如,当第一核酸序列与第二核酸序列处于功能关系中时,第一核酸序列与第二核酸序

列可操作地连接。例如,如果启动子影响编码序列的转录或表达,则启动子可操作地连接到编码序列。在某些实施方案中,可操作地连接的DNA序列是连续的,和在必要时在相同的阅读框中连接两个蛋白编码区。

[0020] 如本文所用的术语“多核苷酸”被定义为核苷酸链。此外,核酸是核苷酸的聚合物。因此,如本文所用的核酸和多核苷酸是可互换的。本领域技术人员具有这样的常识,即核酸是可以被水解成单体“核苷酸”的多核苷酸。单体核苷酸可以被水解成核苷。如本文所用的多核苷酸包括,但不限于所有的核酸序列,其通过本领域的任何可利用的方法获得,包括(但不限于)重组方法,即利用普通克隆技术和PCRTM等从重组文库或细胞基因组中克隆核酸序列,以及通过合成方法。

[0021] 如本文所用的,术语“肽”、“多肽”和“蛋白质”可互换使用,指由通过肽键共价连接的氨基酸残基组成的化合物。蛋白质或肽必须包含至少两个氨基酸,并且不限制可构成蛋白质或肽序列的最大氨基酸数。多肽包括包含由两个或更多个通过肽键彼此连接在一起的氨基酸的任何肽或蛋白质。如本文所用的,该术语既指短链(例如其在本领域也常被称为肽、寡肽和寡聚体),也指较长的链(其在本领域常被称为蛋白质),其有多种类型。“多肽”包括,例如,生物活性片段、基本同源的多肽、寡肽、同源二聚体、异二聚体、多肽变体、修饰的多肽、衍生物、类似物、融合蛋白等。多肽包括天然肽、重组肽、合成肽或其组合。

[0022] 如本文所用的术语“启动子”被定义为由细胞的合成机器或为启动多核苷酸序列的特定转录所需而引入的合成机器识别的DNA序列。

[0023] 如本文所用的,术语“启动子/调控序列”意指表达可操作地连接启动子/调控序列的基因产物所必需的核酸序列。在某些情况下,这个序列可能是核心启动子序列,而在其它情况下,这个序列也可能包含增强子序列和基因产物表达所需的其它调节元件。启动子/调控序列例如可能是以组织特异性方式表达基因产物的序列。

[0024] “组成型”启动子是一种核苷酸序列,当它与编码或指定基因产物的多核苷酸可操作地连接时,使得该基因产物在细胞的大部分或全部生理条件下在细胞内产生。

[0025] “诱导型”启动子是一种核苷酸序列,当与编码或指定基因产物的多核苷酸可操作地连接时,基本上只有在细胞中存在与启动子相对应的诱导剂时,才使该基因产物在细胞中产生。

[0026] “组织-特异性”启动子是一种核苷酸序列,当它与编码基因或由基因指定的多核苷酸可操作地连接时,基本上只有当该细胞是与该启动子对应的组织类型的细胞时,才使该基因产物在细胞中产生。

[0027] 如本文所用的,“基本上纯化的”细胞是基本上不含其它细胞类型的细胞。基本上纯化的细胞也指从通常与其天然存在状态相关的其它细胞类型中分离出来的细胞。在某些情况下,基本上纯化的细胞群指的是同质细胞群。在其它情况下,这个术语仅仅是指从其自然状态下与其自然相关联的细胞中分离出来的细胞。在某些实施方案中,这些细胞在体外培养。在其它实施方案中,这些细胞不在体外培养。

[0028] 如本文所用的术语“转染”或“转化”或“转导”是指外源性核酸被转移或导入宿主细胞的过程。“转染”或“转化”或“转导”的细胞是已用外源性核酸转染、转化或转导的细胞。所述细胞包括受试者原代细胞及其子代。

[0029] 如本文所用的短语“在转录调控下”或“可操作地连接”意指启动子相对于多核苷

酸处于正确的位置和方向,以控制RNA聚合酶的转录启动和多核苷酸的表达。

[0030] “载体”是一种物质组合物,其含有分离的核酸,并且可用于将分离的核酸递送到细胞内部。许多载体是本领域已知的,包括但不限于,线性多核苷酸、与离子或两亲性化合物相关的多核苷酸、质粒和病毒。因此,术语“载体”包括自主复制的质粒或病毒。该术语还应解释为包括非质粒和非病毒化合物,这些化合物有助于将核酸转移到细胞中,例如,多聚赖氨酸化合物、脂质体等。病毒性载体的例子包括,但不限于腺病毒载体、腺相关病毒载体、逆转录病毒载体等。

[0031] 范围:在整个本公开内容中,各种实施方案可以以范围格式来呈现。应该理解,范围格式的描述只是为了方便和简洁,而不应被解释为对本发明范围的硬性限制。因此,对范围的描述应被视为具体地公开了所有可能的子范围以及该范围内的单个数值。例如,对范围的描述,例如从1到6应视为具体公开了子范围,例如从1到3,从1到4,从1到5,从2到4,从2到6,从3到6等,以及该范围内的单个数字,例如1、2、2.7、3、4、5、5.3和6。无论范围的宽度如何,这都适用。

[0032] 肿瘤免疫学的一个主要障碍是诱导肿瘤特异性耐受性,这限制了许多基于细胞的方法的内在抗肿瘤效果。最近的研究表明,靶向检查点抑制剂的显著临床疗效,导致批准抗-CTLA-4和抗-PD-1用于转移性黑色素瘤。在某些方面,实施方案涉及嵌合受体,该嵌合受体包含可防止免疫系统失活的蛋白质结构域的胞外结构域表达和激活胞内结构域。这具有将耐受性机制劫持到激活信号中的优点。这种方法可用于所有临床情况,其中T细胞无反应是疾病发病机理的主要方面,并且其中抗原特异性由内源性T细胞库提供。

[0033] 在某些方面,实施方案涉及嵌合跨膜蛋白,包括抑制性受体的胞外结构域、跨膜结构域和胞内信号转导结构域。在某些实施方案中,胞内信号转导结构域可以激活免疫反应。胞内信号转导结构域可包括胞内信号转导蛋白的一部分。在某些实施方案中,胞内结构域可用于维持细胞,例如T-细胞的激活。

[0034] 在某些实施方案中,胞外结构域可以将信号转导到胞内信号转导结构域。例如,胞外结构域可在与天然抑制性受体的激动剂结合后向胞内信号转导结构域转导信号。

[0035] 信号转导可包括蛋白质的寡聚化。寡聚化可以包括同源寡聚化或异源寡聚化。寡聚化可以包括蛋白质的二聚化,即与第二嵌合跨膜蛋白的同源二聚化或与不同蛋白的异源二聚化。

[0036] 信号转导可包括磷酸化。例如,胞内信号转导结构域可包括激酶活性和/或磷酸化位点。信号转导可包括自磷酸化,例如胞内信号转导结构域的自磷酸化。

[0037] 在某些实施方案中,受体,其也可称为“开关受体”,包含本文描述的氨基酸序列。在某些实施方案中,受体由本文描述的核酸序列编码。

[0038] 在某些实施方案中,受体包含CD8前导肽、PD-1胞外结构域、4-1BB跨膜结构域和4-1BB胞内结构域。在某些实施方案中,前导肽在细胞内蛋白质的加工过程中被切割,留下包含PD-1胞外结构域、4-1BB跨膜结构域和4-1BB胞内结构域的受体。在某些实施方案中,结构域包含如本文和下文所述的氨基酸序列。

[0039] 在某些实施方案中,受体包含CD8前导肽、PD-1胞外结构域、CD28跨膜结构域和CD28胞内结构域。在某些实施方案中,前导肽在细胞内蛋白质的加工过程中被切割,留下包含PD-1胞外结构域、CD28跨膜结构域和CD28胞内结构域的受体。在某些实施方案中,结构域

包含如本文和下文所述的氨基酸序列。

[0040] 在某些实施方案中,受体包含CD8前导肽、PD-1胞外结构域、CD28跨膜结构域、CD28胞内结构域和4-1BB胞内结构域。在某些实施方案中,前导肽在细胞内蛋白质的加工过程中被切割,留下包含PD-1胞外结构域、CD28跨膜结构域、CD28胞内结构域和4-1BB胞内结构域的受体。在某些实施方案中,结构域包含如本文和下文所述的氨基酸序列。

[0041] 在某些实施方案中,受体包含CD8前导肽、PD-1胞外结构域、CD27跨膜结构域和CD27胞内结构域。在某些实施方案中,前导肽在细胞内蛋白质的加工过程中被切割,留下包含PD-1胞外结构域、CD27跨膜结构域和CD27胞内结构域的受体。在某些实施方案中,结构域包含如本文和下文所述的氨基酸序列。

[0042] 在某些实施方案中,受体包含CD8前导肽、PD-1胞外结构域、CD27跨膜结构域、CD27胞内结构域和4-1BB胞内结构域。在某些实施方案中,前导肽在细胞内蛋白质的加工过程中被切割,留下包含PD-1胞外结构域、CD27跨膜结构域、CD27胞内结构域和4-1BB胞内结构域的受体。在某些实施方案中,结构域包含如本文和下文所述的氨基酸序列。

[0043] 在某些实施方案中,受体包含CD8前导肽、PD-1胞外结构域、ICOS跨膜结构域和ICOS胞内结构域。在某些实施方案中,前导肽在细胞内蛋白质的加工过程中被切割,留下包含PD-1胞外结构域、ICOS跨膜结构域和ICOS胞内结构域的受体。在某些实施方案中,结构域包含如本文和下文所述的氨基酸序列。

[0044] 在某些实施方案中,胞外结构域是抑制性受体的胞外结构域。在某些实施方案中,胞外结构域包括配体-结合结构域,例如抑制性受体的激动剂-结合结构域。在某些实施方案中,胞外结构域包括足够的结构,以在响应配体结合时跨膜转导信号。不受任何特定理论的束缚,对于通过由多价配体介导的寡聚化转导信号的抑制性受体来说,仅仅配体-结合结构域的存在可能是在响应配体结合时使信号跨膜转导的足够结构。不受任何特定理论的束缚,对于通过改变跨膜结构域相对于细胞膜的朝向来转导信号的抑制性受体,胞外结构域可能需要配体-结合结构域和跨膜结构域之间的天然结构,以在响应配体结合时跨膜传导信号。例如,胞外结构域可能包括从配体-结合结构域到跨膜结构域的抑制性受体的天然序列。

[0045] 天然抑制性受体可以是人抑制性受体或小鼠抑制性受体。因此,胞外结构域可包含人或小鼠氨基酸序列。在某些实施方案中,选择天然抑制性受体的来源来匹配正接受治疗的受试者的种类,例如以避免对嵌合跨膜蛋白的免疫反应。然而,例如,为了方便起见,可以从不同的种类中选择天然的抑制性受体。因此,相对于表达蛋白质的细胞种类或给予蛋白质的受试者,嵌合蛋白可能是异种来源的,也可能不是异种来源的。

[0046] 在某些实施方案中,天然抑制性受体选自在结合天然激动剂时降低免疫活性的蛋白质。例如,在结合天然激动剂时,天然抑制性受体可减少T细胞增殖、T细胞生存、细胞因子分泌或免疫溶胞活性。天然抑制性受体可以是淋巴细胞抑制性受体(即,抑制性受体可以在淋巴细胞,例如T细胞上表达)。例如,天然抑制性受体可以在T细胞上表达,并且激动剂与天然抑制性受体的结合可能导致不利于T细胞增殖、T细胞存活、细胞因子分泌或免疫溶胞活性的细胞信号转导。

[0047] 在某些实施方案中,天然抑制性受体可以是CTLA-4(细胞毒性T-淋巴细胞-相关蛋白4;CD152)、PD-1(程序性细胞死亡蛋白1;CD279)、LAG-3(淋巴细胞-活化基因3;

CD223),或Tim-3 (T细胞免疫球蛋白粘蛋白-3)。因此,在某些实施方案中,胞外结构域可以是来自CTLA-4、PD-1、LAG-3或Tim-3的胞外结构域。抑制性受体可以是PD-1。在某些实施方案中,跨膜蛋白包含PD-1的胞外结构域。在某些实施方案中,胞外结构域的序列包含如本文描述的PD-1结构域。

[0048] 在某些实施方案中,胞内信号转导结构域是胞内信号转导蛋白的信号转导结构域。在某些实施方案中,胞内信号转导结构域可包括激酶活性或磷酸化位点。在某些实施方案中,例如在跨细胞膜的信号转导后,胞内信号转导结构域可激活信号转导分子,例如激酶或磷酸化酶。胞内信号转导结构域可通过下游激酶或磷酸化酶传导信号。

[0049] 胞内信号转导蛋白可以是人蛋白质或小鼠蛋白质。因此,胞内信号转导结构域可包含人或小鼠氨基酸序列。在某些实施方案中,选择胞内信号转导蛋白以匹配受试者和正用于治疗细胞的种类,例如以使信号转导结构域可以利用细胞的胞质机器激活下游信号转导分子。然而,例如为了方便起见,例如上文所述,胞内信号转导蛋白可选自不同的种类。

[0050] 在某些实施方案中,胞内信号转导蛋白增加免疫活性。因此,通过嵌合跨膜蛋白的信号转导可以导致增加免疫活性的信号级联,其中胞内信号转导结构域介导细胞内信号转导级联。在某些实施方案中,胞内信号转导蛋白可促进T细胞增殖、T细胞存活、细胞因子分泌或免疫溶胞活性。在某些实施方案中,胞内信号转导蛋白是跨膜蛋白,或胞内信号转导蛋白可结合天然跨膜蛋白。胞内信号转导蛋白可以是淋巴细胞蛋白(即,胞内信号转导蛋白可以在淋巴细胞,例如T细胞上表达)。

[0051] 在某些实施方案中,胞内信号转导蛋白是CD3 $\zeta$  (T-细胞表面糖蛋白CD3  $\zeta$ 链; CD247)、4-1BB (肿瘤坏死因子受体超家族成员9;CD137)或CD28 (T-细胞-特异性表面糖蛋白CD28; Tp44)。因此,胞内信号转导蛋白可包含来自CD3 $\zeta$ 、4-1BB或CD28的信号转导结构域。胞内信号转导蛋白可以是4-1BB。因此,胞内信号转导蛋白可包含来自4-1BB的信号转导结构域。在某些实施方案中,胞内结构域包含本文描述的胞内结构域。

[0052] 在某些实施方案中,嵌合跨膜蛋白包含自杀结构域,即杀死包含所述蛋白的重组细胞。自杀结构域可包含胸苷激酶活性或胱天蛋白酶活性。例如,自杀结构域可以是胸苷激酶或胱天蛋白酶。在某些实施方案中,自杀结构域是HSV胸苷激酶(“HSV-TK”)的胸苷激酶结构域,或自杀结构域包含胱天蛋白酶9的部分。

序列名称	氨基酸序列	核苷酸序列
CD 前导肽	MALPVTALLL PLALLLHAAR P (SEQ ID NO: 1)	ATGGCCCTGCCCCGTGACCGCCCTGCTCCTGCCTCTGGCTCTGCT GCTGCATGCCGCCAGACCT (SEQ ID NO: 2)
PD-1 胞外结构域	PGWFLDSPDR PWNPTTFSPA LLVTEGDNA TFTCSFSNTS ESFVLNWYRM SPSNQTDKLA AFPEDRSQPG QDCRFRTQL PNGRDFHMSV VRARRNDSGT YLCGAISLAP KAQIKESLRA ELRVTERRAE VPTAHPSPSP RPAGQFQTLV (SEQ ID NO: 3)	CCCGGCTGGTTCCTGGACAGCCCCGACAGACCCTGGAACCCTCC CACCTTCAGCCCTGCCCTGCTCGTGGTGACAGAGGGCGACAACG CCACCTTCACCTGTAGCTTCAGCAACACCAGCGAGAGCTTCGTG CTGAACTGGTACAGAATGAGCCCCAGCAACCAGACCGACAAGCT GGCCGCCTTCCCCGAGGACAGAAGCCAGCCCCGGCCAGGACTGCC GGTTCAGAGTGACCCAGCTGCCCCAACGGCCGGGACTTCCACATG AGCGTGGTGCGCGCCAGACGGAACGACAGCGGCACATACCTGTG CGGCGCCATCAGCCTGGCCCCAAGGCCAGATCAAAGAGAGCC TGCGGGCCGAGCTGAGAGTGACCGAGAGAAGGGCCGAGGTGCC ACCGCCACCCCTAGCCCATCTCCAAGACCTGCCGGCCAGTTCCA GACCCTGGTG (SEQ ID NO: 4)
4-1BB 跨膜结构域	IISFFLALTS TALLFLFFL TLRFSVV (SE Q ID NO: 5)	ATCATCTCATTCTTTCTGGCCCTGACCAGCACAGCCCTGCTGTT TCTGCTGTTCTTCTGACCCTGCGGTTTCAGCGTGGTG (SEQ ID NO: 6)
4-1BB 胞内结构域	KRGRKKLLYI FKQPFMRPVQ TTQEEDGCSC RFPEEEEGGC EL (SEQ ID NO: 7)	AAACGGGGCAGAAAGAAGCTGCTGTACATCTTCAAGCAGCCCTT CATGCGG (SEQ ID NO: 8)
CD28 跨膜结构域	FWVLVVGGV LACYSLLVTV AFIIIFWV (SEQ ID NO: 9)	TTTTGGGTGCTCGTGGTCGTTGGCGGAGTGCTGGCCTGTTATAG CCTGCTGGTCACCGTGGCCTTCATCATCTTTTGGGTC (SEQ ID NO: 10)
CD28 胞内结构域	RSKRSRLHS DYMNTPRRP GPTRKHYPY APPRDFAAYR S (SEQ ID NO: 11)	CGAAGCAAGCGGAGCCGGCTGCTGCACAGCGACTACATGAACAT GACCCCTAGACGGCCCGGACCTACCAGAAAGCACTACCAGCCTT ACGCTCCTCCTAGAGACTTCGCCGCTACAGATCT (SEQ ID NO: 12)
CD27 跨膜结构域	ILVIFSGMFL VFTLAGALFL H (SEQ ID NO: 13)	ATCCTCGTGATCTTCAGCGCATGTTCTTGGTGTTCACACTGGC TGGCGCCCTGTTTCTGCAC (SEQ ID NO: 14)
CD27 胞内结构域	QRRKYRSNKG ESPVEPAEPC RYSCPREEEG STIPIQEDYR KPEPACSP (SEQ ID NO: 15)	CAGCGGAGAAAGTACAGAAGCAACAAGGGCGAGAGCCCCGTGGA ACCTGCCGAGCCTTGATAGATACAGCTGTCCCAGAGAGGAAGAGG GCAGACAATCCCCATCCAAGAGGACTACAGAAAGCCCGAGCCT GCCTGCTCTCCT (SEQ ID NO: 16)

ICOS 跨膜结构域	FWLPICAAAF VVVCILGCIL I (SEQ ID NO: 17)	TTCTGGCTGCCTATCGGCTGTGCCGCTTTTGTGGTCGTGTGCAT CCTGGGCTGCATCCTGATC (SEQ ID NO: 18)
ICOS 胞内结构域	CWLTKKKYSS SVHDPNGEYM FMRAVNTAKK SRLTDVTL (SEQ ID NO: 19)	TGCTGGCTGACCAAGAAAAAGTACAGCAGCAGCGTGCACGACCC CAACGGCGAGTACATGTTTCATGAGAGCCGTGAACACCGCCAAGA AGTCCAGACTGACCGACGTGACCCTT (SEQ ID NO: 20)

[0053] 在某些实施方案中,开关受体包含下表提供的序列:

受体结构域	氨基酸序列	核苷酸序列
PD-1 胞外结构域; 4-1BB 跨膜结构域; 4-1BB 胞内结构域	PGWFLDSPDRPWNPTFSPA LLVVTEGDNATFTCSFSNTS ESFVLNWYRMSPSNQTDKLA AFPEDRSQPGQDCRFRTQL PNGRDFHMSVVRARRNDSGT YLCGAISLAPKAQIKESLRA ELRVTERRAEVPTAHPSPSP RPAGQFQTLVLIISFFLALTS TALLFLFFLTLRFSSVVKRG RKKLLYIFKQPFMRPVQTTQ EEDGCSRFPEEEEGGCEL (SEQ ID NO: 21)	CCCGGCTGGTTCCTGGACAGCCCCGACAGACCCTGGAAC CCTCCACCTTCAGCCCTGCCCTGCTCGTGGTGACAGAG GGCGACAACGCCACCTTCACCTGTAGCTTCAGCAACACC AGCGAGAGCTTCGTGCTGAACTGGTACAGAATGAGCCCC AGCAACCAGACCGACAAGCTGGCCGCCTTCCCCGAGGAC AGAAGCCAGCCCGGCCAGGACTGCCGGTTCAGAGTGACC CAGCTGCCCCAACGGCCGGGACTTCCACATGAGCGTGGTG CGCGCCAGACGGAACGACAGCGGCACATACCTGTGCGGC GCCATCAGCCTGGCCCCCTAAGGCCAGATCAAAGAGAGC CTGCGGGCCGAGCTGAGAGTGACCGAGAGAAGGGCCGAG GTGCCCCACCGCCACCCTAGCCCATCTCCAAGACCTGCC GGCCAGTTCAGACCCTGGTGATCATCTCATTCTTTCTG GCCCTGACCAGCACAGCCCTGCTGTTTCTGCTGTTCTTC CTGACCCTGCGGTTTCAGCGTGGTGAAACGGGGCAGAAAG AAGCTGCTGTACATCTTCAAGCAGCCCTTCATGCGGCCC GTGACAGACCACCGAGGAAGAGACGGCTGCAGCTGCCGG TTCCCCGAAGAAGAAGAGGGCGGCTGCGAACTG (SEQ ID NO: 22)
PD-1 胞外结构域; CD28 跨膜结构域; CD28 胞内结构域	PGWFLDSPDRPWNPTFSPA LLVVTEGDNATFTCSFSNTS ESFVLNWYRMSPSNQTDKLA AFPEDRSQPGQDCRFRTQL PNGRDFHMSVVRARRNDSGT YLCGAISLAPKAQIKESLRA ELRVTERRAEVPTAHPSPSP RPAGQFQTLVFWVLVVG LACYSLVTVAFIIFVVR RSRLHSDYMNMTPRRPGPT RKHYQPYAPPRDFAAYRS (SEQ ID NO: 23)	CCAGGCTGGTTCCTGGACTCTCCGACAGACCTTGAAC CCTCCAACATTAGCCCCGCTCTGCTGGTGGTTACCGAG GGCGATAATGCCACCTTCACCTGTAGCTTCAGCAACACC AGCGAGAGCTTCGTGCTGAACTGGTACAGAATGAGCCCC AGCAACCAGACCGACAAGCTGGCCGCCTTCTCTGAGGAT AGATCTCAGCCCGGCCAGGACTGCCGGTTCAGAGTTACA CAGCTGCCCCAACGGCCGGGACTTCCACATGTCTGTCTG CGGGCCAGAAGAAACGACAGCGGCACATATCTGTGCGGC GCCATTTCTCTGCCCCCTAAGGCTCAGATCAAAGAGAGC CTGAGAGCCGAGCTGAGAGTGACAGAAAGACGGGCCGAA GTGCCCCACAGCTCACCCTTCACCTTCTCCAAGACCTGCC GGCCAGTTTCAGACCCTGGTGTTTTGGGTGCTCGTGCTC GTTGGCGGAGTGCTGGCCTGTTATAGCTGCTGGTCACC GTGGCCTTCATCATCTTTTGGGTCCGAAGCAAGCGGAGC CGGCTGCTGCACAGCGACTACATGAACATGACCCCTAGA CGGCCCCGACCTACCAGAAAGCACTACCAGCCTTACGCT CCTCCTAGAGACTTCGCCGCCTACAGATCT (SEQ ID NO: 24)
PD-1 胞外结构域; CD28 跨膜结构域; CD28 胞内结构域; 4-1BB 胞内结构域	PGWFLDSPDRPWNPTFSPA LLVVTEGDNATFTCSFSNTS ESFVLNWYRMSPSNQTDKLA AFPEDRSQPGQDCRFRTQL PNGRDFHMSVVRARRNDSGT YLCGAISLAPKAQIKESLRA ELRVTERRAEVPTAHPSPSP RPAGQFQTLVFWVLVVG	CCAGGCTGGTTCCTGGACTCTCCGACAGACCTTGAAC CCTCCAACATTAGCCCCGCTCTGCTGGTGGTTACCGAG GGCGATAATGCCACCTTCACCTGTAGCTTCAGCAACACC AGCGAGAGCTTCGTGCTGAACTGGTACAGAATGAGCCCC AGCAACCAGACCGACAAGCTGGCCGCCTTCTCTGAGGAT AGATCTCAGCCCGGCCAGGACTGCCGGTTCAGAGTTACA CAGCTGCCCCAACGGCCGGGACTTCCACATGTCTGTCTG CGGGCCAGAAGAAACGACAGCGGCACATATCTGTGCGGC

	LACYSLLVTVAFIIFWVRSK RSRLHSDYMNMTPRRPGPT RKHYQPYAPPRDFAAYRSKR GRKKLLYIFKQPFMRPVQTT QEEDGCSCRFPEEEEGGCEL (SEQ ID NO: 25)	GCCATTTCTCTGGCCCCCTAAGGCTCAGATCAAAGAGAGC CTGAGAGCCGAGCTGAGAGTGACAGAAAGACGGGCCGAA GTGCCACAGCTCACCTTTCACCTTCTCCAAGACCTGCC GGCCAGTTTTCAGACCCTGGTGTCTTGGGTGCTCGTGGTC GTTGGCGGAGTGCTGGCCTGTTATAGCCTGCTGGTCACC GTGGCCTTCATCATCTTTTGGGTCCGAAGCAAGCGGAGC CGGCTGCTGCACAGCGACTACATGAACATGACCCCTAGA CGGCCCGGACCTACCAGAAAGCACTACCAGCCTTACGCT CCTCCTAGAGACTTCGCCGCTACAGATCCAAGCGGGGC AGAAAGAAGCTGCTGTACATCTTCAAGCAGCCCTTCATG CGGCCCGTGCAGACCACACAAGAGGAAGATGGCTGCTCC TGCAGATTCCCGAGGAAGAAGAGCGGCTGCGAGCTT (SEQ ID NO: 26)
PD-1 胞外结构域; CD27 跨膜结构域; CD27 胞内结构域	PGWFLDSPDRPWNPTFSPA LLVVTEDGNATFTCSFSNTS ESFVLNWYRMSPSNQTDKLA AFPEDRSQPGQDCRFRTQL PNGRDFHMSVVRARRNDSGT YLCGAISLAPKAQIKESLRA ELRVTERRAEVPTAHPSPSP RPAGQFQTLVILVIFSGMFL VFTLAGALFLHQRRKYRSNK GESPVPAEPFCRYSCPREEE GSTIPIQEDYRKPEPACSP (SEQ ID NO: 27)	CCAGGCTGGTTCCTGGACTCTCCCGACAGACCTTGGAAC CCTCCAACATTAGCCCCGCTCTGCTGGTGGTTACCGAG GGCGATAATGCCACCTTACCTGTAGCTTACAGCAACACC AGCGAGAGCTTCGTGCTGAACTGGTACAGAATGAGCCCC AGCAACCAGACCGACAAGCTGGCCGCTTTCTGAGGAT AGATCTCAGCCCGGCCAGGACTGCCGGTTCAGAGTTACA CAGCTGCCCAACGGCCGGGACTTCCACATGTCTGTCTGTC CGGGCCAGAAGAAACGACAGCGGCACATATCTGTGCGGC GCCATTTCTCTGGCCCCCTAAGGCTCAGATCAAAGAGAGC CTGAGAGCCGAGCTGAGAGTGACAGAAAGACGGGCCGAA GTGCCACAGCTCACCTTTCACCTTCTCCAAGACCTGCC GGCCAGTTTTCAGACCCTGGTCATCTCTGTATCTTCAGC GGCATGTTTCTGGTGTTCACACTGGCTGGCGCCCTGTTT CTGCACCAGCGAGAAAGTACAGAAGCAACAAGGGCGAG AGCCCCGTGGAACCTGCCGAGCCTTGTAGATACAGCTGT CCAGAGAGGAAGAGGGCAGCACAATCCCCATCCAAGAG GACTACAGAAAGCCCGAGCCTGCCTGCTCTCCT (SEQ ID NO: 28)
PD-1 胞外结构域; CD27 跨膜结构域; CD27 胞内结构域; 4-1BB 胞内结构域	PGWFLDSPDRPWNPTFSPA LLVVTEDGNATFTCSFSNTS ESFVLNWYRMSPSNQTDKLA AFPEDRSQPGQDCRFRTQL PNGRDFHMSVVRARRNDSGT YLCGAISLAPKAQIKESLRA ELRVTERRAEVPTAHPSPSP RPAGQFQTLVILVIFSGMFL VFTLAGALFLHQRRKYRSNK GESPVPAEPFCRYSCPREEE GSTIPIQEDYRKPEPACSPK RGRKKLLYIFKQPFMRPVQT TQEEDGCSCRFPEEEEGGCE L (SEQ ID NO: 29)	CCAGGCTGGTTCCTGGACTCTCCCGACAGACCTTGGAAC CCTCCAACATTAGCCCCGCTCTGCTGGTGGTTACCGAG GGCGATAATGCCACCTTACCTGTAGCTTACAGCAACACC AGCGAGAGCTTCGTGCTGAACTGGTACAGAATGAGCCCC AGCAACCAGACCGACAAGCTGGCCGCTTTCTGAGGAT AGATCTCAGCCCGGCCAGGACTGCCGGTTCAGAGTTACA CAGCTGCCCAACGGCCGGGACTTCCACATGTCTGTCTGTC CGGGCCAGAAGAAACGACAGCGGCACATATCTGTGCGGC GCCATTTCTCTGGCCCCCTAAGGCTCAGATCAAAGAGAGC CTGAGAGCCGAGCTGAGAGTGACAGAAAGACGGGCCGAA GTGCCACAGCTCACCTTTCACCTTCTCCAAGACCTGCC GGCCAGTTTTCAGACCCTGGTCATCTCTGTATCTTCAGC GGCATGTTTCTGGTGTTCACACTGGCTGGCGCCCTGTTT CTGCACCAGCGAGAAAGTACAGAAGCAACAAGGGCGAG AGCCCCGTGGAACCTGCCGAGCCTTGTAGATACAGCTGT CCCAGAGAGGAAGAGGGCAGCACAATCCCCATCCAAGAG GACTACAGAAAGCCCGAGCCTGCCTGCTCTCCAAGAGA GGCAGAAAGAAGCTGCTGTACATCTTCAAGCAGCCCTTC ATGCGGCCCGTGCAGACCACACAAGAGGAAGATGGCTGC TCCTGCAGATTCCCGAGGAAGAAGAGCGGCTGCGAG CTT (SEQ ID NO: 30)
PD-1 胞外结构域; ICOS 跨膜结构域; ICOS 胞内结构域	PGWFLDSPDRPWNPTFSPA LLVVTEDGNATFTCSFSNTS ESFVLNWYRMSPSNQTDKLA AFPEDRSQPGQDCRFRTQL PNGRDFHMSVVRARRNDSGT YLCGAISLAPKAQIKESLRA ELRVTERRAEVPTAHPSPSP	CCAGGCTGGTTCCTGGACTCTCCCGACAGACCTTGGAAC CCTCCAACATTAGCCCCGCTCTGCTGGTGGTTACCGAG GGCGATAATGCCACCTTACCTGTAGCTTACAGCAACACC AGCGAGAGCTTCGTGCTGAACTGGTACAGAATGAGCCCC AGCAACCAGACCGACAAGCTGGCCGCTTTCTGAGGAT AGATCTCAGCCCGGCCAGGACTGCCGGTTCAGAGTTACA CAGCTGCCCAACGGCCGGGACTTCCACATGTCTGTCTGTC
	RPAGQFQTLVFWLPIGCAAF VVVICILGCILICWLTKKKYS SSVHDPNGEYMFMRVNTAK KSRLTDVTL (SEQ ID NO: 31)	CGGGCCAGAAGAAACGACAGCGGCACATATCTGTGCGGC GCCATTTCTCTGGCCCCCTAAGGCTCAGATCAAAGAGAGC CTGAGAGCCGAGCTGAGAGTGACAGAAAGACGGGCCGAA GTGCCACAGCTCACCTTTCACCTTCTCCAAGACCTGCC GGCCAGTTTTCAGACCCTGGTGTCTGGCTGCCTATCGGC TGTGCCGCTTTTGTGGTGTGTGCATCCTGGGCTGCATC CTGATCTGCTGGCTGACCAAGAAAAAGTACAGCAGCAGC GTGCACGACCCCAACGGCGAGTACATGTTTCATGAGAGCC GTGAACACCGCCAAGAAGTCCAGACTGACCGACGTGACC CTT (SEQ ID NO: 32)

在某些实施方案中,上表提供的受体包含N-末端CD8前导肽序列。在某些实施方案中,前导序列是MALPVTALLPLALLLHAARP (SEQ ID NO: 1)。如果受体包含前导序列,则将其附加到表中序列的N-末端,形成连续序列。前导序列可以被例如,SEQ ID NO: 2的核苷酸序列编码。本文提供的胞内结构域也可称为胞内信号转导结构域。

[0054] 因此,在某些实施方案中,受体包含在下表中提供的序列:

具有 CD8 前导序列的受体结构域	氨基酸序列	核苷酸序列
PD-1 胞外结构域; 4-1BB 跨膜结构域; 4-1BB 胞内结构域	MALPVTALLPLALLLHAAR PPGWFLDSPDRPWNPTFSP ALLVVTEDGNATFTCSFSNT SESFVLNWMSPSNQTDKL AAFPEDRSQPGQDCRFRTQ LPNGRDFHMSVVRARRNDG TYLCGAISLAPKAQIKESLR AELRVTERRAEVPTAHPSPS PRPAGQFQTLVVISFFLALT STALLFLFFLTLRFSVVKR GRKKLLYIFKQPFMRPVQTT QEEDGCSCRFPPEEEEGGCEL (SEQ ID NO: 33)	ATGGCCCTGCCCCGTGACCGCCCTGCTCCTGCCTCTGGCT CTGCTGCTGCATGCCGCCAGACCTCCCGGCTGGTTCCCTG GACAGCCCCGACAGACCTGGAACCTCCACCTTCAGC CCTGCCCTGCTCGTGGTGACAGAGGGGACAAACGCCACC TTCACCTGTAGCTTCAGCAACACCAGCGAGAGCTTCGTG CTGAACTGGTACAGAATGAGCCCCAGCAACCAGACCGAC AAGCTGGCCGCCTTCCCCGAGGACAGAAGCCAGCCCGGC CAGGACTGCCGGTTCAGAGTGACCCAGCTGCCCAACGGC CGGGACTTCCACATGAGCGTGGTGCGCGCCAGACGGAAC GACAGCGGCACATACCTGTGCGGCGCCATCAGCCTGGCC CCTAAGGCCAGATCAAAGAGAGCCTGCGGGCCGAGCTG AGAGTGACCGAGAGAAGGGCCGAGGTGCCACCGCCAC CCTAGCCCATCTCCAAGACCTGCCGGCCAGTTCAGACC CTGGTGATCATCTCATTCTTTCTGGCCCTGACCAGCACA GCCCTGCTGTTTCTGCTGTTCTTCTGACCCTGCGGTTC AGCGTGGTGAAACGGGGCAGAAAGAAGCTGCTGTACATC TTCAAGCAGCCCTTCATGCGGCCCGTGACAGCACCCAG GAAGAAGACGGCTGCAGCTGCCGGTTCGCCGAAGAAGAA GAGGGCGGCTGCGAACTG (SEQ ID NO: 34)
PD-1 胞外结构域; CD28 跨膜结构域; CD28 胞内结构域	MALPVTALLPLALLLHAAR PPGWFLDSPDRPWNPTFSP ALLVVTEDGNATFTCSFSNT SESFVLNWMSPSNQTDKL AAFPEDRSQPGQDCRFRTQ LPNGRDFHMSVVRARRNDG TYLCGAISLAPKAQIKESLR AELRVTERRAEVPTAHPSPS PRPAGQFQTLVFWVLVVGG VLACYSLVTVAFIIFWVRS	ATGGCCCTGCCTGTGACAGCTCTGCTGCTGCCTCTTGCT CTGCTTCTGCATGCCGCTAGACCTCCAGGCTGGTTCCCTG GACTCTCCCGACAGACCTTGGAACTCCCAACATTACAGC CCCGCTCTGCTGGTGGTTACCGAGGGCGATAATGCCACC TTCACCTGTAGCTTCAGCAACACCAGCGAGAGCTTCGTG CTGAACTGGTACAGAATGAGCCCCAGCAACCAGACCGAC AAGCTGGCCGCCTTTCCTGAGGATAGATCTCAGCCCGGC CAGGACTGCCGGTTCAGAGTTACACAGCTGCCCAACGGC CGGGACTTCCACATGTCTGTCTGTCGGGGCCAGAAGAAC GACAGCGGCACATATCTGTGCGGCGCCATTCTCTGGCC

	KRSRLHSDYMNMTPRRPGP TRKHYQPYAPPRDFAAYRS (SEQ ID NO: 35)	CCTAAGGCTCAGATCAAAGAGAGCCTGAGAGCCGAGCTG AGAGTGACAGAAAGACGGGCCGAAGTGGCCACAGCTCAC CCTTCACCTTCTCCAAGACCTGCCGGCCAGTTTCAGACC CTGGTGTTTTGGGTGCTCGTGGTCGTGGCGGAGTGCTG GCCTGTTATAGCCTGCTGGTCACCGTGGCCTTCATCATC TTTTGGGTCCGAAGCAAGCGGAGCCGGCTGCTGCACAGC GACTACATGAACATGACCCCTAGACGGCCCGGACCTACC AGAAAGCACTACCAGCCTTACGCTCCTCCTAGAGACTTC GCCGCTACAGATCT (SEQ ID NO: 36)
PD-1 胞外结构域; CD28 跨膜结构域; CD28 胞内结构域; 4-1BB 胞内结构域	MALPVTALLLPLALLHAAR PPGWFLDSPDRPWNPTTFSP ALLVTEGDNATFTCSFSNT SESFVLNWMSPSNQTDKL AAFPEDRSQPGQDCRFRTQ LPNGRDFHMSVVRARRNDG TYLCGAISLAPKAQIKESLR AELRVTERRAEVPTAHPSPS PRPAGQFQTLVFWLVVVG VLACYSLVTVAFII FWVRS KRSRLHSDYMNMTPRRPGP TRKHYQPYAPPRDFAAYRSK RGRKKLLYIFKQPFMRPVQT TQEDGCSCRFPEEEEGGCE L (SEQ ID NO: 37)	ATGGCCCTGCCTGTGACAGCTCTGCTGCTGCCTCTTGCT CTGCTTCTGCATGCCGCTAGACCTCCAGGCTGGTTCCTG GACTCTCCCGACAGACCTTGAACCCCTCCAACATTGAGC CCCGCTCTGCTGGTGGTTACCGAGGGCGATAATGCCACC TTCACCTGTAGCTTCAGCAACACCAGCGAGAGCTTCGTG CTGAAGTGGTACAGAATGAGCCCCAGCAACCAGACCGAC AAGCTGGCCGCCTTTCCTGAGGATAGATCTCAGCCCGGC CAGGACTGCCGGTTCAGAGTTACACAGCTGCCCCAAGGC CGGACTTCCACATGTCTGTCTCGTCCGGGCCAGAAGAAAC GACAGCGGCACATATCTGTGCGGCGCCATTTCTCTGGCC CCTAAGGCTCAGATCAAAGAGAGCCTGAGAGCCGAGCTG AGAGTGACAGAAAGACGGGCCGAAGTGGCCACAGCTCAC CCTTCACCTTCTCCAAGACCTGCCGGCCAGTTTCAGACC CTGGTGTTTTGGGTGCTCGTGGTCGTGGCGGAGTGCTG GCCTGTTATAGCCTGCTGGTCACCGTGGCCTTCATCATC TTTTGGGTCCGAAGCAAGCGGAGCCGGCTGCTGCACAGC GACTACATGAACATGACCCCTAGACGGCCCGGACCTACC AGAAAGCACTACCAGCCTTACGCTCCTCCTAGAGACTTC GCCGCTACAGATCCAAGCGGGCAGAAAGAAGCTGCTG TACATCTTCAAGCAGCCCTTCATGCGGCCCGTGCAGACC ACACAAGAGGAAGATGGCTGCTCCTGCAGATTCGCCGAG GAAGAAGAAGCGGCTGCGAGCTT (SEQ ID NO: 38)
PD-1 胞外结构域; CD27 跨膜结构域; CD27 胞内结构域	MALPVTALLLPLALLHAAR PPGWFLDSPDRPWNPTTFSP ALLVTEGDNATFTCSFSNT SESFVLNWMSPSNQTDKL AAFPEDRSQPGQDCRFRTQ LPNGRDFHMSVVRARRNDG TYLCGAISLAPKAQIKESLR AELRVTERRAEVPTAHPSPS PRPAGQFQTLVILVIFSGMF LVFTLAGALFLHQRKYSRN KGESPEPAEPCRYSCPRE EGSTIPIQEDYRKPEPACSP (SEQ ID NO: 39)	ATGGCCCTGCCTGTGACAGCTCTGCTGCTGCCTCTTGCT CTGCTTCTGCATGCCGCTAGACCTCCAGGCTGGTTCCTG GACTCTCCCGACAGACCTTGAACCCCTCCAACATTGAGC CCCGCTCTGCTGGTGGTTACCGAGGGCGATAATGCCACC TTCACCTGTAGCTTCAGCAACACCAGCGAGAGCTTCGTG CTGAAGTGGTACAGAATGAGCCCCAGCAACCAGACCGAC AAGCTGGCCGCCTTTCCTGAGGATAGATCTCAGCCCGGC CAGGACTGCCGGTTCAGAGTTACACAGCTGCCCCAAGGC CGGACTTCCACATGTCTGTCTCGTCCGGGCCAGAAGAAAC GACAGCGGCACATATCTGTGCGGCGCCATTTCTCTGGCC CCTAAGGCTCAGATCAAAGAGAGCCTGAGAGCCGAGCTG AGAGTGACAGAAAGACGGGCCGAAGTGGCCACAGCTCAC CCTTCACCTTCTCCAAGACCTGCCGGCCAGTTTCAGACC CTGGTCATCCTCGTGATCTTCAGCGGCATGTTCTCTGGTG TTCACACTGGCTGGCGCCCTGTTTCTGCACCAGCGGAGA AAGTACAGAAGCAACAAGGGCGAGAGCCCCGTGGAACCT GCCGAGCCTTGTAGATACAGCTGTCCAGAGAGGAAGAG GGCAGCACAATCCCCATCCAAGAGGACTACAGAAAGCCC GAGCCTGCCTGCTCTCCT (SEQ ID NO: 40)
PD-1 胞外结构域; CD27 跨膜结构域; CD27 胞内结构域; 4-1BB 胞内结构域	MALPVTALLLPLALLHAAR PPGWFLDSPDRPWNPTTFSP ALLVTEGDNATFTCSFSNT SESFVLNWMSPSNQTDKL AAFPEDRSQPGQDCRFRTQ LPNGRDFHMSVVRARRNDG TYLCGAISLAPKAQIKESLR AELRVTERRAEVPTAHPSPS PRPAGQFQTLVILVIFSGMF	ATGGCCCTGCCTGTGACAGCTCTGCTGCTGCCTCTTGCT CTGCTTCTGCATGCCGCTAGACCTCCAGGCTGGTTCCTG GACTCTCCCGACAGACCTTGAACCCCTCCAACATTGAGC CCCGCTCTGCTGGTGGTTACCGAGGGCGATAATGCCACC TTCACCTGTAGCTTCAGCAACACCAGCGAGAGCTTCGTG CTGAAGTGGTACAGAATGAGCCCCAGCAACCAGACCGAC AAGCTGGCCGCCTTTCCTGAGGATAGATCTCAGCCCGGC CAGGACTGCCGGTTCAGAGTTACACAGCTGCCCCAAGGC CGGACTTCCACATGTCTGTCTCGTCCGGGCCAGAAGAAAC GACAGCGGCACATATCTGTGCGGCGCCATTTCTCTGGCC CCTAAGGCTCAGATCAAAGAGAGCCTGAGAGCCGAGCTG AGAGTGACAGAAAGACGGGCCGAAGTGGCCACAGCTCAC CCTTCACCTTCTCCAAGACCTGCCGGCCAGTTTCAGACC CTGGTCATCCTCGTGATCTTCAGCGGCATGTTCTCTGGTG TTCACACTGGCTGGCGCCCTGTTTCTGCACCAGCGGAGA AAGTACAGAAGCAACAAGGGCGAGAGCCCCGTGGAACCT GCCGAGCCTTGTAGATACAGCTGTCCAGAGAGGAAGAG GGCAGCACAATCCCCATCCAAGAGGACTACAGAAAGCCC GAGCCTGCCTGCTCTCCT (SEQ ID NO: 40)

	LVFTLAGALFLHQRRKYSN KGESPVPEAEPCTRYSCPRE EGSTIPIQEDYRKPEPACSP KRGRKLLYIFKQPFMRPVQ TTQEEDGCSCTFPPEEEGGC EL (SEQ ID NO: 41)	GACAGCGGCACATATCTGTGCGGCGCCATTCTCTGGCC CCTAAGGCTCAGATCAAAGAGAGCCTGAGAGCCGAGCTG AGAGTGACAGAAAGACGGGCGCAAGTGGCCACAGCTCAC CCTTCACCTTCTCCAAGACCTGCCGGCCAGTTTCAGACC CTGGTCATCCTCGTGATCTTCAGCGGCATGTTCTCTGGTG TTCACACTGGCTGGCGCCCTGTTTCTGCACCAGCGGAGA AAGTACAGAAGCAACAAGGCGAGAGCCCGTGGAACCT GCCGAGCCTTGTAGATACAGCTGTCCCAGAGAGGAAGAG GGCAGCACAATCCCCATCCAAGAGGACTACAGAAAGCCC GAGCCTGCCTGCTCTCCAAGAGAGGCGAGAAAGAAGCTG CTGTACATCTTCAAGCAGCCCTTCATGCGGCGCCGTGCAG ACCACACAAGAGGAAGATGGCTGCTCCTGCAGATTCGCC GAGGAAGAAGAAGGCGGCTGCGAGCTT (SEQ ID NO: 42)
PD-1 胞外结构域; ICOS 跨膜结构域; ICOS 胞内结构域	MALPVTALLLPLALLLHAAR PPGWFLDSPDRPWNPTTFSP ALLVVTEGDNATFTCSFSNT SESFVLNWRMSPSNQTDKL AAFPEDRSQPGQDCRFVQT LPNGRDFHMSVVRARRNDG TYLCGAI SLAPKAQIKESLR AELRVTERRAEVPTAHPSPS PRPAGQFQTLVFWLPICAA FVVVCILGCILICWLTKKKY SSSVHDPNGEYMFMRVNTA KKSRLTDVTL (SEQ ID NO: 43)	ATGGCCCTGCCTGTGACAGCTCTGCTGCTGCCTCTTGCT CTGCTTCTGCATGCCGCTAGACCTCCAGGCTGGTTCTTG GACTCTCCCGACAGACCTTGAACCCCTCAACATTTCAGC CCCGCTCTGCTGGTGGTTACCGAGGGCGATAATGCCACC TTCACCTGTAGCTTCAGCAACACCAGCGAGAGCTTCGTG CTGAACTGGTACAGAATGAGCCCCAGCAACCAGACCGAC AAGCTGGCCGCCCTTCTCTGAGGATAGATCTCAGCCCGGC CAGGACTGCCGGTTTACAGTTACAGCTGCCCCAACGGC CGGGACTTCCACATGTCTGCTGCTCCGGGCCAGAAGAAC GACAGCGGCACATATCTGTGCGGCGCCATTCTCTGGCC CCTAAGGCTCAGATCAAAGAGAGCCTGAGAGCCGAGCTG AGAGTGACAGAAAGACGGGCGCAAGTGGCCACAGCTCAC CCTTCACCTTCTCCAAGACCTGCCGGCCAGTTTCAGACC CTGGTGTTCTGGCTGCCTATCGGCTGTGCCGCTTTTGTG GTCGTGTGCATCCTGGGCTGCATCCTGATCTGCTGGCTG ACCAAGAAAAAGTACAGCAGCAGCGTGCACGACCCCAAC GGCGAGTACATGTTTCATGAGAGCCGTGAACACCGCCAAG AAGTCCAGACTGACCGACGTGACCCTT (SEQ ID NO: 44)

在某些方面,实施方案涉及编码如本文描述的嵌合跨膜蛋白的核酸分子。核酸分子可包含启动子,其中启动子可操作地连接于编码嵌合跨膜蛋白的核苷酸序列,例如用于在重组细胞中表达嵌合跨膜蛋白。在某些实施方案中,启动子是组成型启动子。在某些实施方案中,启动子是细胞特异性启动子。在某些实施方案中,启动子是组织特异性启动子。

[0055] 核酸分子可包含以上提出的序列。核酸分子可包含与本文提出的核苷酸序列具有至少约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同源性的核苷酸序列。由于遗传密码是简并的,核酸序列的变异可能不改变编码的氨基酸序列。因此,本公开内容预期包括简并变化。在某些实施方案中,核酸分子可包含与本文提出的核苷酸序列中的至少约100、200、300、400、500、600或700个连续核苷酸具有至少约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同源性的核苷酸序列。例如,核酸分子可包含与本文提出的核苷酸序列中的至少100个连续核苷酸具有至少95%序列同源性的核苷酸序列。可以在NCBI网站上运行Blastn或BlastP,使用默认设置以比较或比对两个序列,使用同源性。

[0056] 在某些实施方案中,核酸分子编码本文描述的氨基酸序列。在某些实施方案中,核酸分子编码包含一个或多个本文提出的氨基酸序列的氨基酸序列。在某些实施方案中,核酸分子可包含核苷酸序列,其编码与本文提出的氨基酸序列具有至少约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同源性的氨基酸序列。在蛋白质的背景下,同源性可以是同一性或相似性。可以通过使用常规工具(例如Expasy、BLASTp、Clustal等),使用默认设置来使用同源性。

[0057] 在某些实施方案中,嵌合跨膜蛋白包含一个或多个本文和以上提出的氨基酸序列。

[0058] 在某些实施方案中,嵌合跨膜蛋白包含与本文提出的氨基酸序列之一具有至少约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同源性的氨基酸序列。

[0059] 本文描述的氨基酸序列的变体可以包括在各个实施方案中。术语“变体”指一种蛋白质或多肽,其中当与蛋白质或多肽的氨基酸序列比较时,存在1个或多个(如,1、2、3、4个等)氨基酸取代、缺失和/或插入,并且该术语包括蛋白或多肽的天然存在的等位基因变体和可变剪接变体。术语“变体”包括用类似的或同源的氨基酸或不同的氨基酸替换氨基酸序列中的一个或多个氨基酸。一些变体包括在氨基酸序列中的一个或多个氨基酸位置处的丙氨酸取代。其它取代包括保守的取代,它们对蛋白质的总净电荷、极性或疏水性几乎没有或没有影响。保守的取代对嵌合跨膜蛋白的功能可能影响不大。在某些实施方案中,功能可以是蛋白在淋巴细胞、例如骨髓浸润淋巴细胞(MIL)中表达时的特异性。本领域技术人员可以通过与本文提供的序列进行比较,确定取代是否影响嵌合跨膜蛋白的功能。下表列出了非限制性的示例性保守取代。根据一些实施方案,嵌合跨膜蛋白与本文描述的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的序列同一性。

[0060] 保守的氨基酸取代

碱性的:	精氨酸 赖氨酸 组氨酸
酸性的:	谷氨酸 天冬氨酸
无电荷极性:	谷氨酰胺 天冬酰胺 丝氨酸 苏氨酸 酪氨酸
非极性:	苯丙氨酸 色氨酸 半胱氨酸 甘氨酸 丙氨酸 缬氨酸 脯氨酸 甲硫氨酸 亮氨酸 异亮氨酸

下表列出保守的氨基酸取代的另一种方案。

原始残基	保守的取代
Ala	Gly; Ser; Thr
Arg	Lys; Gln
Asn	Gln; His; Ser
Asp	Glu; Asn
Cys	Ser
Gln	Asn; Ser; Asp; Glu
Glu	Asp; Gln; Lys
Gly	Ala; Pro; Asn
His	Asn; Gln; Tyr
Ile	Leu; Val; Met; Val; Phe
Leu	Ile; Val; Met; Phe
Lys	Arg; Gln
Met	Leu; Tyr; Ile; Val; Phe
Pro	Ser; Thr; Ala; Gly
Phe	Met; Leu; Tyr; Trp
Ser	Thr; Gly; Asn; Asp
Thr	Ser; Asn
Trp	Tyr; Phe
Tyr	Trp; Phe
Val	Ile; Leu; Met; Phe

[0061] 因此,在某些实施方案中,本文公开的氨基酸序列的1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸残基用保守的取代来修饰。在某些实施方案中,只有1、2、3、4或5个氨基酸残基被保守取代来取代。

[0062] 在某些实施方案中,嵌合跨膜蛋白包含本文描述的序列(SEQ ID NO: 1-44)或其变体。在某些实施方案中,如果蛋白质包含CD8的前导序列(SEQ ID NO: 1),则其被另一信号肽或前导序列替代,所述另一信号肽或前导序列可帮助将嵌合跨膜蛋白转移至细胞外膜。

[0063] 在某些方面,实施方案涉及一种包含如本文公开的核酸的重组细胞。在某些实施方案中,实施方案涉及一种包含如本文描述的嵌合跨膜蛋白的重组细胞。在某些实施方案中,细胞包含含有本文提出的氨基酸序列或其变体的嵌合蛋白。在某些实施方案中,所述细胞是淋巴细胞。细胞可以是T细胞。在某些实施方案中,所述细胞可以是肿瘤-浸润淋巴细胞(“TIL”)或骨髓浸润淋巴细胞(“MIL”)。

[0064] 在某些实施方案中,当与没有嵌合跨膜蛋白的细胞相比时,包含本文所述的嵌合跨膜蛋白的细胞在给予受试者时在受试者中持续更长的时间。

[0065] 在某些方面,实施方案涉及一种制备重组细胞的方法,其包括用如本文描述的核酸分子转染细胞。在某些方面,实施方案涉及一种制备重组细胞的方法,其包括用编码如本文描述的氨基酸序列的核酸分子转染细胞。核酸分子可以是质粒。细胞可由包含一个或多个如本文描述的核苷酸序列的质粒转染。细胞也可用包含核酸分子的病毒或病毒-样颗粒感染。在某些实施方案中,病毒是慢病毒、腺病毒或腺相关病毒(“AAV”)。在某些实施方案中,细胞是TIL或MIL。在某些实施方案中,MIL是一种激活MIL。MIL可以例如,通过将它们与抗-CD3/抗-CD28珠和合适的细胞因子(例如在低氧条件下)一起培养来激活。例如,MIL在低氧条件下生长的例子可以在W02016037054中找到,其通过引用以其整体并入本文。在某些实施方案中,如本文所述,核酸分子在细胞在低氧环境中培养后被转染到细胞中。在某些实

施方案中,核酸分子在细胞在低氧环境中培养约1、2、3、4或5天后被转染到细胞中。在某些实施方案中,细胞然后在常氧条件下培养约1、2、3、4或5天。

[0066] 在某些实施方案中,包含嵌合跨膜蛋白的MIL根据在W02016037054中描述的方法制备,其通过引用以其整体并入本文。在某些实施方案中,该方法可包括从受试者中取出骨髓中的细胞、淋巴细胞和/或骨髓浸润淋巴细胞("MIL");在低氧环境中培养细胞,从而产生激活的MIL;并给予受试者激活的MIL。如本文所述,这些细胞也可在抗CD3/抗CD28抗体和细胞因子的存在下被激活。编码嵌合跨膜蛋白的核酸分子,例如本文描述的那些核酸分子之一,可以在MIL在低氧环境中培养之前或之后被转染或感染到细胞中。

[0067] 低氧环境可包含少于约21 %的氧,例如少于约20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%或少于约3%的氧。例如,低氧环境可包含约0%的氧-约20%的氧,例如约0%的氧-约19%的氧,约0%的氧-约18%的氧,约0%的氧-约17%的氧,约0%的氧-约16%的氧,约0%的氧-约15%的氧,约0%的氧-约14%的氧,约0%的氧-约13%的氧,约0%的氧-约12%的氧,约0%的氧-约11%的氧,约0%的氧-约10%的氧,约0%的氧-约9%的氧,约0%的氧-约8%的氧,约0%的氧-约7%的氧,约0%的氧-约6%的氧,约0%的氧-约5%的氧,约0%的氧-约4%的氧,或约0%的氧-约3%的氧。在某些实施方案中,低氧环境包括约1 %-约7%的氧。在某些实施方案中,低氧环境为约1%-约2%的氧。在某些实施方案中,低氧环境为约0.5%-约1.5%的氧。在某些实施方案中,低氧环境为约0.5%-约2%的氧。低氧环境可包含约20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%或约0%的氧。在某些实施方案中,低氧环境包括约7%、6%、5%、4%、3%、2%或1%的氧。

[0068] 在低氧环境中培养MIL可包括例如在组织培养基中培养MIL至少约1小时,例如至少约12小时、18小时、24小时、30小时、36小时、42小时、48小时、60小时、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天,或甚至至少约14天。培养可包括培养MIL约1小时-约30天,例如约1天-约20天,约1天-约14天,或约1天-约12天。在某些实施方案中,在低氧环境中培养MIL包括在低氧环境中培养MIL约2天-约5天。该方法可包括在低氧环境中培养MIL约1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天或14天。在某些实施方案中,该方法包括在低氧环境中培养MIL约3天。在某些实施方案中,该方法包括在低氧环境中培养MIL约2天-约4天。在某些实施方案中,该方法包括在低氧环境中培养MIL约3天-约4天。

[0069] 在某些实施方案中,该方法还包括,例如在低氧环境中培养MIL后,在常氧环境中培养MIL。

[0070] 常氧环境可包括至少约21%的氧。常氧环境可包括约5%的氧-约30%的氧,例如约10%的氧-约30%的氧,约15%的氧-约25%的氧,约18%的氧-约24%的氧,约19%的氧-约23%的氧,或约20%的氧-约22%的氧。在某些实施方案中,常氧环境包含约21 %的氧。

[0071] 在常氧环境中培养MIL可包括例如在组织培养基中培养MIL至少约1小时,例如至少约12小时、18小时、24小时、30小时、36小时、42小时、48小时、60小时、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天,或甚至至少约14天。培养可包括培养MIL约1小时-约30天,例如约1天-约20天,约1天-约14天,约1天-约12天,或约2天-约12天。

[0072] 在某些实施方案中,在置于常氧环境后或在置于常氧环境前,用编码本文描述的嵌合跨膜蛋白的核酸分子转染或感染细胞。

[0073] 在某些实施方案中,MIL是通过从受试者中提取骨髓样本和培养/孵育如本文描述

的细胞来获得的。在某些实施方案中,骨髓样本经离心以去除红细胞。在某些实施方案中,骨髓样本不经受血液成分分离术。在某些实施方案中,骨髓样本不包含外周血淋巴细胞(“PBL”),或骨髓样本基本上不含PBL。这些方法选择与已经被称为TIL的细胞不同的细胞。因此,MIL不是TIL。TIL可以用本领域技术人员已知的方法选择,并可用本文描述的核酸分子转染或感染,以使TIL能表达本文描述的嵌合跨膜蛋白。

[0074] 在某些实施方案中,细胞也通过用CD3和CD28的抗体进行培养而活化。例如,这可以通过用抗-CD3/抗-CD28珠培养细胞来完成,这些珠是市面上可以买到的,或可以由本领域技术人员制得。然后,这些细胞可以被平铺在板、瓶或袋中。用95%氮气和5% CO<sub>2</sub>混合气体吹洗低氧室或细胞培养袋3分钟可达到低氧条件。这可能导致,例如,1-2%或更少的O<sub>2</sub>气体在容器中。然后,细胞可以如本文描述的那样进行培养,或者可以按照W02016037054的实施例进行培养,其可通过引用并入本文。

[0075] 在某些实施方案中,提供了包含如本文描述的嵌合跨膜蛋白的低氧性MIL。在某些实施方案中,低氧性MIL处于约0.5%-约5%氧气的环境中。在某些实施方案中,低氧性MIL处于约1%-约2%氧气的环境中。在某些实施方案中,低氧性MIL处于约1%-约3%氧气的环境中。在某些实施方案中,低氧性MIL处于约1%-约4%氧气的环境中。低氧性MIL是已经在低氧环境(例如本文描述的那些)中培养一段时间(例如本文描述的那些)的MIL。不受任何特定理论的束缚,低氧性MIL将经历蛋白质和/或基因表达的变化,其影响MIL的抗肿瘤能力。如本文描述的,低氧性MIL也可以在抗-CD3/抗-CD28珠或其它类似的激活剂的存在下被激活。因此,低氧性MIL也可以是活化的低氧性MIL。

[0076] 在某些方面,实施方案涉及一种增加受试者的免疫反应的方法,其包括给予受试者本文描述的重组细胞。在某些实施方案中,实施方案涉及一种治疗受试者的肿瘤的方法,其包括给予受试者本文描述的重组细胞。肿瘤可以是良性肿瘤、恶性肿瘤或继发性肿瘤。肿瘤可以是癌症。肿瘤可以是淋巴瘤或白血病,例如慢性淋巴细胞白血病(“CLL”)或急性成淋巴细胞白血病(“ALL”)。肿瘤可以是多发性骨髓瘤以及任何实体瘤(如乳腺癌、前列腺癌、肺癌、食管癌、脑癌、肾癌、膀胱癌、胰腺癌、骨肉瘤等)。癌症也可以是本文描述的癌症。

[0077] 所述方法可包括给予受试者多种如本文描述的重组细胞。该方法可包括给予受试者有效量的如本文描述的重组细胞。在某些实施方案中,相对于接受重组细胞的受试者,细胞是自体细胞。在某些实施方案中,相对于接受重组细胞的受试者,细胞是同种异体细胞。在某些实施方案中,相对于接受重组细胞的受试者,细胞是异种细胞。

[0078] 因此,在某些实施方案中,细胞是从受试者获得的并用本文提供的受体修饰,然后给回受试者的细胞。细胞可以是如本文描述的。

[0079] 在某些实施方案中,细胞是从不同的受试者获得的并用本文提供的受体修饰,然后给回与细胞来源不一样的受试者的细胞。细胞可以是如本文描述的。

[0080] 在某些实施方案中,细胞是从不同的物种(如猪)获得的并用本文提供的受体修饰,然后给回与细胞来源不一样的受试者的细胞。细胞可以是如本文描述的。

[0081] 在某些实施方案中,细胞从受试者获得。被转染或感染的细胞可从受试者获得。细胞可如本文所述获得。例如,给予的细胞对受试者可以是自体的。在某些实施方案中,给予的细胞对受试者是同种异体的。细胞可从受试者获得,以及用编码如本文描述的嵌合跨膜蛋白的核酸转染或感染。细胞可以是子细胞,其中子细胞的母细胞是从受试者中获取的。重

组细胞可已经用核酸转染或感染,或重组细胞的母细胞可已经用核酸转染或感染。在某些实施方案中,细胞在转染或感染后表达包含一个或多个本文描述的氨基酸序列的蛋白质。

[0082] 所述方法可进一步包括制备重组细胞,其中制备重组细胞包括用编码嵌合跨膜蛋白的核酸,例如本文描述的那些转染或感染细胞。在某些实施方案中,嵌合跨膜蛋白包含 SEQ ID NO: 5、6、7、8、9、10或11的任何一个提出的氨基酸序列或其变体。类似地,该方法可进一步包括制备多种重组细胞,其中制备多种重组细胞包括用编码嵌合跨膜蛋白的核酸,例如本文描述的那些转染或感染多种细胞。该方法可进一步包括扩增母细胞,例如,重组细胞可以是母细胞的子细胞。该方法可包括扩增细胞群,例如,该方法可包括给予受试者如本文描述的多种重组细胞,并且多种重组细胞中的每种细胞可以是母细胞的子细胞。

[0083] 该方法可进一步包括分离所述细胞或来自受试者的母细胞。

[0084] 该方法可进一步包括分选细胞,例如通过荧光激活细胞分选(“FACS”)或磁激活细胞分选(“MACS”)。

[0085] 细胞可以通过任何合适的途径,以例如药学上可接受的组合物给予受试者。在某些实施方案中,组合物是无热原的。例如,细胞的给予可以使用本领域已知的任何方法进行。例如,给药可以是胃肠外、静脉内、动脉内、皮下、肌内、颅内、眼眶内、经眼、心室内、囊内、脊柱内、脑池内、腹膜内、脑室内或鞘内。对于胃肠外给药,细胞可在含药学上可接受的媒介或载体的组合物中,通过静脉内、皮下或肌内注射给予。细胞可以配制成通过注射,例如通过推注或持续输注,用于胃肠外给药。组合物可采用例如在油性或水性媒介中的悬浮液、溶液或乳液的形式,并可含有配方剂,例如助悬剂、稳定剂和/或分散剂。

[0086] 对于注射给药,可能希望在水性媒介的溶液中使用细胞,其中也可含有其它溶质,如缓冲剂或防腐剂,以及足够量的药学上可接受的盐或葡萄糖,以使溶液等张。在某些实施方案中,药物组合物可用药物上可接受的载体配制,以提供用于注射给药的无菌溶液或混悬液。特别是,注射剂可以用常规的形式,作为液体溶液或混悬液,或作为乳液制备。适宜的赋形剂为例如,水、盐水、葡萄糖、甘露醇、乳糖、卵磷脂、白蛋白、谷氨酸钠、盐酸半胱氨酸等。此外,如果需要的话,可注射的药物组合物可含有少量无毒的辅助物质,如润湿剂、pH缓冲剂等。适宜的药用载体在E. W. Martin的“Remington’s pharmaceutical Sciences”中有描述。

[0087] 受试者可以是包含免疫细胞的任何生物。例如,受试者可以选自啮齿动物、犬科动物、猫科动物、猪、绵羊、牛、马和灵长类。受试者可以是小鼠或人。

[0088] 在某些实施方案中,受试者可患有肿瘤。肿瘤可以是良性肿瘤、恶性肿瘤或继发性肿瘤。肿瘤可以是癌症。肿瘤可以是淋巴瘤或白血病,例如慢性淋巴细胞白血病(“CLL”)或急性成淋巴细胞白血病(“ALL”)。受试者可患有胶质母细胞瘤、髓母细胞瘤、乳腺癌、头颈癌、肾癌、卵巢癌、卡波西肉瘤、急性骨髓性白血病和B-系恶性肿瘤。受试者可患有多发性骨髓瘤。

[0089] 在某些实施方案中,受试者是“有需要的”受试者。如本文所用的,短语“有需要的”意指受试者已被鉴定或怀疑具有该特定方法或治疗的需要。在某些实施方案中,可以通过任何诊断手段鉴定。在本文描述的任何方法和治疗中,受试者可以是有需要的。

[0090] 本文提供的受体也可以与其它嵌合激活受体(其也可以被称为“CAR”)一起位于细胞中。

## 实施例

[0091] 以下实施例说明了本文描述的方法和组合物,但不限于这些方法和组合物。在治疗中通常遇到的和对于本领域技术人员来说是显而易见的各种条件和参数的其它适当的修改和调整,在实施方案的精神和范围之内。

[0092] 实施例1:PD-1开关受体在慢病毒转导的Jurkat白血病细胞系中的表达。下面描述的受体使用慢病毒表达系统和如本文所述,转导到Jurkat细胞中。简言之,Jurkat细胞用携带仅携带绿色荧光蛋白(GFP)的空载体对照(空载体)的慢病毒或携带通过T2a可裂解肽连接到GFP的6个PD-1开关受体的每一个的慢病毒进行转导。转导后4天,用抗-PD-PECy7或同种型匹配的对照抗体标记细胞,用Beckman Coulter Galios流式细胞仪进行分析。不表达PD-1、PD-1开关受体或GFP的未转导的Jurkat细胞(未转导)被以同样的方式标记,并用作阴性对照。这些受体被发现在细胞中表达。

[0093] 还通过使细胞与四聚人PDL1结合并通过FACS分析来确定表达,这证明PD-1开关受体能够与PD-1配体PDL1结合。这通过使用以下程序确定。简言之,Jurkat细胞用携带仅携带绿色荧光蛋白(GFP)的空载体对照(空载体)的慢病毒或携带通过T2a可裂解肽连接到GFP的6个PD-1开关受体的每一个的慢病毒进行转导。用荧光分子藻红蛋白(PE)标记的四聚人PDL1-Ig标记细胞,用Beckman Coulter Galios流式细胞仪进行分析。不表达PD-1、PD-1开关受体或GFP的未转导的Jurkat细胞(未转导)被以同样的方式标记,并用作阴性对照。

[0094] 这些受体也被发现在被转导到MIL中后表达。简言之,来自3例多发性骨髓瘤患者(A)患者476-2312、(B)患者1431、(C)患者1943)的骨髓(BM)被用来在低氧条件下产生激活MIL。在第3天,MIL用携带仅携带GFP的空载体对照(空载体)的慢病毒或携带通过T2a可裂解肽连接到GFP的6个PD1开关受体的每一个的慢病毒进行转导。转导后3天,用抗-CD3-APC、抗-CD8-APCH7、Live-dead Yellow、和抗-PD1-PECy7或同种型匹配的对照抗体标记细胞,用Beckman Coulter Galios流式细胞仪进行分析。不表达PD1开关受体或GFP的未转导的MIL(未转导)被以同样的方式标记,并用作阴性对照。用流式细胞术测量表达。与空载体对照-转导的MIL相比,在GFP+ PD-1开关受体-转导的MIL中观察到的PD1-表达的增加与PD1开关受体的表达相对应。MIL已在低氧条件下被激活。这些结果表明,受体能够在不同的细胞类型中表达。表达受体的细胞可被用来治疗肿瘤,例如本文描述的癌症。

[0095] 实施例2:低氧激活的MIL治疗癌症

如本文所述,从受试者获得的MIL被激活和扩增。简单地说,在从受试者中获得骨髓样本后,细胞在低氧条件下,在抗-CD3/抗-CD28珠和细胞因子的存在下培养,如在W02016037054中描述的,其可通过引用并入本文。然后,用病毒感染MIL,所述病毒包含编码包含SEQ ID NO: 21、23、25、27、29或31的嵌合跨膜蛋白的核酸分子。核酸分子也可以通过转染或转导来引入。嵌合受体也可包含本文提供的前导序列。然后,细胞在常氧条件下生长,并允许扩增。使对照和感染的MIL与不同的细胞类型接触。无论是MIL的扩增,还是MIL识别抗原的能力,都没有受到嵌合跨膜蛋白的存在的负面影响。将嵌合跨膜蛋白添加到MIL中不损害其功能和生长。MIL被给予患有癌症如多发性骨髓瘤的受试者,癌症被治疗并且受试者处于缓解中。还发现细胞持续存在并继续保持受试者处于缓解中。

[0096] 总之,本文提供的实施方案和实施例证明,表达本文提供的嵌合跨膜蛋白的细胞可有效地用于治疗癌症和/或调节免疫反应。

[0097] 本说明书中提及和/或在申请数据表中列出的任何美国专利、美国专利申请出版物、美国专利申请、外国专利、外国专利申请和非专利出版物(包括CAS号),均通过引用以其整体并入本文。

## 序列表

<110> WINDMIL THERAPEUTICS, INC.  
 Noonan, Kimberly A.  
 Lutz, Eric R.

<120> 用于调节免疫系统的组合物和方法

<130> 144502.00502

<150> 62/438,106

<151> 2016-12-22

<160> 44

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 21

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CD 前导肽

<400> 1

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

20

<210> 2

<211> 63

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> CD 前导肽

<400> 2

atggccctgc ccgtgaccgc cctgtccttg cctctggctc tgctgtgtgca tgccgccaga

60

cct

63

<210> 3

<211> 150

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> PD-1 胞外结构域

<400> 3

Pro Gly Trp Phe Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp Asn Pro Pro Thr

1 5 10 15

Phe Ser Pro Ala Leu Leu Val Val Thr Glu Gly Asp Asn Ala Thr Phe

20 25 30

Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val Leu Asn Trp Tyr

35 40 45

Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala Ala Phe Pro Glu

50 55 60

Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Cys Arg Phe Arg Val Thr Gln Leu

[0001]

	65	70	75	80
	Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Val Arg Ala Arg Arg Asn			
		85	90	95
	Asp Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu Ala Pro Lys Ala			
		100	105	110
	Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val Thr Glu Arg Arg			
		115	120	125
	Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro Ser Pro Arg Pro Ala Gly			
		130	135	140
	Gln Phe Gln Thr Leu Val			
	145	150		
	<210> 4			
	<211> 450			
	<212> DNA			
	<213> 人工序列			
	<220>			
	<223> PD-1 胞外结构域			
	<400> 4			
	ccccgctggt tcctggacag ccccgacaga ccctggaacc ctcccacatt cagccctgcc	60		
	ctgctcgtgg tgacagaggg cgacaacgcc accttcacct gtagcttcag caacaccagc	120		
	gagagcttcg tgctgaactg gtacagaatg agccccagca accagaccga caagctggcc	180		
	gccttccccg aggacagaag ccagcccggc caggactgcc ggttcagagt gacccagctg	240		
	cccaacggcc gggacttcca catgagcgtg gtgcgcgcca gacggaacga cagcggcaca	300		
[0002]	tacctgtgcg gcgccatcag cctggccct aagggccaga tcaaagagag cctgcgggccc	360		
	gagctgagag tgaccgagag aagggccgag gtgcccaccg cccaccctag cccatctcca	420		
	agacctgccg gccagttcca gacctggtg	450		
	<210> 5			
	<211> 27			
	<212> PRT			
	<213> 人工序列			
	<220>			
	<223> 4-1BB 跨膜结构域			
	<400> 5			
	Ile Ile Ser Phe Phe Leu Ala Leu Thr Ser Thr Ala Leu Leu Phe Leu			
	1 5 10 15			
	Leu Phe Phe Leu Thr Leu Arg Phe Ser Val Val			
		20	25	
	<210> 6			
	<211> 81			
	<212> DNA			
	<213> 人工序列			
	<220>			
	<223> 4-1BB 跨膜结构域			
	<400> 6			
	atcatctcat tctttctggc cctgaccagc acagccctgc tgtttctget gttcttcctg	60		
	accctgcggt tcagcgtggt g	81		
	<210> 7			

	<211>	42	
	<212>	PRT	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	4-1BB 胞内结构域	
	<400>	7	
	Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met		
	1 5 10 15		
	Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe		
	20 25 30		
	Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu		
	35 40		
	<210>	8	
	<211>	51	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	4-1BB 胞内结构域	
	<400>	8	
	aaacggggca gaaagaagct gctgtacatc ttcaagcagc ccttcacg g	51	
	<210>	9	
	<211>	27	
	<212>	PRT	
[0003]	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	CD28 跨膜结构域	
	<400>	9	
	Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu		
	1 5 10 15		
	Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val		
	20 25		
	<210>	10	
	<211>	81	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	CD28 跨膜结构域	
	<400>	10	
	ttttgggtgc tcgtggtcgt tggcggagtg ctggcctgtt atagcctget ggtcaccgtg	60	
	gccttcacca tcttttgggt c	81	
	<210>	11	
	<211>	41	
	<212>	PRT	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	CD28 胞内结构域	
	<400>	11	

	Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr	
	1 5 10 15	
	Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro	
	20 25 30	
	Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser	
	35 40	
	<210> 12	
	<211> 123	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> CD28 胞内结构域	
	<400> 12	
	cgaagcaagc ggagccggt gctgcacagc gactacatga acatgacccc tagacggccc	60
	ggacctacca gaaagcacta ccagccttac gctcctcta gagacttcgc cgcctacaga	120
	tct	123
	<210> 13	
	<211> 21	
	<212> PRT	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> CD27 跨膜结构域	
	<400> 13	
[0004]	Ile Leu Val Ile Phe Ser Gly Met Phe Leu Val Phe Thr Leu Ala Gly	
	1 5 10 15	
	Ala Leu Phe Leu His	
	20	
	<210> 14	
	<211> 63	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> CD27 跨膜结构域	
	<400> 14	
	atcctcgtga tcttcagcgg catgttcctg gtgttcacac tggctggcgc cctgtttctg	60
	cac	63
	<210> 15	
	<211> 48	
	<212> PRT	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> CD27 胞内结构域	
	<400> 15	
	Gln Arg Arg Lys Tyr Arg Ser Asn Lys Gly Glu Ser Pro Val Glu Pro	
	1 5 10 15	
	Ala Glu Pro Cys Arg Tyr Ser Cys Pro Arg Glu Glu Glu Gly Ser Thr	
	20 25 30	

	Ile Pro Ile Gln Glu Asp Tyr Arg Lys Pro Glu Pro Ala Cys Ser Pro	
	35 40 45	
	<210> 16	
	<211> 144	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> CD27 胞内结构域	
	<400> 16	
	cagcggagaa agtacagaag caacaagggc gagagcccg tggaacctgc cgagccttgt	60
	agatacagct gtcccagaga ggaagagggc agcacaatcc ccatccaaga ggactacaga	120
	aagcccgagc ctgcctgctc tcct	144
	<210> 17	
	<211> 21	
	<212> PRT	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> ICOS 跨膜结构域	
	<400> 17	
	Phe Trp Leu Pro Ile Gly Cys Ala Ala Phe Val Val Val Cys Ile Leu	
	1 5 10 15	
	Gly Cys Ile Leu Ile	
	20	
[0005]	<210> 18	
	<211> 63	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> ICOS 跨膜结构域	
	<400> 18	
	ttctggctgc ctatcggtcg tgccgctttt gtggtcgtgt gcatcctggg ctgcatcctg	60
	atc	63
	<210> 19	
	<211> 38	
	<212> PRT	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> ICOS 胞内结构域	
	<400> 19	
	Cys Trp Leu Thr Lys Lys Lys Tyr Ser Ser Ser Val His Asp Pro Asn	
	1 5 10 15	
	Gly Glu Tyr Met Phe Met Arg Ala Val Asn Thr Ala Lys Lys Ser Arg	
	20 25 30	
	Leu Thr Asp Val Thr Leu	
	35	
	<210> 20	
	<211> 114	

<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	ICOS 胞内结构域	
<400>	20	
	tgctggctga ccaagaaaaa gtacagcagc agcgtgcacg accccaacgg cgagtacatg	60
	ttcatgagag ccgtgaacac cgccaagaag tccagactga ccgacgtgac cctt	114
<210>	21	
<211>	219	
<212>	PRT	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	PD-1 胞外结构域; 4-1BB 跨膜结构域; 4-1BB 胞内结构域	
<400>	21	
	Pro Gly Trp Phe Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp Asn Pro Pro Thr	
	1 5 10 15	
	Phe Ser Pro Ala Leu Leu Val Val Thr Glu Gly Asp Asn Ala Thr Phe	
	20 25 30	
	Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val Leu Asn Trp Tyr	
	35 40 45	
	Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala Ala Phe Pro Glu	
	50 55 60	
[0006]	Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Cys Arg Phe Arg Val Thr Gln Leu	
	65 70 75 80	
	Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Val Arg Ala Arg Arg Asn	
	85 90 95	
	Asp Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu Ala Pro Lys Ala	
	100 105 110	
	Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val Thr Glu Arg Arg	
	115 120 125	
	Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro Ser Pro Arg Pro Ala Gly	
	130 135 140	
	Gln Phe Gln Thr Leu Val Ile Ile Ser Phe Phe Leu Ala Leu Thr Ser	
	145 150 155 160	
	Thr Ala Leu Leu Phe Leu Leu Phe Phe Leu Thr Leu Arg Phe Ser Val	
	165 170 175	
	Val Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe	
	180 185 190	
	Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg	
	195 200 205	
	Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu	
	210 215	
<210>	22	
<211>	657	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; PD-1 胞外结构域; 4-1BB 跨膜结构域; 4-1BB

胞内结构域

&lt;400&gt; 22

```

ccccgctggt tcttgacag ccccgacaga ccctggaacc ctcccacctt cagccctgcc      60
ctgctcgtgg tgacagaggg cgacaacgcc accttcacct gtagcttcag caacaccage      120
gagagcttcg tgctgaactg gtacagaatg agccccagca accagaccga caagctggcc      180
gccttccccg aggacagaag ccagcccggc caggactgcc ggttcagagt gaccagctg      240
cccaacggcc gggacttcca catgagcgtg gtgcgcgcca gacggaacga cagcggcaca      300
tacctgtgcg gcgccatcag cctggcccct aaggcccaga tcaaagagag cctgcgggcc      360
gagctgagag tgaccgagag aagggccgag gtgcccaccg ccaccctag cccatctcca      420
agacctgccg gccagttcca gacctgggtg atcatctcat tctttctggc cctgaccage      480
acagccctgc tgtttctgct gttcttcctg accctgcggt tcagcgtggt gaaacggggc      540
agaaagaagc tgctgtacat cttcaagcag ccttcatgc ggcccgtaga gaccaccag      600
gaagaagacg gctgcagctg ccggttcccc gaagaagaag agggcggctg cgaactg      657

```

&lt;210&gt; 23

&lt;211&gt; 218

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; PD-1 胞外结构域; CD28 跨膜结构域; CD28

胞内结构域

&lt;400&gt; 23

[0007]

```

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

```

	Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala	
	195	200 205
	Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser	
	210	215
	<210> 24	
	<211> 654	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> PD-1 胞外结构域; CD28 跨膜结构域; CD28	
	胞内结构域	
	<400> 24	
	ccaggctgggt tcttggaactc tcccgacaga ccttgaacc ctccaacatt cagccccgct	60
	ctgctggtgg ttaccgaggg cgataatgcc accttcacct gtagcttcag caacaccagc	120
	gagagcttcg tgcagaactg gtacagaatg agccccagca accagaccga caagctggcc	180
	gcctttcctg aggatagatc tcagcccggc caggactgcc ggttcagagt tacacagctg	240
	cccaacggcc gggacttcca catgtctgtc gtccgggcca gaagaaacga cagcggcaca	300
	tatctgtgcg gcgccatttc tctggcccct aaggtcaga tcaaagagag cctgagagcc	360
	gagctgagag tgacagaaag acgggcccga gtgccacag ctcacccttc accttctcca	420
	agacctgccg gccagtttca gacctggtg ttttgggtgc tctgtgtcgt tggcggagtg	480
	ctggcctgtt atagcctgct ggtaaccgtg gccttcacatca tcttttgggt ccgaagcaag	540
	cggagccggc tgcgtcacag cgactacatg aacatgaccc ctagacggcc cggacctacc	600
	agaaagcaact accagcctta cgctcctcct agagacttcg ccgcctacag atct	654
[0008]	<210> 25	
	<211> 260	
	<212> PRT	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> PD-1 胞外结构域; CD28 跨膜结构域; CD28	
	胞内结构域; 4-1BB 胞内结构域	
	<400> 25	
	Pro Gly Trp Phe Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp Asn Pro Pro Thr	
	1 5 10 15	
	Phe Ser Pro Ala Leu Leu Val Val Thr Glu Gly Asp Asn Ala Thr Phe	
	20 25 30	
	Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val Leu Asn Trp Tyr	
	35 40 45	
	Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala Ala Phe Pro Glu	
	50 55 60	
	Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Cys Arg Phe Arg Val Thr Gln Leu	
	65 70 75 80	
	Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Val Arg Ala Arg Arg Asn	
	85 90 95	
	Asp Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu Ala Pro Lys Ala	
	100 105 110	
	Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val Thr Glu Arg Arg	
	115 120 125	

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

<210> 26

<211> 780

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

[0009] <223> PD-1 胞外结构域; CD28 跨膜结构域; CD28  
 胞内结构域; 4-1BB 胞内结构域

<400> 26

ccaggetggt tcctggactc tcccacaga ctttgaacc ctccaacatt cageccccgt 60  
 ctgtctggtgg ttaccgaggg cgataatgcc accttcacct gtagcttcag caacaccagc 120  
 gagagcttcg tgctgaactg gtacagaatg agccccagca accagaccga caagctggcc 180  
 gcctttctcg aggatagatc tcagcccggc caggactgcc ggttcagagt tacacagctg 240  
 cccaacggcc gggacttcca catgtctgtc gtccgggcca gaagaaacga cagcggcaca 300  
 tatctgtgcg gcgccatttc tctggccctt aaggtcaga tcaaagagag cctgagagcc 360  
 gagctgagag tgacagaaag acgggcccga gtgccacag ctcacccttc accttctcca 420  
 agacctgccg gccagtttca gaccttggtg ttttgggtgc tcgtggtcgt tggcggagtg 480  
 ctggcctgtt atagcctgct ggtcaccgtg gccttcatca tcttttgggt ccgaagcaag 540  
 cggagccggc tgctgcacag cgactacatg aacatgaccc ctagacggcc cggacctacc 600  
 agaaagcact accagcctta cgctctcct agagacttcg ccgcctacag atccaagcgg 660  
 ggcagaaaga agctgctgta catcttcaag cagcccttca tgcggcccgt gcagaccaca 720  
 caagaggaag atggctgctc ctgcagattc cccaggaag aagaaggcgg ctgcgagctt 780

<210> 27

<211> 219

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> PD-1 胞外结构域; CD27 跨膜结构域; CD27  
 胞内结构域

<400> 27

[0010]

Pro Gly Trp Phe Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp Asn Pro Pro Thr  
 1 5 10 15  
 Phe Ser Pro Ala Leu Leu Val Val Thr Glu Gly Asp Asn Ala Thr Phe  
 20 25 30  
 Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val Leu Asn Trp Tyr  
 35 40 45  
 Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala Ala Phe Pro Glu  
 50 55 60  
 Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Cys Arg Phe Arg Val Thr Gln Leu  
 65 70 75 80  
 Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Val Arg Ala Arg Arg Asn  
 85 90 95  
 Asp Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu Ala Pro Lys Ala  
 100 105 110  
 Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val Thr Glu Arg Arg  
 115 120 125  
 Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro Ser Pro Arg Pro Ala Gly  
 130 135 140  
 Gln Phe Gln Thr Leu Val Ile Leu Val Ile Phe Ser Gly Met Phe Leu  
 145 150 155 160  
 Val Phe Thr Leu Ala Gly Ala Leu Phe Leu His Gln Arg Arg Lys Tyr  
 165 170 175  
 Arg Ser Asn Lys Gly Glu Ser Pro Val Glu Pro Ala Glu Pro Cys Arg  
 180 185 190  
 Tyr Ser Cys Pro Arg Glu Glu Glu Gly Ser Thr Ile Pro Ile Gln Glu  
 195 200 205  
 Asp Tyr Arg Lys Pro Glu Pro Ala Cys Ser Pro  
 210 215  
 <210> 28  
 <211> 657  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> PD-1 胞外结构域; CD27 跨膜结构域; CD27  
 胞内结构域  
 <400> 28  
 ccaggctggt tcttggaactc tcccagacaga ccttggaacc ctccaacatt cagccccgct 60  
 ctgctggtgg ttaccgaggg cgataatgcc accttcacct gtagcttcag caacaccagc 120  
 gagagcttcg tgcgaactg gtacagaatg agccccagca accagaccga caagctggcc 180  
 gcctttcctg aggatagatc tcagcccggc caggactgcc ggttcagagt tacacagctg 240  
 cccaacggcc gggacttcca catgtctgtc gtccgggcca gaagaaacga cagcggcaca 300  
 tatctgtgcg gcgccatttc tctggcccct aaggtcaga tcaaagagag cctgagagcc 360  
 gagctgagag tgacagaaag acgggcccga gtgccacag ctcacccttc accttctcca 420  
 agacctgccg gccagtttca gacctggtc atcctcgtga tcttcagcgg catgttcctg 480  
 gtgttcacac tggttgccgc cctgtttctg caccagcgga gaaagtacag aagcaacaag 540  
 ggagagagcc ccgtggaacc tgccgagcct tgtagataca gctgtcccag agaggaagag 600  
 ggcagcaca tccccatcca agaggactac agaaagccc agcctgcctg ctctcct 657

<210> 29  
 <211> 261  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> PD-1 胞外结构域; CD27 跨膜结构域; CD27  
 胞内结构域; 4-1BB 胞内结构域  
 <400> 29  
 Pro Gly Trp Phe Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp Asn Pro Pro Thr  
 1 5 10 15  
 Phe Ser Pro Ala Leu Leu Val Val Thr Glu Gly Asp Asn Ala Thr Phe  
 20 25 30  
 Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val Leu Asn Trp Tyr  
 35 40 45  
 Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala Ala Phe Pro Glu  
 50 55 60  
 Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Cys Arg Phe Arg Val Thr Gln Leu  
 65 70 75 80  
 Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Val Arg Ala Arg Arg Asn  
 85 90 95  
 Asp Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu Ala Pro Lys Ala  
 100 105 110  
 Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val Thr Glu Arg Arg  
 115 120 125  
 Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro Ser Pro Arg Pro Ala Gly  
 130 135 140  
 Gln Phe Gln Thr Leu Val Ile Leu Val Ile Phe Ser Gly Met Phe Leu  
 145 150 155 160  
 Val Phe Thr Leu Ala Gly Ala Leu Phe Leu His Gln Arg Arg Lys Tyr  
 165 170 175  
 Arg Ser Asn Lys Gly Glu Ser Pro Val Glu Pro Ala Glu Pro Cys Arg  
 180 185 190  
 Tyr Ser Cys Pro Arg Glu Glu Glu Gly Ser Thr Ile Pro Ile Gln Glu  
 195 200 205  
 Asp Tyr Arg Lys Pro Glu Pro Ala Cys Ser Pro Lys Arg Gly Arg Lys  
 210 215 220  
 Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr  
 225 230 235 240  
 Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu  
 245 250 255  
 Gly Gly Cys Glu Leu  
 260  
 <210> 30  
 <211> 783  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>

<223> PD-1 胞外结构域; CD27 跨膜结构域; CD27

胞内结构域; 4-1BB 胞内结构域

<400> 30

```
ccaggctggt tcctggactc tcccacaga ctttgaacc ctccaacatt cagccccgt      60
ctgctggtgg ttaccgagg cgataatgcc accttcacct gtagcttcag caacaccage      120
gagagcttcg tgctgaactg gtacagaatg agccccagca accagaccga caagctggcc      180
gcctttcctg aggatagatc tcagcccggc caggactgcc ggttcagagt tacacagctg      240
cccaacggcc gggacttcca catgtctgtc gtccgggcca gaagaaacga cagcggcaca      300
tatctgtgcg gcgccatttc tctggcccct aaggctcaga tcaaagagag cctgagagcc      360
gagctgagag tgacagaaag acgggcccga gtgccacag ctcaccctc accttctcca      420
agacctgccg gccagtttca gacctgtgtc atctctgtga tcttcagcgg catgttcttg      480
gtgttcacac tggttggcgc cctgtttctg caccagcggg gaaagtacag aagcaacaag      540
ggcgagagcc cgttggaacc tgccgagcct tgtagataca gctgtcccag agaggaagag      600
ggcagcaca tccccatcca agaggactac agaaagccc agcctgectg ctctcccaag      660
agaggcagaa agaagctgct gtacatcttc aagcagccct tcattgcggc cgtgcagacc      720
acacaagagg aagatggctg ctctgcaga ttccccgagg aagaagaagg cggctgcgag      780
ctt
```

<210> 31

<211> 209

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> PD-1 胞外结构域; ICOS 跨膜结构域; ICOS

[0012]

胞内结构域

<400> 31

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

	Lys	Lys	Tyr	Ser	Ser	Ser	Val	His	Asp	Pro	Asn	Gly	Glu	Tyr	Met	Phe	
				180					185					190			
	Met	Arg	Ala	Val	Asn	Thr	Ala	Lys	Lys	Ser	Arg	Leu	Thr	Asp	Val	Thr	
			195				200						205				
	Leu																
	<210>	32															
	<211>	627															
	<212>	DNA															
	<213>	人工序列															
	<220>																
	<223>	PD-1 胞外结构域; ICOS 跨膜结构域; ICOS															
		胞内结构域															
	<400>	32															
	ccaggtggt	tcttgactc	tcccacaga	ccttgaacc	ctccaacatt	cagccccgt											60
	ctgtgtgtg	ttaccgagg	cgataatgc	accttcac	cttagcttc	caacaccag											120
	gagagcttc	gtctgaact	gtacagaat	agccccag	accagaccg	caagctggc											180
	gcctttctg	aggatagat	tcagcccg	caggactgc	ggttcagag	tacacagct											240
	cccaacggc	gggacttcc	catgtctgt	gtccgggca	gaagaaacg	cagcggcac											300
	tatctgtgc	gcgccattc	tctggccct	aaggtcaga	tcaaagag	cctgagagc											360
	gagctgag	tgacagaa	acgggccga	gtgccacag	ctcaccctc	accttctcc											420
	agacctgcc	gccagtttc	gaccttggt	ttctggctg	ctatcggtg	tgccgcttt											480
	gtggtcgtg	gcctcctgg	ctgcctcct	atctgctgg	tgaccaaga	aaagtacag											540
[0013]	agcagctgc	acgacccca	cgcgagtag	atgttcata	gagccgtga	caccgcca											600
	aagtcagac	tgaccgacg	gacctt														627
	<210>	33															
	<211>	240															
	<212>	PRT															
	<213>	人工序列															
	<220>																
	<223>	PD-1 胞外结构域; 4-1BB 跨膜结构域; 4-1BB															
		胞内结构域															
	<400>	33															
	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	Pro	Gly	Trp	Phe	Leu	Asp	Ser	Pro	Asp	Arg	Pro	
				20					25					30			
	Trp	Asn	Pro	Pro	Thr	Phe	Ser	Pro	Ala	Leu	Leu	Val	Val	Thr	Glu	Gly	
			35				40					45					
	Asp	Asn	Ala	Thr	Phe	Thr	Cys	Ser	Phe	Ser	Asn	Thr	Ser	Glu	Ser	Phe	
		50				55					60						
	Val	Leu	Asn	Trp	Tyr	Arg	Met	Ser	Pro	Ser	Asn	Gln	Thr	Asp	Lys	Leu	
	65				70					75					80		
	Ala	Ala	Phe	Pro	Glu	Asp	Arg	Ser	Gln	Pro	Gly	Gln	Asp	Cys	Arg	Phe	
				85					90					95			
	Arg	Val	Thr	Gln	Leu	Pro	Asn	Gly	Arg	Asp	Phe	His	Met	Ser	Val	Val	
				100				105						110			

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

<210> 34

<211> 720

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> PD-1 胞外结构域; 4-1BB 跨膜结构域; 4-1BB

胞内结构域

[0014]

<400> 34

atggccctgc ccgtgaccgc cctgctcctg cctctggctc tgctgctgca tgccgccaga 60  
 cctcccggct ggttctctgga cagccccgac agaccctgga accctccac cttcagccct 120  
 gccctgctcg tggtagacaga gggcgacaac gccaccttca cctgtagctt cagcaacacc 180  
 agcgagagct tcgtgctgaa ctggtacaga atgagcccca gcaaccagac cgacaagctg 240  
 gccgccttcc ccgaggacag aagccagccc ggccaggact gccggttcag agtgaccag 300  
 ctgcccacag gccgggactt ccacatgagc gtggtgcgcg ccagacggaa cgacagcggc 360  
 acatacctgt gcggcgccat cagcctggcc cctaaggccc agatcaaaga gaggctgcgg 420  
 gccgagctga gaggtagcga gagaagggcc gaggtgccca ccgccaccc tagcccatct 480  
 ccaagacctg ccggccagtt ccagaccctg gtgatcatct cattctttct ggccctgacc 540  
 agcacagccc tgctgtttct gctgtttctt ctgaccctgc ggttcagcgt ggtgaaacgg 600  
 ggcagaaaga agctgctgta catcttcaag cagcccttca tgcggcccgt gcagaccacc 660  
 caggaagaag acggctgcag ctgccggttc cccgaagaag aagaggcgcg ctgcgaactg 720

<210> 35

<211> 239

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> PD-1 胞外结构域; CD28 跨膜结构域; CD28

胞内结构域

<400> 35

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 Pro Gly Trp Phe Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro

	20	25	30
	Trp Asn Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala Leu Leu Val Val Thr Glu Gly		
	35	40	45
	Asp Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe		
	50	55	60
	Val Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu		
	65	70	75
	Ala Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Cys Arg Phe		
	85	90	95
	Arg Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Val		
	100	105	110
	Arg Ala Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser		
	115	120	125
	Leu Ala Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg		
	130	135	140
	Val Thr Glu Arg Arg Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro Ser		
	145	150	155
	Pro Arg Pro Ala Gly Gln Phe Gln Thr Leu Val Phe Trp Val Leu Val		
	165	170	175
	Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala		
	180	185	190
	Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser		
	195	200	205
[0015]	Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His		
	210	215	220
	Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser		
	225	230	235
	<210> 36		
	<211> 717		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> PD-1 胞外结构域; CD28 跨膜结构域; CD28		
	胞内结构域		
	<400> 36		
	atggccctgc ctgtgacagc tctgctgctg cctcttgctc tgcttctgca tgccgctaga	60	
	cctccagget ggttcttgga ctctcccgac agaccttgga accctccaac attcagcccc	120	
	gctctgctgg tggttaccga gggcgataat gccaccttca cctgtagctt cagcaacacc	180	
	agcgagagct tcgtgctgaa ctggtacaga atgagcccca gcaaccagac cgacaagctg	240	
	gccgcctttc ctgaggatag atctcagccc ggccaggact gccggttcag agttacacag	300	
	ctgcccacag gccgggactt ccacatgtct gtctgccggg ccagaagaaa cgacagcggc	360	
	acatatctgt gcggcgccat ttctctggcc cctaaggctc agatcaaaga gacctgaga	420	
	gccgagctga gactgacaga aagacgggcc gaagtgccca cagctcaccc ttcaccttct	480	
	ccaagacctg ccggccagtt tcagaccctg gtgttttggg tgctcgtggt cgttggcgga	540	
	gtgctggcct gttatagcct gctggtcacc gtggccttca tcattctttg ggtccgaagc	600	
	aagcggagcc ggtgctgca cagcgactac atgaacatga ccctagacg gcccgacct	660	
	accagaaagc actaccagcc ttacgtcct cctagagact tcgccgcta cagatct	717	

<210> 37  
 <211> 281  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> PD-1 胞外结构域; CD28 跨膜结构域; CD28  
 胞内结构域; 4-1BB 胞内结构域  
 <400> 37  
 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 Pro Gly Trp Phe Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro  
 20 25 30  
 Trp Asn Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala Leu Leu Val Val Thr Glu Gly  
 35 40 45  
 Asp Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe  
 50 55 60  
 Val Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu  
 65 70 75 80  
 Ala Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Cys Arg Phe  
 85 90 95  
 Arg Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Val  
 100 105 110  
 Arg Ala Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser  
 [0016] 115 120 125  
 Leu Ala Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg  
 130 135 140  
 Val Thr Glu Arg Arg Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro Ser  
 145 150 155 160  
 Pro Arg Pro Ala Gly Gln Phe Gln Thr Leu Val Phe Trp Val Leu Val  
 165 170 175  
 Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala  
 180 185 190  
 Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser  
 195 200 205  
 Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His  
 210 215 220  
 Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Lys  
 225 230 235 240  
 Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg  
 245 250 255  
 Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro  
 260 265 270  
 Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu  
 275 280  
 <210> 38  
 <211> 843  
 <212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> PD-1 胞外结构域; CD28 跨膜结构域; CD28

胞内结构域; 4-1BB 胞内结构域

<400> 38

```

atggccctgc ctgtgacagc tctgtgctg cctcttgctc tgcttctgca tgccgctaga      60
cctccaggct ggttcctgga ctctcccgac agaccttgga accctccaac attcagcccc      120
gctctgctgg tggttaccga gggcgataat gccaccttca cctgtagctt cagcaacacc      180
agcgagagct tcgtgctgaa ctggtacaga atgagcccca gcaaccagac cgacaagctg      240
gccgcctttc ctgaggatag atctcagccc ggccaggact gccggttcag agttacacag      300
ctgcccacag gccgggactt ccacatgtct gtcgtccggg ccagaagaaa cgacagcggc      360
acatatctgt gcggcgccat ttctctggcc cctaaggctc agatcaaaga gaccctgaga      420
gccgagctga gactgacaga aagacgggcc gaagtgccca cagctcacc ttcaccttct      480
ccaagacctg ccggccagtt tcagaccctg gtgttttggg tgctcgtggt cgttggcgga      540
gtgctggcct gttatagcct gctggtcacc gtggccttca tcatcttttg ggtccgaagc      600
aagcggagcc ggctgctgca cagcgactac atgaacatga ccctagacg gcccggacct      660
accagaaagc actaccagcc ttacgtcctc ctagagact tcgccgcta cagatccaag      720
cggggcagaa agaagctgct gtacatcttc aagcagcctc tcatgcggcc cgtgcagacc      780
acacaagagg aagatggctg ctctgcaga ttccccgagg aagaagaagg cggctgcgag      840
ctt                                         843

```

<210> 39

<211> 240

<212> PRT

[0017]

<213> 人工序列

<220>

<223> PD-1 胞外结构域; CD27 跨膜结构域; CD27

胞内结构域

<400> 39

```

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

```

	145	150	155	160
	Pro Arg Pro Ala Gly Gln Phe Gln Thr Leu Val Ile Leu Val Ile Phe			
		165	170	175
	Ser Gly Met Phe Leu Val Phe Thr Leu Ala Gly Ala Leu Phe Leu His			
		180	185	190
	Gln Arg Arg Lys Tyr Arg Ser Asn Lys Gly Glu Ser Pro Val Glu Pro			
		195	200	205
	Ala Glu Pro Cys Arg Tyr Ser Cys Pro Arg Glu Glu Glu Gly Ser Thr			
		210	215	220
	Ile Pro Ile Gln Glu Asp Tyr Arg Lys Pro Glu Pro Ala Cys Ser Pro			
	225	230	235	240
	<210> 40			
	<211> 720			
	<212> DNA			
	<213> 人工序列			
	<220>			
	<223> PD-1 胞外结构域; CD27 跨膜结构域; CD27			
	胞内结构域			
	<400> 40			
	atggccctgc ctgtgacagc tctgctgctg cctcttgctc tgctttctgca tgccgctaga	60		
	cctccagget ggttcttgga ctctcccgac agaccttgga accctccaac attcagcccc	120		
	gctctgctgg tggttaccga gggcgataat gccacettca cctgtagctt cagcaacacc	180		
	agcgagagct tctgtctgaa ctggtacaga atgagcccca gcaaccagac cgacaagctg	240		
[0018]	gccgcctttc ctgaggatag atctcagccc ggccaggact gccggttcag agttacacag	300		
	ctgcccacag gccgggactt ccacatgtct gtcgtccggg ccagaagaaa cgacagcggc	360		
	acatatctgt gcggcgccat ttctctggcc cctaaggctc agatcaaaga ggcctgaga	420		
	gccgagctga gaggacaga aagacgggcc gaagtgccca cagctcacc ttcaccttct	480		
	ccaagacctg ccggccagtt tcagaccctg gtcacctctg tgatcttcag cggcattgtc	540		
	ctggtgttca cactggctgg cgccctgttt ctgcaccagc ggagaaagta cagaagcaac	600		
	aaggcgaga gccccgtgga acctgccgag cctttagat acagctgtcc cagagaggaa	660		
	gagggcagca caatcccat ccaagaggac tacagaaagc ccgagcctgc ctgctctcct	720		
	<210> 41			
	<211> 282			
	<212> PRT			
	<213> 人工序列			
	<220>			
	<223> PD-1 胞外结构域; CD27 跨膜结构域; CD27			
	胞内结构域; 4-1BB 胞内结构域			
	<400> 41			
	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 Pro Gly Trp Phe Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro			
	20 25 30			
	Trp Asn Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala Leu Leu Val Val Thr Glu Gly			
	35 40 45			
	Asp Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe			
	50 55 60			

[0019]

Val Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu	
65	80
Ala Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Cys Arg Phe	
85	95
Arg Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Val	
100	110
Arg Ala Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser	
115	125
Leu Ala Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg	
130	140
Val Thr Glu Arg Arg Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro Ser	
145	160
Pro Arg Pro Ala Gly Gln Phe Gln Thr Leu Val Ile Leu Val Ile Phe	
165	175
Ser Gly Met Phe Leu Val Phe Thr Leu Ala Gly Ala Leu Phe Leu His	
180	190
Gln Arg Arg Lys Tyr Arg Ser Asn Lys Gly Glu Ser Pro Val Glu Pro	
195	205
Ala Glu Pro Cys Arg Tyr Ser Cys Pro Arg Glu Glu Glu Gly Ser Thr	
210	220
Ile Pro Ile Gln Glu Asp Tyr Arg Lys Pro Glu Pro Ala Cys Ser Pro	
225	240
Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met	
245	255
Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe	
260	270
Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu	
275	280

<210> 42  
 <211> 846  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> PD-1 胞外结构域; CD27 跨膜结构域; CD27  
         胞内结构域; 4-1BB 胞内结构域  
 <400> 42

atggccctgc ctgtgacagc tctgctgctg cctcttgctc tgettctgca tgccgetaga	60
cctccaggct gggttcctgga ctctcccgac agaccttgga accctccaac attcagcccc	120
gctctgctgg tggttaccga gggcgataat gccaccttca cctgtagctt cagcaacacc	180
agcgagagct tcgtgctgaa ctggtacaga atgagcccca gcaaccagac cgacaagctg	240
gccgcctttc ctgaggatag atctcagccc ggccaggact gccggttcag agttacacag	300
ctgcccacg gccgggactt ccacatgtct gtcgtccggg ccagaagaaa cgacagcggc	360
acatatctgt gcggcgccat ttctctggcc cctaaggctc agatcaaaga gagectgaga	420
gccgagctga gactgacaga aagacgggcc gaagtgccca cagctcacc ttcaccttct	480
ccaagacctg ccggccagtt tcagaccctg gtcctcctcg tgatcttcag cggcattgtc	540
ctggtgttca cactggctgg cgccctgttt ctgcaccage ggagaaagta cagaagcaac	600
aaggcgagaga gccccgtgga acctgccgag ccttgtagat acagctgtcc cagagaggaa	660

	gagggcagca caatcccat ccaagaggac tacagaaagc ccgagcctgc ctgctctccc	720
	aagagaggca gaaagaagct gctgtacatc ttcaagcagc cttcatgcg gcccggtgcag	780
	accacacaag aggaagatgg ctgctcctgc agattccccg aggaagaaga aggcggctgc	840
	gagctt	846
	<210> 43	
	<211> 230	
	<212> PRT	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> PD-1 胞外结构域; ICOS 跨膜结构域; ICOS 胞内结构域	
	<400> 43	
	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 Pro Gly Trp Phe Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro	
	20 25 30	
	Trp Asn Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala Leu Leu Val Val Thr Glu Gly	
	35 40 45	
	Asp Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe	
	50 55 60	
	Val Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu	
	65 70 75 80	
[0020]	Ala Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Cys Arg Phe	
	85 90 95	
	Arg Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Val	
	100 105 110	
	Arg Ala Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser	
	115 120 125	
	Leu Ala Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg	
	130 135 140	
	Val Thr Glu Arg Arg Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro Ser	
	145 150 155 160	
	Pro Arg Pro Ala Gly Gln Phe Gln Thr Leu Val Phe Trp Leu Pro Ile	
	165 170 175	
	Gly Cys Ala Ala Phe Val Val Val Cys Ile Leu Gly Cys Ile Leu Ile	
	180 185 190	
	Cys Trp Leu Thr Lys Lys Lys Tyr Ser Ser Ser Val His Asp Pro Asn	
	195 200 205	
	Gly Glu Tyr Met Phe Met Arg Ala Val Asn Thr Ala Lys Lys Ser Arg	
	210 215 220	
	Leu Thr Asp Val Thr Leu	
	225 230	
	<210> 44	
	<211> 690	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	

<223> PD-1 胞外结构域; ICOS 跨膜结构域; ICOS  
胞内结构域

<400> 44

[0021]

atggccctgc ctgtgacagc tctgctgctg cctcttgctc tgcttctgca tgccgctaga	60
cctccaggct ggttcctgga ctctcccgac agaccttgga accctccaac attcagcccc	120
gctctgctgg tggttaccga gggcgataat gccaccttca cctgtagctt cagcaacacc	180
agcgagagct tcgtgctgaa ctggtacaga atgagcccca gcaaccagac cgacaagctg	240
gccgcctttc ctgaggatag atctcagccc ggccaggact gccggttcag agttacacag	300
ctgcccacg gccgggactt ccacatgtct gtcgtccggg ccagaagaaa cgacagcggc	360
acatatctgt gcggcgccat ttctctggcc cctaaggctc agatcaaaga gaggctgaga	420
gccgagctga gaggacaga aagacgggcc gaagtgcccc cagctcacc ttcaccttct	480
ccaagacctg ccggccagtt tcagacctg gtgttctggc tgcctatcgg ctgtgccgct	540
tttgtggtcg tgtgcatact gggtgcata ctgatactgt ggctgaccaa gaaaaagtac	600
agcagcagcg tgcacgacct caacggcgag tacatgttca tgagagccgt gaacaccgcc	660
aagaagtcca gactgaccga cgtgaccctt	690