



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년04월02일

(11) 등록번호 10-1965040

(24) 등록일자 2019년03월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07K 14/725 (2006.01) *A61K 35/17* (2014.01)*A61K 39/395* (2006.01) *C07K 14/705* (2006.01)

(52) CPC특허분류

C07K 14/7051 (2013.01)*A61K 35/17* (2013.01)

(21) 출원번호 10-2016-7027554

(22) 출원일자(국제) 2015년03월06일

심사청구일자 2018년07월19일

(85) 번역문제출일자 2016년10월05일

(65) 공개번호 10-2016-0130451

(43) 공개일자 2016년11월11일

(86) 국제출원번호 PCT/GB2015/050649

(87) 국제공개번호 WO 2015/132604

국제공개일자 2015년09월11일

(30) 우선권주장

1403972.1 2014년03월06일 영국(GB)

(56) 선행기술조사문헌

WO2013040371 A2

WO2013040557 A2

FEBS Letters Vol.588(2):288-297(2014. 1.)

(73) 특허권자

유씨엘 비즈니스 피엘씨

영국 더블유1티 4티피 런던 토텐햄 코트 로드 97
더 네트워크 빌딩

(72) 발명자

톨레 마틴

영국 런던 더블유1티 4티피 토트넘 코트 로드 97
더 네트워크 빌딩 유씨엘 비즈니스 피엘씨 내

앤더슨 존

영국 런던 더블유1티 4티피 토트넘 코트 로드 97
더 네트워크 빌딩 유씨엘 비즈니스 피엘씨 내

토마스 시몬

영국 런던 더블유1티 4티피 토트넘 코트 로드 97
더 네트워크 빌딩 유씨엘 비즈니스 피엘씨 내

(74) 대리인

김진희, 김태홍

전체 청구항 수 : 총 13 항

심사관 : 안규정

(54) 발명의 명칭 키메라 항원 수용체

(57) 요 약

본 발명은 하기를 포함하는 디시알로강글리오시드(GD2) 결합 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체(CAR)를 제공한다:

a) 하기 서열을 갖는 상보성 결정 영역(CDR)을 갖는 중쇄 가변 영역(VH):

CDR1 - SYNIH (서열 번호 1);

CDR2 - VIWAGGSTNYNSALMS (서열 번호 2);

CDR3 - RSDDYSWFAY (서열 번호 3); 및

b) 하기 서열을 갖는 CDR을 갖는 경쇄 가변 영역(VL):

CDR1 - RASSSVSSSYLH (서열 번호 4);

CDR2 - STSNLAS (서열 번호 5);

CDR3 - QQYSGYPIT (서열 번호 6).

이러한 CAR을 발현하는 T 세포는 일부 암의 치료에 유용하다.

(52) CPC특허분류

A61K 39/39533 (2013.01)

C07K 14/70517 (2013.01)

C07K 14/70521 (2013.01)

C07K 14/70578 (2013.01)

C07K 16/3084 (2013.01)

A61K 2039/505 (2013.01)

C07K 2317/53 (2013.01)

C07K 2317/622 (2013.01)

C07K 2319/00 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

- a) 서열 번호 10으로서 나타낸 서열을 갖는 중쇄 가변 영역(VH) 도메인을 포함하는 중쇄 가변 영역(VH); 및
- b) 서열 번호 12로서 나타낸 서열을 갖는 경쇄 가변 영역(VL) 도메인을 포함하는 경쇄 가변 영역(VL)을 포함하는 디시알로강글리오시드(GD2) 결합 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체(CAR).

청구항 2

제1항에 있어서, GD2 결합 도메인은 서열 번호 8로서 나타낸 서열을 포함하는 것인 CAR.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 서열 번호 27 내지 서열 번호 35 중 어느 것으로서 나타낸 서열 또는 적어도 80% 서열 동일성을 가지면서 i) GD2에 결합하고 ii) T 세포 신호전달을 유도하는 능력을 보유하는 이의 변이체를 포함하는 CAR.

청구항 4

제1항의 CAR을 코딩하는 핵산.

청구항 5

제4항에 있어서, 서열 번호 25로서 나타낸 서열 또는 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 이의 변이체를 포함하는 핵산.

청구항 6

제4항에 있어서, 자살 유전자를 또한 코딩하는 핵산.

청구항 7

제4항의 핵산을 포함하는 벡터.

청구항 8

제1항의 CAR을 발현하는 생체 외(*ex vivo*) 세포.

청구항 9

제1항의 CAR 및 자살 유전자를 공발현하는 생체 외 세포.

청구항 10

제9항에 있어서, 자살 유전자는 iCasp9 또는 RQR8인 생체 외 세포.

청구항 11

제8항 내지 제10항 중 어느 하나의 항의 생체 외 세포의 제조 방법으로서, 제4항 내지 제6항 중 어느 하나의 항의 핵산을 생체 외 T 세포 내에 도입하는 단계를 포함하는 세포의 제조 방법.

청구항 12

제7항의 벡터 또는 제8항 내지 제10항 중 어느 하나의 항의 세포를, 약학적으로 허용 가능한 담체, 희석제 또는 부형제와 함께 포함하는, 암 치료용 약학 조성물.

청구항 13

제12항에 있어서, 암은 신경모세포종인 약학 조성물.

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 암 항원 디시알로강글리오시드(GD2)에 결합하는 키메라 항원 수용체(CAR)에 관한 것이다. 이러한 CAR을 발현하는 T 세포는 신경모세포종과 같은 암성 질환의 치료에 유용하다.

배경 기술

[0002] 디시알로강글리오시드(GD2, pubchem: 6450346)는 세포 표면에 주로 발현된 시알산 함유 글리코스팡고리피드이다. 상기 탄소화물 항원의 기능은 완전히 이해되지 않지만; 종양 세포의 기질 단백질로의 부착에 중요한 역할을 하는 것으로 생각된다. GD2는 신경모세포종 상에, 밀집하고 균질하게 및 거의 어디에서나 발현된다. 정상 조직에서, GD2 발현은 대체로 피부 멜라닌세포, 및 말초 통증 섬유 미엘린 수초에 한정된다. CNS 내에서, GD2는 태아 항원인 것으로 나타나지만, 산란된 희소돌기아교세포에서 및 뇌하수체 후엽 내에서 흐리게(dimly) 발현하는 것으로 밝혀졌다. 이는 GD2를 표적 항종양 치료법에 매우 적합하게 만든다.

[0003] 항-GD2 항체는 신경모세포종에서 치료법으로서 널리 시험되어왔다. 2종의 클론: 클론 3F814 및 3F8, 및 이의 유도체는 현재 임상에서 사용되고 있다. 또 다른 클론 14.187은, IgG2a(14g2a)로의 종류 변환(isotype switching) 이후 및 마지막으로 인간 IgG1로의 키메라화로 ch14.18을 형성한 후, 마우스 IgG3로서 시험되어 왔다. 이러한 후자의 항체는 무작위 연구에서 명확한 효능을 유도하였다: 미국 소아 종양 연구회(US Children's Oncology Group)에서는, 초기 치료 후 방사선 관해(radiological remission)를 달성한, 고위험 신경모세포종이 있는 소아에서의 ch14:18 무작위 3상 연구가 보고되어 있다. 이를 환자에서, 2.1년의 평균 후속으로 ch14:18 암(arm)에서 EFS에서의 20% 개선이 있었다. 중요하게는, 신경독성이 신경병증을 유도하는 만성 통증으로서 가장 흔하며 덜 흔하게는 안근마비가 이 제제에 대한 주요 투여량 제한 독성이다.

[0004] 이러한 치료적 mAbs는 계속 개량된다: ch14.18로부터 유도된 IL-2 면역사이토카인이 기술되어왔다. 이는 미세 진존 질환에는 일부 효과가 있지만, 거대 질환(bulky disease)에 대해서는 효과가 없는 꽤 독성인 제제이다. Ch14.18은 완전 인간화되었으며 이의 Fc는 상보적 활성화를 방지하도록 변이된다. 이러한 Ch14.18의 인간화 버전은 임상 연구 중이지만 매우 제한된 데이터만이 이용 가능하다. 3F8 항체의 인간화가 또한 기술되어왔다. GD2 혈청요법으로부터의 임상 데이터가 고무적이나, 지속적인 완전 관해는 여전히 제한되며 최소 질환 세팅 외에 항체에 대한 임상적으로 유용한 역할에 대한 증거는 없다.

[0005] 따라서 신경모세포종 및 기타 GD2 발현 암을 치료하기 위한 개선된 치료 접근법에 대한 필요가 존재한다.

발명의 내용

[0006] 키메라 항원 수용체(CAR)

[0007] 키메라 항원 수용체는, 이들의 일반 포맷에서, T 세포의 이팩터 기능에 단일클론 항체(mAb)의 특이성을 접목한 단백질이다. 이들의 일반 형태는 항원 인식 아미노 말단, 스페이서, 막관통 도메인이 모두 T 세포 생존 및 활성화 신호를 전송하는 복합 엔도도메인에 연결된 타입 I 막관통 도메인 단백질의 형태이다(도 1 (a) 참조).

[0008] 이를 분자의 가장 흔한 형태는 표적 항원을 인식하는 단일클론 항체에서 유래하는 단일쇄 가변 단편(scFv)의 융합으로, 이는 스페이서 및 막관통 도메인을 통해 신호전달 엔도도메인에 융합된다. 이러한 분자들은 이의 표적의 scFv에 의한 인식에 반응하여 T 세포의 활성화를 유도한다. T 세포가 이러한 CAR을 발현하면, T 세포는 표적 항원을 발현하는 표적 세포를 인식하여 사멸시킨다. 몇 가지 CAR이 종양 관련 항원에 대항해 개발되었으며, 이러한 CAR 발현 T 세포를 이용하는 입양 전달 접근법이 현재 다양한 암의 치료를 위한 임상 시험 중에 있다.

[0009] 항원 결합 도메인이 scFv 14g2a에 기초한 GD2에 대한 키메라 항원 수용체가 기술되어 있다(WO 2013/040371 및 Yvon et al(2009, Clin Cancer Res 15:5852-5860)).

[0010] 14g2a-CD28-OX40-ζ CAR 발현 인간 T 세포는 일부 항종양 활성을 갖지만 질환을 완전히 극복시킬 수는 없는 것으로 나타났다(Yvon et al(2009), 상기와 동일).

[0011] 본 발명의 발명자들은 개선된 특성을 갖는 대체적인 GD2-표적 CAR을 제조하고자 하였다.

도면의 간단한 설명

[0012] 도 1 - 키메라 항원 수용체(CAR) 디자인.

(a) CAR의 일반적인 아키텍처: 결합 도메인이 항원을 인식하고; 스페이서가 세포 표면으로부터 결합 도메인을 들어올리며; 막관통 도메인은 단백질을 막에 고정하고 엔도도메인은 신호를 전송한다. (b)~(d): CAR 엔도도메인의 상이한 세대 및 과변이(permutation): (b) 초기 디자인은 Fc ε R1-γ 또는 CD3□ 엔도도메인을 통해 ITAM 신호 단독을 전송하고, 한편 후기 디자인들은 추가 (c) 1가지 또는 (d) 2가지 공자극성 신호를 시스로 전송한다.

도 2 - 하기로 구성되는 항-GD2 CAR의 변이체: (a) 인간 IgG1 스페이서 및 CD28-OX40-제타 엔도도메인을 갖는 scFv로서 마우스 KM666 항체를 이용하는 항-GD2 CAR; (b) (a)와 동일한 포맷으로 Nakamura 인간화 항체 huKM666를 이용하는 항-GD2 CAR; (c) Fc 도메인이 Fc 수용체 인식 모티프를 제거하도록 수식된 점을 제외하면 (b)와 동일한 포맷; (d) 스페이서가 IgG1 힌지(hinge) - CD8 스톡(stalk)이라는 점을 제외하면 (c)와 동일한 포맷; (e) 스페이서가 CD8 스톡뿐인 점을 제외하면 (c)와 동일; (f) 스페이서가 IgG1 힌지뿐인 점을 제외하면 (c)와 동일.

도 3 - muKM666 및 huKM666 기초 CAR의 비교. (a) 3명의 정상 공여자로부터의 말초 혈액 T 세포 상의 발현; (b) 히스토그램으로서 나타낸 상기 FACS 플롯의 평균-형광 강도; (c) A204(GD2 음성), 및 LAN-1(GD2 양성) 표적에 대한 이펙터로서 비형질도입, muKM666 및 huKM666 형질도입 T 세포를 사용하는 크롬 방출 어세이; (d) 동일한 챌린지(challenge)로부터의 IL-2 생성; (e) 동일한 챌린지로부터의 인터페론-감마 생성; 및 (f) 동일한 챌린지로부터의 배수 증식.

도 4. (a) CD34 마커 유전자의 CAR과의 1:1 공발현을 가능하게 하는 레트로바이러스 작제물; (b) CAR 발현(HA 태그) 대 CD34 마커 유전자의 유세포 분석; (c) 비형질도입 T 세포 및 GD2 양성 표적(LAN-1), 및 GD2 음성 표적(A204)에 대한 3가지 상이한 CAR 변이체로 형질도입된 T 세포의 크롬 방출 어세이; (d) 인터페론 감마 방출; (e) IL-2 방출; 및 (f) 동일한 표적 및 이펙터의 증식.

도 5 - Fc 스페이서 내로의 FcR 결합 방해 돌연변이의 도입 (a) 도입된 돌연변이; (b) 항-Fc 염색에 의해 결정되는 것과 같은 CAR의 발현: 비형질도입, wt 및 돌연변이; (c) 비형질도입, wt Fc 및 돌연변이 Fc 항-GD2 CAR T 세포로의 GD2 음성 및 GD2 양성 표적의 사멸; (d) FcR 발현 세포주 THP-1로의 비형질도입, wt Fc 및 돌연변이 Fc 항-GD2 T 세포의 활성화; 비형질도입, wt Fc 및 돌연변이 Fc CAR T 세포에 대응한 THP-1 세포주에 의한 IL-1베타 방출.

도 6 - 발현 카세트의 최적화

(a) 카세트 내로 도입된 맵 최적화: SAR 또는 CHS4; (b) wt 또는 코돈 최적화된 개방형 해독틀(open-reading frame)로의 상이한 수식을 갖는 CAR의 대표적 발현. SAR 작제물은 발현의 타이트(tight)한 피크를 제공하며 이는 바람직한 것이다. (c) 3명의 정상 공여자로부터의 이러한 FACS 데이터의 바 차트 표현.

도 7 - 상이한 엔도도메인의 비교

3가지 상이한 키메라 항원 수용체를 비교하였다. 수용체는 모두 huK666 scFv, FcR 결합을 감소시키도록 돌연변이된 IgG1의 Fc 도메인 및 CD28 막관통 도메인을 포함한다. CAR "28tmZ"는 CD3 제타 엔도도메인을 가지고; "28Z"는 복합 CD28 - CD3제타 엔도도메인을 가지며; "280XZ"는 CD28, OX40 및 CD3제타를 포함하는 복합 엔도도메인을 가진다. 정상 공여자로부터의 말초 혈액 T 세포는 유사한 역가(titer)의 레트로바이러스 벡터와 함께 상기 작제물로 형질도입된다. 대조군으로서의 비형질도입 T 세포와 함께, 3가지 상이한 T 세포주가 비교된다. T 세포는 A204 세포(GD2 음성인 횡문근육종 세포주), 및 LAN-1 세포(GD2 양성인 신경모세포종 세포주)로 챌린지된다. 증식 및 사이토카인 방출은 수용체 활성이 $28\text{tmZ} < 28Z < 280XZ$ 임을 나타낸다.

도 8 - iCasp9 자살 유전자와의 공발현

(a) FMD-2A 서열을 이용하는 항-GD2CAR과의 iCasp9의 공발현; (b) CID 단독으로 처리된 후, NT T 세포, GD2CAR 형질도입 T 세포 및 iCasp9-2A-GD2CAR T 세포의 CAR 발현; (c) CID로 처리되거나 처리되지 않은, 비형질도입, GD2CAR 형질도입 및 iCasp9-2A-GD2CAR 형질도입 T 세포로의 GD2 양성(LAN-1) 및 음성(A204) 표적의 사멸. 5개 정상 공여자 T 세포의 평균.

도 9 - RQR8 자살 유전자와의 공발현

(a) CARhuK666Fc는 레트로바이러스 벡터에서 RQR8 부류(sort)-자살 유전자와 공발현된다. (b) T 세포는 상기 레트로바이러스 벡터로 형질도입되고 CAR 및 RQR8의 공발현은 형질도입 T 세포를 다중클론 항-Fc 및 단일클론 항체 QBend10로 염색함으로써 결정된다. (c) 상기 T 세포로부터의 CAR 양성 집단은 리툭시맙(Rituximab) 및 보체의 존재 하에 고갈될 수 있다. (d) 리툭시맙으로 고갈된 T 세포는 GD2 발현 표적을 더이상 인식하지 않는다.

도 10 - (a) GM3 생성효소 및 GD2 생성효소를 발현하는 2시스템성 벡터. (b) 상기 벡터로 형질도입된 SupT1 세포는 GD2 양성이 된다(비형질도입: 흰색 플롯; 형질도입: 회색 플롯).

도 11 - 하기 코호트 중 마우스의 개별 종양의 성장 커브: 상단 좌측: 항-GD2 CAR 지라세포를 제공받은 GD2 발

현 CT26 종양을 가진 마우스; 상단 우측: 모의 형질도입(mock-transduced) 지라세포를 제공받은 GD2 발현 CT26 종양; 하단 좌측: 항-GD2 CAR 지라세포를 갖는 GD2 음성(wt) CT26 종양; 하단 우측: 및 지라세포를 제공받지 않은 GD2 발현 CT26 종양.

도 12a~도 12c - 아미노산 서열

- A. 도 2 (a)로서 나타낸 항-GD2 CAR (*muKM666-HCH2CH3-CD28OXZ* - 서열 번호 26)
- B. 도 2 (b)로서 나타낸 항-GD2 CAR (*huKM666-HCH2CH3-CD28OXZ* - 서열 번호 27)
- C. 도 2 (c)로서 나타낸 항-GD2 CAR (*huKM666-HCH2CH3pvaa-CD28OXZ* - 서열 번호 28)
- D. 도 2 (d)로서 나타낸 항-GD2 CAR (*huKM666-HSTK-CD28OXZ* - 서열 번호 29)
- E. 도 2 (e)로서 나타낸 항-GD2 CAR (*huKM666-STK-CD28XOXZ* - 서열 번호 30)
- F. 도 2 (f)로서 나타낸 항-GD2 CAR (*huKM666-HNG-CD28OXZ* - 서열 번호 31)
- G. 도 2 (c)로서 나타냈지만 제1 세대 엔도도메인을 갖는 것인 항-GD2 CAR (*huKM666-HCH2CH3pvaa-CD28tmZ* - 서열 번호 32)
- H. 도 2 (c)로서 나타냈지만 제2 세대 엔도도메인을 갖는 것인 항-GD2 CAR (*huMK666-HCH2CH3pvaa-CD28Z* - 서열 번호 33)
- I. iCas9 자살 유전자와 공발현된 항-GD2 CAR - 서열 번호 34
- J. RQR8 자살 유전자와 공발현된 항-GD2 CAR - 서열 번호 35

도 13 - GD2의 구조

도 14 - huK666 및 14g2a CAR의 비교. (a) 시험된 작제물의 맵: 두 작제물을 1차 T 세포에서 시험하였다. 둘 모두는 RQR8 및 FMD-2A 유사 서열과 공발현된 제2 세대 GD2 CAR을 위한 레트로바이러스 백터 코딩이었다. 작제물들 간의 유일한 차이점은, 하나에서 scFv가 huK666이고 다른 것에서는 scFv가 14g2a라는 점이다. 상기 작제물로 형질도입된 T 세포는 A204(GD2 음성 횡문근육종 세포주), 및 LAN-1(GD2 양성 세포주) 각각으로 1:1로 챌린지되었다. (b) 24시간째에, 인터페론-감마를 상청액으로부터 측정하였다. huK666 CAR T 세포는 더 많은 IFN- γ 를 생성하였다. (c) 1주일 후, T 세포를 계수하였고 huK666는 더 많은 증식을 나타내었다.

도 15 - huK666 또는 14g2a 기초 제2 세대 CAR 및 신경모세포종 세포주 LAN1 간의 공배양의 유세포 분석. (a) 실험의 셋업. 1주의 공배양 후, 세포를 회수하고 유세포 분석법으로 분석하였다. CD45 발현은 림프계 세포와 비 림프계 세포를 구별하게 하였고 CD45- 세포는 LAN-1 세포였다. CD3/QBEND/10로의 추가 염색은 CAR T 세포의 계수를 가능하게 하였다. (b) T 세포 단독; (c) NT T 세포 및 LAN-1 세포; (d) huK666-28-Z CAR T 세포 및 LAN-1 세포; (e) 14g2a-28-Z CAR T 세포 및 LAN-1 세포. LAN-1 세포의 잔류물이 14g2a CAR T 세포 공배양에서 관찰되었다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0013]

본 발명의 양태의 요약

[0014]

본 발명의 발명자들은 K666 항체에 기초한 GD2 결합 도메인을 포함하는 GD2를 표적으로 하는 신규한 키메라 항원 수용체(CAR)를 구축하였다.

[0015]

항-GD2 항체 14g2a는 황금율(gold standard)로 간주될 수 있는데, 이는 상기 항체가 치료항체로서 사용되며 지금까지 CAR 연구에서 시험된 유일한 scFv이기 때문이다(PMID: 18978797). 본 발명의 발명자들은 14g2a와 제2 세대 포맷인 huK666 기초 CAR을 비교하였는데 이는 이것이 임상 연구에서 가장 널리 사용된 CAR 포맷이기 때문이다. 본 발명자들은 huK666 CAR T 세포가 더 많은 IFN- γ 를 방출하고, 보다 우수하게 증식하며 14g2a 등가물보다 완전히 사멸시킨다는 것을 발견하였다.

[0016]

따라서, 제1 양태에서, 본 발명은 하기 a) 및 b)를 포함하는 디시알로강글리오시드(GD2) 결합 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체(CAR)를 제공한다:

[0017]

a) 하기 서열을 갖는 상보성 결정 영역(CDR)을 갖는 중쇄 가변 영역(VH):

- [0018] CDR1 - SYNIH (서열 번호 1);
- [0019] CDR2 - VIWAGGSTNYNSALMS (서열 번호 2);
- [0020] CDR3 - RSDDYSWFAY (서열 번호 3); 및
- [0021] b) 하기 서열을 갖는 CDR을 갖는 경쇄 가변 영역(VL):
- [0022] CDR1 - RASSSVSSYLH (서열 번호 4);
- [0023] CDR2 - STSNLAS (서열 번호 5);
- [0024] CDR3 - QQYSGYPIT (서열 번호 6).
- [0025] GD2 결합 도메인은 서열 번호 9 또는 서열 번호 10으로서 나타낸 서열을 갖는 VH 도메인; 또는 서열 번호 11 또는 서열 번호 12로서 나타낸 서열을 갖는 VL 도메인, 또는 적어도 90% 서열 동일성을 가지면서 i) GD2에 결합하고 ii) T 세포 신호전달을 유도하는 능력을 보유하는 이의 변이체를 포함할 수 있다.
- [0026] GD2 결합 도메인은 서열 번호 7 또는 서열 번호 8로서 나타낸 서열 또는 적어도 90% 서열 동일성을 가지면서 i) GD2에 결합하고 ii) T 세포 신호전달을 유도하는 능력을 보유하는 이의 변이체를 포함할 수 있다.
- [0027] 막관통 도메인은 서열 번호 13으로서 나타낸 서열 또는 적어도 90% 서열 동일성을 가지면서 i) GD2에 결합하고 ii) T 세포 신호전달을 유도하는 능력을 보유하는 이의 변이체를 포함할 수 있다.
- [0028] GD2 결합 도메인 및 막관통 도메인이 스페이서에 의해 연결될 수 있다.
- [0029] 스페이서는 하기:
- [0030] 인간 IgG1 Fc 도메인; IgG1 헌지; IgG1 헌지-CD8 스톡; 또는 CD8 스톡
- [0031] 중 하나를 포함할 수 있다.
- [0032] 스페이서는 IgG1 헌지-CD8 스톡 또는 CD8 스톡을 포함할 수 있다.
- [0033] 스페이서는 IgG1 Fc 도메인 또는 이의 변이체를 포함할 수 있다.
- [0034] 스페이서는 서열 번호 23 또는 서열 번호 24로서 나타낸 서열 또는 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 이의 변이체를 포함하는 IgG1 Fc 도메인을 포함할 수 있다.
- [0035] CAR은 세포내 T 세포 신호전달 도메인을 포함하거나 이와 관련될 수 있다.
- [0036] 세포내 T 세포 신호전달 도메인은 하기 엔도도메인:
- [0037] CD28 엔도도메인; OX40 및 CD3-제타 엔도도메인
- [0038] 중 하나 이상을 포함할 수 있다.
- [0039] 세포내 T 세포 신호전달 도메인은 하기 엔도도메인:
- [0040] CD28 엔도도메인; OX40 및 CD3-제타 엔도도메인
- [0041] 전부를 포함할 수 있다.
- [0042] CAR은 서열 번호 26 내지 35 중 어느 하나로서 나타낸 서열 또는 적어도 80% 서열 동일성을 가지면서 i) GD2에 결합하고 ii) T 세포 신호전달을 유도하는 능력을 보유하는 이의 변이체를 포함할 수 있다.
- [0043] 제2 양태에서, 본 발명은 본 발명의 제1 양태에 따른 CAR을 코딩하는 핵산 서열을 제공한다.
- [0044] 핵산 서열은 코돈 최적화된 것일 수 있다.
- [0045] 핵산 서열은 서열 번호 25로서 나타낸 서열 또는 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 이의 변이체를 포함할 수 있다.
- [0046] 핵산은 또한 자살 유전자를 코딩할 수 있다.
- [0047] 제3 양태에서, 본 발명은 본 발명의 제2 양태에 따른 핵산 서열을 포함하는 벡터를 제공한다.
- [0048] 제4 양태에서, 본 발명은 본 발명의 제1 양태에 따른 CAR을 발현하는 세포를 제공한다. 세포는 세포용해성 면역

세포, 예컨대 T 세포 또는 자연 살해(NK) 세포일 수 있다.

[0049] 세포는 본 발명의 제1 양태에 따른 CAR 및 자살 유전자를 공발현할 수 있다.

[0050] 자살 유전자는, 예를 들어, iCasp9 또는 RQR8일 수 있다.

[0051] 제5 양태에서, 본 발명은 본 발명의 제4 양태에 따른 세포의 제조 방법으로서, 본 발명의 제2 양태에 따른 핵산을 세포 내에 도입하는 단계를 포함하는 제조 방법을 제공한다.

[0052] 제6 양태에서, 본 발명은 본 발명의 제3 양태에 따른 벡터 또는 본 발명의 제2 양태에 따른 세포를 약학적으로 허용 가능한 담체, 희석제 또는 부형제와 함께 포함하는 약학 조성물을 제공한다.

[0053] 제7 양태에서, 본 발명은 암 치료 방법으로서, 본 발명의 제3 양태에 따른 벡터 또는 본 발명의 제4 양태에 따른 세포를 피험체에게 투여하는 단계를 포함하는 치료 방법을 제공한다.

[0054] 암은 신경모세포종일 수 있다.

[0055] 제8 양태에서, 본 발명은 암의 치료에 사용하기 위한 본 발명의 제3 양태에 따른 벡터 또는 본 발명의 제4 양태에 따른 세포를 제공한다.

[0056] 제9 양태에서, 본 발명은 암의 치료를 위한 약제의 제조에서 본 발명의 제3 양태에 따른 용도 또는 본 발명의 제4 양태에 따른 세포를 제공한다.

[0057] 제10 양태에서, 본 발명은 GD2 발현 세포의 제조 방법으로서 GM3 생성효소를 코딩하는 핵산 및 GD2 생성효소를 코딩하는 핵산을 세포 내로 도입하는 단계를 포함하는 제조 방법을 제공한다.

[0058] 제11 양태에서, 본 발명은 GM3 생성효소를 코딩하는 이종 핵산 및 GD2 생성효소를 코딩하는 이종 핵산을 포함하는 GD2 발현 세포를 제공한다.

[0059] 제12 양태에서, 본 발명은 시험관 내(*in vitro*)에서 본 발명의 제4 양태에 따른 세포의 자극 방법으로서, 세포를 본 발명의 제11 양태에 따른 GD2 발현 세포와 접촉시키는 단계를 포함하는 자극 방법을 제공한다.

[0060] 제13 양태에서, 본 발명은 스캐폴드 부착 부위(SAR)를 포함하는 CAR을 발현하는 발현 카세트를 제공한다.

[0061] 발현 카세트는 본 발명의 제1 양태에 따른 CAR을 발현할 수 있다.

구체적인 내용

[0063] 키메라 항원 수용체(CAR)

[0064] 키메라 항원 수용체(CAR)는 또한 키메라 T 세포 수용체, 인공 T 세포 수용체 및 키메라 면역수용체로도 공지되어 있으며, 이는 면역성 이팩터 세포 상에 임의의 특이성을 접목시킨 조작된 수용체이다. 전통적인 CAR에서는, 단일클론 항체의 특이성이 T 세포 상에 접목된다. CAR-코딩 핵산이 예를 들면, 레트로바이러스 벡터를 사용하여 T 세포에 전달될 수 있다. 이러한 방식으로, 다수의 암 특이적 T 세포가 입양 세포 전달을 위해 생성될 수 있다. 상기 접근법의 1상 임상시험은 효능을 보인다.

[0065] CAR의 표적-항원 결합 도메인은 흔히 스페이서 및 막판통 도메인을 통해 신호전달 엔도도메인에 융합된다. CAR이 표적-항원에 결합하면, 이는 이것이 발현된 T 세포로 활성화 신호의 전달을 유도한다.

[0066] 본 발명의 CAR은 KM666 단일클론 항체에 기초한 GD2 결합 도메인을 포함한다(Nakamura et al (2001) Cancer Immunol. Immunother. 50:275-284).

[0067] 본 발명의 CAR은 하기 a) 및 b)를 포함하는 GD2 결합 도메인을 포함한다:

[0068] a) 하기 서열을 갖는 상보성 결정 영역(CDR)을 갖는 중쇄 가변 영역(VH):

[0069] CDR1 - SYNIH (서열 번호 1);

[0070] CDR2 - VIWAGGSTNYNSALMS (서열 번호 2);

[0071] CDR3 - RSDDYSWFAY (서열 번호 3); 및

[0072] b) 하기 서열을 갖는 CDR을 갖는 경쇄 가변 영역(VL):

[0073] CDR1 - RASSSVSSSYLH (서열 번호 4);

- [0074] CDR2 - STSNLAS (서열 번호 5);
- [0075] CDR3 - QQYSGYPIT (서열 번호 6).
- [0076] 하나 이상의 돌연변이(치환, 첨가 또는 결실)를, GD2 결합 활성에 부정적인 영향을 미치지 않으면서 그 CDR에 또는 각 CDR에 도입하는 것이 가능할 수 있다. 각 CDR은, 예를 들어, 1개, 2개 또는 3개의 아미노산 돌연변이를 가질 수 있다.
- [0077] 본 발명의 CAR은 하기 아미노산 서열 중 하나를 포함할 수 있다:
- [0078] 서열 번호 7 (젖과(Murine) KM666 서열)
- [0079] QVQLKESGPVLVAPSQTLSITCTVSGFSLASYNIHWRQPPGKGLELGVIWAGGSTNYNSALMSRLSISKDNSKSQVFLQMNSLQTDDTAMYCAKRSDDYSWFAYWGQGTLTVVSAGGGGGGGGGGGSENVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCRASSSVSSYLHWYQQKSGASPKVWIYSTSNLASGVPGRFSGSGSGTYSYSLTISSVEAEDAATYYCQQYSGYPITFGAGTKVEVKR
- [0080] 서열 번호 8 (인간화 KM666 서열)
- [0081] QVQLQESGPGLVKPSQTLSITCTVSGFSLASYNIHWRQPPGKGLELGVIWAGGSTNYNSALMSRLTISKDNSKNQVFLKMSSLTAADTAVYYCAKRSDDYSWFAYWGQGTLTVSSGGGGGGGGGGSENMQTQSPSSLASVGDRVMTCRASSSVSSSYLHWYQQKSGKAPKVWIYSTSNLASGVPSRFSGSGSGTDTYLTIISSLQPEDFATYYCQQYSGYPITFGQGTKEIKR
- [0082] 본 발명의 CAR은 하기 VH 서열 중 하나를 포함할 수 있다:
- [0083] 서열 번호 9 (젖과 KM666 VH 서열)
- [0084] QVQLKESGPVLVAPSQTLSITCTVSGFSLASYNIHWRQPPGKGLELGVIWAGGSTNYNSALMSRLSISKDNSKSQVFLQMNSLQTDDTAMYCAKRSDDYSWFAYWGQGTLTVSA
- [0085] 서열 번호 10 (인간화 KM666 VH 서열)
- [0086] QVQLQESGPGLVKPSQTLSITCTVSGFSLASYNIHWRQPPGKGLELGVIWAGGSTNYNSALMSRLTISKDNSKNQVFLKMSSLTAADTAVYYCAKRSDDYSWFAYWGQGTLTVSS
- [0087] 본 발명의 CAR은 하기 VL 서열 중 하나를 포함할 수 있다:
- [0088] 서열 번호 11 (젖과 KM666 VL 서열)
- [0089] ENVLQSPAAMSASPGEKVTMTCRASSSVSSYLHWYQQKSGASPKVWIYSTSNLASGVPGRFSGSGSGTSYSLTISSVEAEDAATYYCQQYSGYPITFGAGTKVEVK
- [0090] 서열 번호 12 (인간화 KM666 VH 서열)
- [0091] ENQMTQSPSSLASVGDRVMTCRASSSVSSYLHWYQQKSGKAPKVWIYSTSNLASGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQYSGYPITFGQGTTKVEIK
- [0092] 본 발명의 CAR은, (적절한 경우, 상보적 VL 또는 VH 도메인과 함께일 때) 변이체 서열이 GD2에 결합하는 능력을 보유하는 한, 적어도 80, 85, 90, 95, 98 또는 99% 서열 동일성을 갖는, 서열 번호 7, 8, 9, 10, 11 또는 12로서 나타낸 서열의 변이체를 포함할 수 있다.
- [0093] 두 폴리펩티드 서열 간의 %동일성은, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>에서 무료로 입수 가능한 BLAST와 같은 프로그램에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [0094] 막관통 도메인
- [0095] 본 발명의 CAR은 또한 막에 걸쳐있는 막관통 도메인을 포함할 수 있다. 이는 소수성 알파 나선을 포함할 수 있다. 막관통 도메인은 우수한 수용체 안정성을 제공하는 CD28로부터 유래할 수 있다.
- [0096] 막관통 도메인은 서열 번호 13으로서 나타낸 서열을 포함할 수 있다.
- [0097] 서열 번호 13
- [0098] FWLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV
- [0099] 세포내 T 세포 신호전달 도메인(엔도도메인)

- [0100] 엔도도메인은 CAR의 신호 전달 부분이다. 항원 인식 후, 수용체가 밀집되고 신호가 세포로 전달된다. 가장 흔히 사용된 엔도도메인 성분은 3개의 ITAM을 함유하는 CD3-제타의 것이다. 이는 항원이 결합한 후 활성화 신호를 T 세포에 전달한다. CD3-제타는 완전히 적격인 활성화 신호를 제공할 수는 없으며 추가의 공-자극성 신호전달이 필요할 수 있다. 예를 들어, 키메라 CD28 및 OX40이 CD3-제타와 함께 사용되어 증식/생존 신호를 전달할 수 있거나, 또는 셋 전부가 함께 사용될 수 있다.
- [0101] 본 발명의 CAR의 엔도도메인은 CD28 엔도도메인 및 OX40 및 CD3-제타 엔도도메인을 포함할 수 있다.
- [0102] 본 발명의 CAR의 막관통 및 세포내 T 세포 신호전달 도메인(엔도도메인)은 서열 번호 14, 15, 16, 17 또는 18로서 나타낸 서열 또는 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 이의 변이체를 포함할 수 있다.
- [0103] 서열 번호 14 (CD28 엔도도메인)
- [0104] RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAY
- [0105] 서열 번호 15 (CD40 엔도도메인)
- [0106] RSRDQRLPPDAHKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKI
- [0107] 서열 번호 16 (CD3 제타 엔도도메인)
- [0108] RSRVKFSRSADAPAYQQQNQLYNELNLGRREYDVLDRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
- [0109] 서열 번호 17 (CD28Z)
- [0110] RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQQNQLYNELNLGRREYDVLDRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
- [0111] 서열 번호 18 (CD280XZ)
- [0112] RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRDQRLPPDAHKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKIRVKFSRSADAPAYQQQNQLYNELNLGRREYDVLDRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
- [0113] 변이체 서열은, 그 서열이 효과적인 막관통 도메인/세포내 T 세포 신호전달 도메인을 제공하는 한, 서열 번호 13, 14, 15, 16, 17 또는 18에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 가질 수 있다.
- [0114] 신호 웨티드
- [0115] 본 발명의 CAR은 신호 웨티드를 포함할 수 있어서, CAR이 세포, 예컨대 T 세포 내에서 발현되는 경우, 초기 단백질은 소포체로 유도되고 이어서 이것이 별현되는 세포 표면으로 유도된다.
- [0116] 신호 웨티드의 코어는 단일 알파 나선을 형성하는 성향을 가진 소수성 아미노산의 긴 스트레치를 함유할 수 있다. 신호 웨티드는 아미노산의 양으로 하전된 짧은 스트레치로 시작할 수 있으며, 이는 전좌(translocation) 동안 폴리웨티드의 적절한 토폴로지를 시행하는 것을 돕는다. 신호 웨티드의 단부에는 전형적으로 신호 웨티다제에 의해 인식되어 절단되는 아미노산의 스트레치가 존재한다. 신호 웨티다제는 전좌 동안 또는 이의 완료 후에 절단되어 유리 신호 웨티드 및 성숙 단백질을 생성할 수 있다. 유리 신호 웨티드는 이후에 특이적인 프로테아제에 의해 분해된다.
- [0117] 신호 웨티드는 분자의 아미노 말단에 존재할 수 있다.
- [0118] 본 발명의 CAR은 하기 일반식을 가질 수 있다:
- [0119] 신호 웨티드 - GD2 결합 도메인 - 스페이서 도메인 - 막관통 도메인 - 세포내 T 세포 신호전달 도메인.
- [0120] 신호 웨티드는, 신호 웨티드가 CAR의 세포 표면 발현을 유도하도록 여전히 기능하는 한, 서열 번호 19 또는 5, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산 돌연변이(삽입, 치환 또는 첨가)를 가진 이의 변이체를 포함할 수 있다.
- [0121] 서열 번호 19: METDTLLLWVLLLWVPGSTG
- [0122] 서열 번호 19의 신호 웨티드는 소형이고 매우 효율적이다. 이는 말단 글리신 이후에 약 95% 절단을 제공하여, 신호 웨티다제에 의한 효율적인 제거를 제공하는 것으로 예측된다.
- [0123] 스페이서

- [0124] 본 발명의 CAR은 GD2 결합 도메인을 막관통 도메인과 연결하고 엔도도메인으로부터 GD2 결합 도메인을 공간적으로 분리하기 위해 스페이서 서열을 포함할 수 있다. 유연성 스페이서는 GD2 결합을 가능하게 하기 위해 GD2 결합 도메인이 상이한 방향으로 배향되도록 한다.
- [0125] 스페이서 서열은 예를 들어 IgG1 Fc 영역, IgG1 헌지 또는 CD8 스톡, 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다. 스페이서는 대안으로 IgG1 Fc 영역, IgG1 헌지 또는 CD8 스톡과 유사한 길이 및/또는 도메인 스페이싱 특성을 가진 대체 서열을 포함할 수 있다.
- [0126] 인간 IgG1 스페이서는 Fc 결합 모티프를 제거하도록 변경될 수 있다.
- [0127] 이들 스페이서에 대한 아미노산 서열의 예는 이하에 제공되어 있다:
- [0128] 서열 번호 20 (인간 IgG1의 헌지-CH2CH3)
- [0129] AEPKSPDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIA~~RT~~P~~E~~VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT~~K~~PREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI~~S~~~~A~~K~~G~~Q~~P~~REPQVT~~L~~PPSRDELTKNQVSLTCLVKG~~F~~YPSDIAVEWESNGQPENNYK~~T~~~~T~~PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKKD
- [0130] 서열 번호 21 (인간 CD8 스톡):
- [0131] TTTPAPR~~P~~PTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGA~~H~~TRGLDFACDI
- [0132] 서열 번호 22 (인간 IgG1 헌지):
- [0133] AEPKSPDKTHTCPPCPKDPK
- [0134] 서열 번호 23 (IgG1 헌지-Fc)
- [0135] AEPKSPDKTHTCPPCAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT~~K~~PREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI~~S~~~~A~~K~~G~~Q~~P~~REPQVT~~L~~PPSRDELTKNQVSLTCLVKG~~F~~YPSDIAVEWESNGQPENNYK~~T~~~~T~~PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKKDPK
- [0136] 서열 번호 24 (IgG1 헌지 - Fc 수용체 인식 모티프를 제거하도록 수식된 Fc)
- [0137] AEPKSPDKTHTCPPCPAPPVA*GPSVFLFPPKPKDTLMIA~~R~~T~~P~~E~~V~~TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT~~K~~PREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI~~S~~~~A~~K~~G~~Q~~P~~REPQVT~~L~~PPSRDELTKNQVSLTCLVKG~~F~~YPSDIAVEWESNGQPENNYK~~T~~~~T~~PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKKDPK
- [0138] 수식된 잔기는 밑줄이 그어져 있다; *는 결실을 의미한다.
- [0139] GD2
- [0140] GD2는 인간 신경모세포종 및 흑색종을 비롯한, 신경외배엽 유래의 종양 상에 발현되는 디시알로강글리오시드이며, 정상 조직, 주로 인간의 소뇌 및 말초 신경 상에는 매우 제한적으로 발현된다.
- [0141] GD2의 비교적 종양 특이적인 발현은 이것이 면역치료법에 있어서 적절한 표적이 되게 한다.
- [0142] 핵산 서열
- [0143] 본 발명의 제2 양태는 본 발명의 제1 양태의 CAR을 코딩하는 핵산 서열에 관한 것이다.
- [0144] 핵산 서열은 서열 번호 26-35 중 어느 하나로서 나타낸 아미노산 서열을 갖는 CAR을 코딩할 수 있을 수 있다.
- [0145] 핵산은 하기 서열이거나 이를 포함할 수 있다:
- [0146] 서열 번호 25 항-GD2 CAR을 포함하는 레트로바이러스 카세트의 DNA 서열은 발현을 항상시키도록 코돈 최적화된 프레임 및 SAR 영역을 갖는 RQR8 자살 유전자와 공발현된다

```

1 tgaaagaccc cacctgttagg tttggcaagc tagcttaagt aacgcattt tgcaaggcat gaaaaatac
>>.....LTR.....>
71 ataaactgaga atagaaaagt tcagatcaag gtcaggaaacs gatggaaacag ctgaatatgg gc当地aaacagg
>.....LTR.....>
141 atatctgtgg taagcagttc ctgc当地ccggc tc当地ggccaa gaacagatgg aacagctgaa tatggccaa
>.....LTR.....>
211 acaggatato tggtaagc agtttctgccc cgggctcagg gccaagaaca gatggtcccc agatggcgtc
>.....LTR.....>
281 cagccctcag cagtttctag agaaccatca gatgttcca gggtgccccca aggacctgaa atgaccctgt
>.....LTR.....>
351 gocattatttg aactaaccaa tcagttgtct tctcggtctt ttatgtccc cgagctcaat
>.....LTR.....>
421 aaaagagccc acaaccctc actcggggcg ccagtcctcc gattgactga gtc当地ccggg taccctgtta
>.....LTR.....>
491 tccaataaac cctcttgcag ttgc当地ccga ct当地gggtct ct当地gttctt tgggagggtc tccctgtgat
>.....LTR.....>
561 gattgactac coggcaggg ggggtttca tttgggggtct ct当地gggtt cgggagaccc ct当地ccagg
>.....LTR.....>>
631 accaccgacc caccacccggg aggttaagctg gccagcaact tatctgtgtc tgc当地gattt tctagtgtct
701 atgactgatt ttatgcgcct gogtcggtagt tagttacta actagctctg tatctggccg acccgtgggt
Eco52I
-----
771 gaactgacga gttcgaaaca cccggeccca accctgggg acgtccagg gacttcgggg gccgttttg
PshAI
-----
841 tggcccgacc tgtagtctaa aatcccgatc gtttagact ct当地gggtca cccccccttag aggaggata

```

[0147]

```

911 tgggttctg gttaggagacg agaacctaaa acagtcccg ctcgcgtcg aattttgtt ttccgttttg
981 gaccgaagcc gcgcgcgcgc tcttgtctgc tgcagcatcg ttctgtgtt ctctgtatc actgtgtttc

          SrfI
          -----
1051 tgtatgttc tgaaaatatg gcccgggct agccgttac cactccctta agtttgcacct taggtcactg
1121 gaaagatgtc gagcggatcg ctcacaacca gtccgttagat gtcaagaaga gacgttgggt taccttctgc
1191 tctgcagat gccaacccctt taacgtcgg tggccgcgc agggcacctt taaccgagac ctcataccac
1261 aggttaagat caaggcttt tcacctggcc cgcattggaca ccacgaccag gtggggtaaca tctgtacactg
1331 ggaaggctt gcttttgcacc ccctccctt ggtcaagcccc ttgtacacc ctaaggcttcc gcttccctt
1401 ctcocatccg ccccgctctt ccccttgaa ctcctcgat cgaccggcc tcgatccctt ctttatccag

          BglII
          -----
1471 ccctcactcc ttctcttaggc gcccataatg gatcttataat ggggcaccccg cgcccttgc
1541 aaactccctt gaccctgaca tgacaagagt tactaacagc ccctctctcc aagctcactt acaggctctc

          AgeI
          -----
1611 tacttagtcc agcacgaatg ctggagaccc ctggggcagc cttaccaaga acaactggac cgaccgggtgg
1681 tacctcaccctt accctcgatc ggccacacag tggtggccg ccgcacccag actaagaacc tagaacctcg

          AccI
          -----
1751 ctggaaagga cttacacag tcctgtcgtac cacccttaccg gcccctaaag tagacggcat cgcaagttgg

          PmlI
          -----
1821 atacacgccc cccacgtgaa ggctggccgc cccgggggtg gaccatcctc tagactgcca acatgggcac
>..... orf .....>
>..... RQR8 .....>

1891 cagcctgctg tgctggatgg cccctgtgc gctggggccc gaccacgccc atgcctgccc ctacagoaac
>..... orf .....>
>..... RQR8 .....>

1961 ccacgctgt gcacgggggg cggccgcgc gacgtccca cccaggccac ctcttccaaatgttccacca
>..... orf .....>
>..... RQR8 .....>

2031 acgtgagcccc acccaagcccc accaccacccg cctgtccctt ttccaaatctt tccctgtgtt ggggggggg
>..... orf .....>
>..... RQR8 .....>

2101 aggccggccaa gcccccaagac ctccacccccc agcccccaccat atgcggccgc accctctggatccggaccc
>..... orf .....>
>..... RQR8 .....>

          SgrAI
          -----
2171 gaggcctgccc gcccggccgc cggccggccgc gtgcacacca gaggcctggatccctgttgc gatatctaca
>..... orf .....>
>..... RQR8 .....>

          BclI
          -----
2241 tctggggcccc actggccggc accctgtggcg tgctgtctgc gaggcctggatccctgttgc gatatctaca
>..... orf .....>
>..... RQR8 .....>

2311 ccgcaaccgc accgcgtgtt gcaagtgcggc caggccctgtt gttggagccg agggcagagg cagccctgtt

```

```

>.....orfs.....>
>.....RQR8.....>>
>>.....FMD-2A.....>

NcoI
-----
2381 acctgcggcg acgtggagga gaaccaggc cccatggaga ccgacacct gctgtgtgg gtgtgtgc
>.....orfs.....>
>>.....FMD-2A.....>>
>>.....CAR.....>

2451 tgggggtgcc aggcagcacc ggcagggtgc agctgcggga gtctggccca ggcctggta agccagcca
>.....orfs.....>
>.....CAR.....>

2521 gaccctgagc atcacctgca cccgtggcgg cttcagactg gccagctaca acatccactg ggtggggcag
>.....orfs.....>
>.....CAR.....>

2591 cccccaggca agggccttggc gtggctggc gtgatctggc ctggggcag caccactac aacagcggcc
>.....orfs.....>
>.....CAR.....>

2661 tgatgagccg gttgaccatc agcaaggaca acagaagaa ccagggttcc ttgaaatgtt gcaagcttgc
>.....orfs.....>
>.....CAR.....>

2731 aecgcgcac acogccgtgt actactggc caagggggc gacgactaca gctgggtcgcc tctactggggc
>.....orfs.....>
>.....CAR.....>

2801 caggggcacc ttgtgaccgt gagctctggc ggaggggctt ctggggggc cggctctggc ggaggggggc
>.....orfs.....>
>.....CAR.....>

2871 gcgagaacca gatgaccac agcccccacca gtttggcggc cccgtggc gaccgggtt gcatgacctt
>.....orfs.....>
>.....CAR.....>

2941 cagagccagc agcagcgttca gcaagcgttca cctgcactgg taccagcaga agagcggcaa ggccccaaag
>.....orfs.....>
>.....CAR.....>

3011 gtgtggatctt acagcaccatc caacctggcc agccgggtgc ccaggccgtt cccggcggc ggcagggggc
>.....orfs.....>
>.....CAR.....>

3081 ccgactacac cctgaccatc agcagcctgc agccggggc ctggccacc tactactggc agcagttacatc
>.....orfs.....>
>.....CAR.....>

BamHI
-----
3151 cggctacccc atcaccttgc gcaaggccac caagggtggat atcaaggccgtt cggatcccgcc cgagccaaag
>.....orfs.....>
>.....CAR.....>

FseI
-----
3221 tctcctgaca aaactcacac atgcccaccc tgccacac ccctggccatc cccgtggc cggccggcgtt gtttctctt
>.....orfs.....>
>.....CAR.....>

3291 tccccccaaa acccaaggac accctcatgtt tggccggac ccctgggtt acatgggtt tgggtggatgtt
>.....orfs.....>
>.....CAR.....>

3361 gagccacaa gaccctgagg tcaagttcaat cttgttacgtt gacgggggtt aggttcataa tgccaaagaca
>.....orfs.....>
>.....CAR.....>

SacII
-----
3431 aagccgggg aggaggcgtt caacaggcacc tacgggtgtt ctagcgttcc cccggccgtt caccaggact
>.....orfs.....>
>.....CAR.....>

```

[0149]

3501 ggctgaatgg caaggaggtac aagtgcagg tctccaaacaa agccctcccc gcccccatcg agaaaaaccat
 >..... orf>
 >.....CAR.....>

 3571 ctccaaagcc aaagggcagc cccgagaacc acagggtgtac accctgcccc catccggga tgagctgacc
 >..... orf>
 >.....CAR.....>

 3641 aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggto aaagggttct atcccagcga catgccgtg gagtgggaga
 >..... orf>
 >.....CAR.....>

 3711 gcaatggcc accggagaac aactacaaga ccacgctec ogtgtggac tccgacggct ctttttcct
 >..... orf>
 >.....CAR.....>

 Ppu10I

 NsiI

 BfrBI

 3781 ctacagcaag ctcaccgtgg acaagagccag gtggcagcag gggAACgtct tcttcatgtct cgtgtatcat
 >..... orf>
 >.....CAR.....>

 Van91I

 3851 gggccctgc acaatcacta tacccagaaa tctctgagtc tgagccagg caagaaggac cccaaatct
 >..... orf>
 >.....CAR.....>

 3921 gggccctgtt ggtgggtggg ggcgtgttgg cctgttactc tctctgttg acctggcct tcatatctt
 >..... orf>
 >.....CAR.....>

 3991 ctgggtgcgc tccaagagga gcaggctct geacagtgac tacatgaaca tgactccccg cggccccggg
 >..... orf>
 >.....CAR.....>

 4061 cccaccgcga agcattacca gcccattgcg ccaccacggg acttgcgcg cttatgtctt cgggttaagt
 >..... orf>
 >.....CAR.....>

 4131 tctctgtctt tgccgatgtcc caagccatac agcagggtccaa gaatcagctg tacaatgaac tgaacctgg
 >..... orf>
 >.....CAR.....>

 4201 caggcggggag ggttacgacg tgctggataa gggggaggcc agagaccccg agatggccgg caaacacgg
 >..... orf>
 >.....CAR.....>

 4271 cgaaaaatac cccaggaggg actctataac gagctgtcaga aggacaaaat ggcogaggcc tattccogaga
 >..... orf>
 >.....CAR.....>

 4341 tggccatgaa gggagagaga agacgcggaa agggccacga cggccgttat cagggattgt ccacogctac
 >..... orf>
 >.....CAR.....>

 MuI ClAI

 4411 aaaagatata tatgtatgccc tgcacatgcg gggccctgcga cccagatgcg ggtatcgat actgttctca
 >..... orf>>
 >.....CAR.....>>
 >...SAR...>

 4481 tcacatcata tcaagggttat ataccatcaa tattggccaca gatgttactt accgttttaa tattttctca
 >..... SAR.....>

 4551 atttagtta tatgcaatga tagttctctg atttctgaga ttgagttct catgtgtaat gatttttag
 >..... SAR.....>

 4621 agtttctttt tcatctgttc aaattttgtt ctatgtttat tttttactga tttttaagac ttctttttat
 >..... SAR.....>

[0150]

```

4691 aatctgcata ttacaattot ctttactggg gtgttgcaaa tattttctgt cattctatgg cctgactttt
>.....SAR.....>
4761 cttaatgggt ttttaatttt aaaaataagt cttaatattc atgcaatota attaacaata ttttctttgt
>.....SAR.....>
          SphI
          -----
4831 gtttaggact ttgagtcata agaaattttt ctctacactg aagtcatgtat ggcatgttcc tatattttt
>.....SAR.....>
4901 tctaaaatgtt ttaaagttt gccttccca ttttagactta taatttactg gaattttttt gtgtgtatgg
>.....SAR.....>
4971 tatgacatgtt gggccctt ttatTTTtta catataaata tatttccctg ttttcttaaa aaagaaaaag
>.....SAR.....>
5041 atcatcattt tcccattgtt aataggccata ttttttcat aggtcaactt cataatataa tgggtctgtt
>.....SAR.....>
5111 tctgagctt actctatTTT atcagcttca ctgttatattcc ccacacatct catgcttttgc tctaaatctt
>.....SAR.....>
5181 gatatttagt ggAACATTCT tttccatTTT gtctcacag aatTTTTT ttatTTCTT tgggttttt
>.....SAR.....>
5251 atatacattt tgaatagggtt tgacaagggtt cggttagtgc caatttggta aagacaggat atcagtggtc
>.....SAR.....>>
5321 caggctctag ttttacttca acaatatac cagctgaagc ctatagagta cgagccatag ataaaataaa
5391 agatTTTTT tagtctccag aaaaaggggg gaatgaaaga ccccacctgtt aggtttggca agcttagctta
>>.....LTR.....>
5461 agtaacgcca ttttgcagg catggaaaaa tacatTTCTT aagatagaga agttcagato aaggtcaggaa
>.....LTR.....>
5531 acatgtgaa cagctgttca tggccaaac aggtatTTCTT tgtaaaggat ttccctgcggc ggctcaggcc
>.....LTR.....>
5601 caagaacaga tggAACAGCTT gaatatgggc caaacaggat atctgtggta agcagttctt gccccggctt
>.....LTR.....>
5671 agggccaaaga acatgtggc cccagatgtcg gtccaggccctt cagcaggatcc tagagaacca tcagatgtttt
>.....LTR.....>
5741 ccagggtgccc ccaaggaccc gaaatgaccctt tggacttacac caatcaggat ttgttctcgtt
>.....LTR.....>
5811 tctgttgcgc cgttttgttgc ccccgagctc aataaaagag cccacaaccc ctcactoggg ggcgcaggcc
>.....LTR.....>
5881 tccgattgac tggatggccc gggatcccggtt gatccatata aacccttcttgc cagttgcattt cggacttgg
>.....LTR.....>
5951 tctgttgtt ctttggagg gtttcttgc aytgttgcac taccctgttgc cgggggtttt tcac
>.....LTR.....>>

```

[0151]

[0152]

핵산 서열은 서열 번호 25에 의해 코딩되는 것과 동일한 아미노산 서열을 코딩할 수 있으나, 유전자 코드의 축퇴성으로 인해 상이한 핵산 서열을 가질 수 있다. 핵산 서열은, 본 발명의 제1 양태에서 정의된 바와 같은 CAR을 코딩하는 한,+ 서열 번호 25로서 나타낸 서열과 적어도 80, 85, 90, 95, 98 또는 99% 동일성을 가질 수 있다.

[0153]

자살 유전자

[0154]

T 세포가 접합하여(engraft) 자율적이기 때문에, 항-GD2 CAR T 세포의 수용자 내 CAR T 세포를 선택적으로 결실하는 수단이 바람직하다. 자살 유전자는 허용 불가능한 독성에도 불구하고 주입된(infused) T 세포의 파괴를 일으키는 유전적으로 코딩 가능한 매커니즘이다. 자살 유전자에 관한 가장 이른 임상 경험은 T 세포가 간시클로비르(Ganciclovir)에 감수성이 되게 하는 헤르페스 바이러스 티미딘 키나아제(HSV-TK)에 관한 것이다. HSV-TK는 매우 효과적인 자살 유전자이다. 그러나, 예비 형성된(pre-formed) 면역 반응은 일배수동종(haploididentical) 줄기 세포 이식과 같은 상당한 면역억제의 임상 세팅에 이의 용도를 제한할 수 있다. 유도 카스파제 9(Inducible Caspase 9, iCasp9)은 변형 FKBP12으로 카스파제 9의 활성화 도메인을 대체함으로써 구성된 자살 유전자이다. iCasp9는 달리 비활성인 소분자 이합체화 화학적 유도제(CID)에 의해 활성화된다. iCasp9는 최근 일배수동종 HSCT의 세팅에서 시험되어왔으며 GvHD를 중단시킬 수 있다. iCasp9의 가장 큰 한계점은 임상 등급 사유 CID의 가용성에의 의존이다. iCasp9 및 HSV-TK는 둘 다 세포내 단백질이므로, 단독 전이유전자로서 사용되는 경우, 이들은 마커 유전자와 공발현되어 형질도입 세포의 선택을 가능하게 한다.

[0155]

iCasp9는 서열 번호 36으로서 나타낸 서열 또는 적어도 80, 90, 95 또는 98 % 서열 동일성을 갖는 이의 변이체를 포함할 수 있다.

[0156]

서열 번호 36

[0157]

MLEGVQVETISPGDGRTFPKRQGTCVVHYTGMLEDGKKVDSRDRNPKFKMLGKQEVIRGWEEGVAQMVGQRALKTISPDYAYGATGHPGIIPPHATLVD
DVELLKLESGGSGVDGFGDVGAESELRGNAIDLAYILSMEPCHCLIIINNVNFRESGLRTGSNIDCEKLRRRFSSLHFMVEVKGDLTAKMVLALLELA
QQDHGALDCVVVILSHGCQASHLQFPGAVYGTGCPVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGPKLFFIQACGGEQKDHFESTSPEDESPGSNPEPDATPFQEG

LRTFDQLDAISSLPTPSDIFVSYSTFPGFVSRDPKSGSWYVETLDDIFEQWAHSEDLQSLLLRVANAVSVKGIFYKQMPGCFNFLKKLFFKTSAS

[0158] 최근 본 발명의 발명자들은, 항체 QBEnd10로 검출되고 치료 항체 리툭시맙으로 용해된 세포를 발현할 수 있는, RQR8로 공지된 신규 마커/자살 유전자를 기술하였다.

[0159] RQR8은 서열 번호 37로서 나타낸 서열 또는 적어도 80, 90, 95 또는 98 % 서열 동일성을 갖는 이의 변이체를 포함할 수 있다.

[0160] 서열 번호 37

[0161] MGTSLLCWMALCLLGADHADACPYSNPSLCGGGGSELPTQGTFSNVSTNVSPAKPTTACPYSNPSLCGGGGSPAPRPPAPTIASQPLSLRPEACRPA
AGGAHVTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLSLSVITLYCNHRNRRRVCKCPRPVV

[0162] 자살 유전자는, 예를 들어 두 서열 사이에 자기 절단 웹티드를 이용함으로써, CAR을 갖는 단일 폴리펩티드로서 발현될 수 있다.

[0163] 백터

[0164] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 핵산 서열을 포함하는 백터를 제공한다. 이러한 백터는 핵산 서열을 숙주 세포 내에 도입하여 상기 세포가 본 발명의 제1 양태에 따른 분자를 발현하고 생성하도록 사용될 수 있다.

[0165] 백터는 예를 들면, 플라스미드 또는 바이러스 백터, 예컨대 레트로바이러스 백터 또는 렌티바이러스 백터일 수 있다.

[0166] 백터는 T 세포를 형질감염 또는 형질도입시키는 것이 가능할 수 있다.

[0167] 백터는 또한 iCasp9 또는 RQR8과 같은 자살 유전자를 코딩하는 핵산 서열을 포함할 수 있다.

[0168] 숙주 세포

[0169] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 핵산을 포함하는 숙주 세포를 제공한다. 숙주 세포는 본 발명의 제1 양태에 따른 CAR을 발현하는 것이 가능할 수 있다.

[0170] 숙주 세포는 세포용해성 면역 세포, 예컨대 인간 T 세포 또는 자연 살해(NK) 세포일 수 있다.

[0171] 본 발명에 따른 CAR을 발현할 수 있는 T 세포는 T 세포에 CAR-코딩 핵산을 형질도입 또는 형질감염시킴으로써 제조될 수 있다.

[0172] CAR T 세포는 생체 외(*ex vivo*) 생성될 수 있다. T 세포는 환자 또는 공여자로부터의 말초 혈액 단핵 세포 (peripheral blood mononuclear cell, PBMC) 샘플로부터 유래할 수 있다. T 세포는 CAR-코딩 핵산으로 형질도입되기 이전에, 예를 들면 항-CD3 단일클론 항체로 처리됨으로써 활성화되고/거나 확장(expand)될 수 있다.

[0173] 약학 조성물

[0174] 본 발명은 또한 본 발명의 백터 또는 CAR 발현 T 세포를 약학적으로 허용 가능한 담체, 희석제 또는 부형제, 및 경우에 따라 하나 이상의 추가의 약학적으로 활성인 폴리펩티드 및/또는 화합물과 함께 함유하는 약학 조성물에 관한 것이다. 이러한 제제는 예를 들면, 정맥내 주입에 적합한 형태일 수 있다.

[0175] 치료 방법

[0176] 본 발명의 CAR 분자를 발현하는 T 세포는 암 세포, 예컨대 신경모세포종 세포를 사멸시킬 수 있다. CAR 발현 T 세포는 환자 자신의 말초 혈액으로부터(제1자(party)), 또는 공여자 말초 혈액으로부터의 조혈 줄기 세포 이식 체의 세팅에서(제2자), 또는 관계없는 공여자로부터의 말초 혈액으로부터(제3자) 생체 외 생성될 수 있다. 대안으로, CAR T 세포는 유도성 전구체 세포 또는 배아 전구체 세포의 T 세포로의 생체 외 분화로부터 유래할 수 있다. 이를 경우에, CAR T 세포는 바이러스 백터를 이용한 형질도입, DNA 또는 RNA를 이용한 형질감염을 포함한 다수의 수단들 중 하나에 의해 CAR을 코딩하는 DNA 또는 RNA를 도입함으로써 생성된다.

[0177] 본 발명의 CAR 분자를 발현하는 T 세포는 암성 질환, 특히 GD2 발현과 관련된 암성 질환의 치료를 위해 사용될 수 있다.

[0178] 암은 외배엽 종양일 수 있다.

[0179] 높은 GD2 발현 수준과 연관된 암의 예는 다음과 같다: 신경모세포종, 흑색종, 수모세포종, 연조직 육종, 골육종

및 소세포 폐암, 예컨대 NSCLC.

[0180] 질환의 치료 방법은 본 발명의 벡터 또는 T 세포의 치료적 용도에 관한 것이다. 이와 관련해서, 벡터 또는 T 세포는 기존 질환 또는 병태를 가진 괴형체에게 투여되어 해당 질환과 관련된 적어도 하나의 증상을 완화, 감소 또는 개선하고/하거나 해당 질환의 진행을 둔화, 감소 또는 차단하도록 할 수 있다. 본 발명의 방법은 GD2 발현 세포, 예컨대 암 세포의 T 세포 매개 사멸을 일으키거나 촉진할 수 있다.

[0181] GD2 발현 세포

[0182] 본 발명은 또한, GM3 생성효소를 코딩하는 핵산 및 GD2 생성효소를 코딩하는 핵산을 세포 내에 도입하는 단계를 포함하는, GD2 발현 세포의 제조 방법을 제공한다.

[0183] 핵산은 예를 들어, 플라스미드 또는 바이러스 벡터와 같은 벡터를 이용하는 형질감염 또는 형질도입에 의해 도입될 수 있다.

[0184] 본 발명은 또한, GM3 생성효소를 코딩하는 이종 핵산 및 GD2 생성효소를 코딩하는 이종 핵산을 포함하는 GD2 발현 세포에 관한 것이다.

[0185] 핵산은 이것이 일반적으로 세포 내에 존재하지 않는다는 점에서 "이종"일 수 있다. 이는 인공 도입된 재조합 핵산 서열이다.

[0186] 세포는 세포주로부터 유래할 수 있다.

[0187] 세포는 배양물 중의 GD2CAR T 세포, 예컨대 본 발명의 T 세포를 자극하는 데 사용될 수 있다.

[0188] 본 발명은 이제 하기 실시예에 의해 더욱 상세히 기술될 것이며, 이는 본 발명을 실시함에 있어서 당업자를 보조하는 역할이고자 하며 본 발명의 범위를 어떠한 형태로든 제한하고자 하는 의도가 아니다.

[실시예]

실시예 1- 결합물질로서 인간화 항체 huK666의 이용

[0191] CAR은 Nakamura 등(2001 - 상기와 동일)에 의해 기술된 바와 같이 마우스 항체 KM666 또는 이의 인간화 버전 huK666으로부터의 서열을 이용하는 scFv로 구성된다.(상기 도 2의 변이체 (a) 및 (b)). 이러한 수용체를 발현/안정성에 대해 비교하고 두 수용체 모두에 대해 동일한 것으로 밝혀졌다. 다음으로, GD2를 발현하거나 발현하지 않는 표적 세포에 의해 챌린지되는 경우 이를 수용체로 형질도입된 T 세포의 사멸, 사이토카인 방출 및 증식을 시험하였다. 두 수용체의 사멸은 유사하나, 인간화 scFv 기초 수용체가 IL2 생성 및 증식에서 우월한 결과를 낸다는 결론이 내려졌다(도 3).

실시예 2 - 발현 및 기능에 대한 상이한 스페이서 포맷 효과의 효과 시험

[0193] Fc 스페이서, 힌지, 힌지-CD8 스톡 및 Cd8 스톡을 갖는 항-GD2 CAR을 생성하였다(각각 도 2 (b), (d), (e) 및 (f)). 상기 CAR은 정확한 비교가 가능하도록 2A 구제역(foot-and-mouth) 자기 절단 패티드와 필수적인 1:1 방식으로 마커 유전자인 절삭(truncated) CD34와 공발현되었다(도 4 (a)). 추가로, huK666 scFv를 아미노말단 HA 태그로 태깅하여 전이유전자 대 CAR 발현의 비교가 가능하게 하였다.

[0194] 상기 작제물로 형질도입된 정상 공여자 T 세포의 유세포 분석은 하기 순서로 더 밝은(brighter) CAR 발현을 입증하였다: Fc > 힌지-스톡 = 스톡 > 힌지(도 4 (b)).

[0195] GD2 음성 표적에 대한 GD2 양성 표적의 사멸을 크롬 방출 어세이를 이용하여 비교하였다. 이는 하기 순서로 사멸 효과를 나타내었다: Fc > 힌지-스톡 = 스톱 > 힌지 (도 4 (c)).

[0196] CAR T 세포를 GD2 양성 또는 음성 표적으로 챌린지하는 경우 인터페론-감마 방출 및 IL-2 방출을 비교하였다. 인터페론-감마 방출은 Fc, 힌지-스톡 및 스톱과의 CAR과 유사하였으나, 힌지 변이체에서는 더 적었다. IL2 방출은 하기 순서로 검출되었다: Fc, 스톱, 힌지-스톡, 힌지(도 4 (d) 및 (e)).

[0197] 마지막으로, CAR T 세포를 GD2 양성 또는 음성 표적으로 챌린지하는 경우 CAR T 세포의 증식을 비교하였다. 증식은 하기 순서로 검출되었다: 스톱, 힌지-스톡, Fc, 힌지(도 4 (d) 및 (e)).

실시예 3 - FcR 돌연변이가 비특이적 활성을 저해한다

[0199] 상기 실시예들로부터의 전체 데이터는 Fc 스페이서가 가장 성능이 뛰어남을 보여준다. 그러나 생체 내(*in vivo*)

Fc 도메인은 Fc 수용체를 발현하는 세포로부터의 비특이적 활성화를 유도할 수 있다. 이 효과를 방지하기 위해, 도 5 (a)에 나타난 바와 같이 Fc 영역 내에 돌연변이가 도입된다. 도 5 (b)에 나타난 바와 같이 이 돌연변이는 CAR 발현에 해로운 영향을 미치지 않는다.

[0200] 부가시, 이 돌연변이는 CAR 사멸 기능에 영향을 주지 않는 것으로 나타났다(도 5 (c)). 마지막으로, 상기 돌연변이는 FcR 발현 표적(THP1로 지칭되는 단핵구 주(monocytoid line))의 비특이적 사멸, 및 상기 단핵구에 의한 IL-1베타 방출에 있어서 바람직한 효과를 가진다는 점이 나타났다(도 5 (e)).

실시예 4 - 발현 카세트의 최적화

[0202] 수용체 발현을 최적화하는 목적으로, 하기를 시험하였다: (a) 카세트 내로의 스캐폴드 부착 부위(SAR)의 포함; (b) 3'LTR 내로의 닫 베타 헤모글로빈 염색질 절연체(CHS4)의 포함 및 (c) 개방형 해독틀의 코돈 최적화(도 6 (a)). SAR의 포함은 코돈 최적화가 그려하듯이 발현의 특성을 개선하였으며, 반면 CHS4는 적은 효과를 가진다는 것이 나타났다(도 6 (b)). SAR 및 코돈 최적화의 조합은 추가적으로 발현을 개선하였다(도 6 (c)).

실시예 5 - 상이한 엔도도메인의 비교

[0203] 3가지 상이한 엔도도메인을 갖는 작제물을 생성하였다: CD3-제타 엔도도메인을 갖는 CD28 막관통 도메인(CD28tmZ); CD28 엔도도메인 및 CD3-제타 엔도도메인을 갖는 CD28 막관통 도메인(CD28Z), 및 Fc 스페이서 포맷에 CAR을 갖는 CD28 막관통 도메인, CD28 엔도도메인, OX30 엔도도메인 및 CD3-제타 엔도도메인(CD280XZ). 중식, IFN γ 방출 및 IL-2 방출은 CD28tmZ < CD28Z < CD280XZ의 순서로 증가하는 것으로 주목되었다(도 7).

실시예 6 - iCasp9 자살 유전자와의 공발현

[0204] iCasp9 자살 유전자는 항-GD2 CAR과 공발현된다(도 8 (a)) - CAR은 Fc-스페이서의 포맷이며, CD280XZ는 기능을 입증하기 위해 임의로 선택됨). CAR은 iCasp9과의 공발현에도 불구하고 아주 우수하게 발현될 수 있었다(도 8 (b)). 소분자 이합체화제(dimerizer)로의 iCasp9의 활성화는 CAR 양성 T 세포의 결실을 야기하였다(도 8 (b)). 상기 이합체화제에 노출된 iCasp9-GD2CAR T 세포는 이합체화제에 노출될 때 이의 GD2 특이성을 상실하였다(도 8 (c)).

실시예 7 - RQR8 자살 유전자와의 공발현

[0205] 항-GD2 CAR은 RQR8 부류-자살 유전자와 공발현된다(도 9 (a)) - CAR은 Fc-스페이서의 포맷이며, CD28Z은 기능을 입증하기 위해 임의로 선택됨). 수용체 및 CAR를 공발현하는 것이 가능하였다(도 9 (b)). 리突如其来 및 보체로의 RQR8의 자살 유전자 기능의 활성화는 형질도입 T 세포의 결실 및 GD2 인식의 상실을 야기하였다(도 9 (c) 및 (d)).

실시예 8 - GD2 생성효소 및 GM3 생성효소의 발현은 임의 세포주에서의 GD2 발현을 야기한다

[0206] 배양에서 GD2CAR T 세포를 자극하기 위해, 이상적인 GD2- 또는 GD2+ 표적을 갖기 위해, 그리고 소동물 모델에 대한 동질유전자(syngeneic) 세포를 생성할 수 있기 위해서, 세포주 상에 이식유전자적으로(transgenically) 발현할 수 있는 것이 바람직하다. GD2는 단백질이 아니며 효소의 복합 세트에 의해 합성될 필요가 있다. 여기서 단지 두 효소: GM3 생성효소 및 GD2 생성효소의 이식유전자적 발현이 이제까지 형질도입된 모든 세포주에서 밝은(bright) GD2 발현을 유도한다는 것이 나타났다(도 10).

실시예 9 - 항-GD2 CAR의 생체내 기능

[0207] CT26 세포주를 조작하여 상기 기술된 바와 같이 GD2를 발현시켰다(CT26 클론 #7 또는 CT25#7로 약칭됨). 2×10^5 의 야생형(wt) 또는 GD2 양성 CD26 세포를 C57BL/6 마우스의 옆구리(flank) 내로 접종하였다(CT26와 동질유전자). 종양 찰린지 후 10일째, 모의-형질도입 및 항-GD2 CAR 형질도입 동질유전자 지라세포를 제조하였다. 마우스를 하기 4가지 코호트로 나누었다: 항-GD2 CAR 지라세포를 제공받은 GD2 발현 CT26 종양을 가진 마우스; 모의 형질도입 지라세포를 제공받은 GD2 발현 CT26 종양; 항-GD2 CAR 지라세포를 갖는 GD2 음성(wt) CT26 종양; 및 지라세포를 제공받지 않은 GD2 발현 CT26 종양. 종양을 3차원으로 디지털 캘리퍼를 이용하여 측정하고 이에 이어 부피를 추산하였다. 도 11은 종양의 생장 커브를 나타낸다. 항-GD2 CAR T 세포를 제공받은 마우스의 GD2 양성 종양만이 생장이 없거나 조금 있다.

실시예 10 - huK666 및 14g2a 기초 항원 결합 도메인을 포함하는 CAR의 기능의 비교

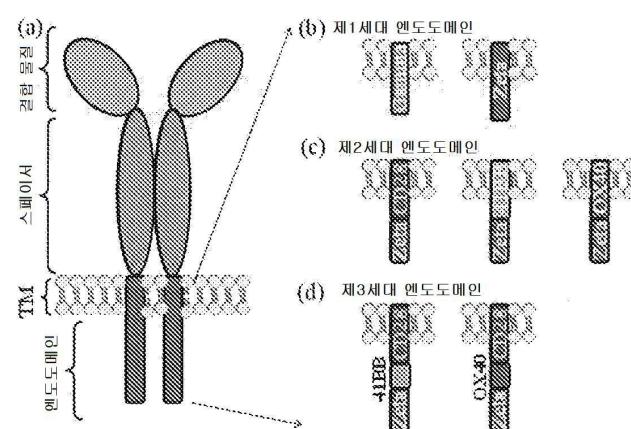
[0208] CAR의 항원 결합 도메인은 이의 기능에 영향을 미칠 수 있다. 본 연구에서, CAR과의 huK666에 기초한 항원 결합

도메인을 갖는 본 발명의 CAR의 기능을 14g2a에 기초한 항원 결합 도메인을 갖는 등가물 CAR과 비교하였다.

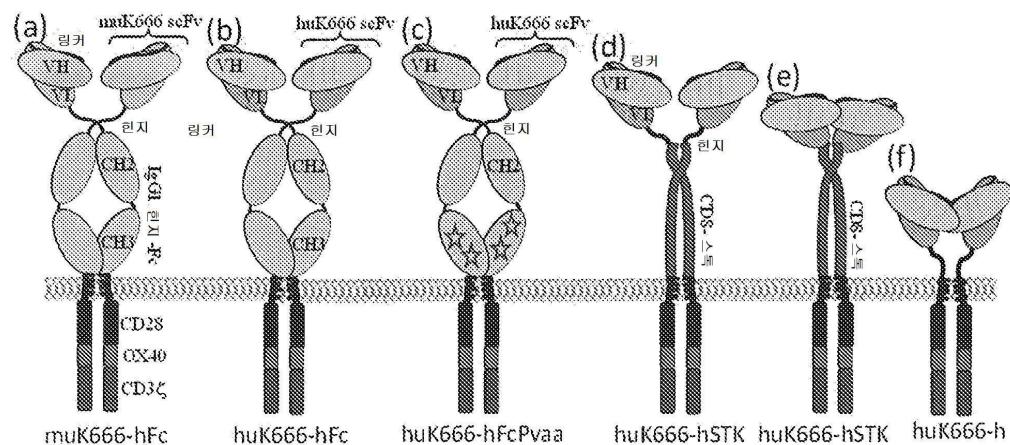
- [0215] 항체 14g2a는 GD2에 대한 항금을 항체로 간주될 수 있는데, 이는 상기 항체가 치료 mAb로서 사용되며 CAR 연구에서 시험된 유일한 scFv이기 때문이다.
- [0216] 제2세대 CAR은 huK666 또는 14g2a에 기초하여 구성 및 발현된다. 이의 구조는 도 14 (a)에 나타나 있다.
- [0217] 레트로바이러스는 GD2 CAR, gag/pol 및 외피 단백질 RD114를 코딩하는 플라스미드로의 293T 세포의 일시적 (transient) 형질감염에 의해 제조하였다. 3일 후, 상청액을 회수하고 레트로네ktin(retronectin)-코팅 플레이트 상에 동일한 역가의 레트로바이러스로 PHA/IL2-활성 PBMC를 형질도입하는 데 사용하였다. CAR은 단지 이의 항원 결합 도메인에 대해 상이하였다. 두 경우 모두에서 결합 도메인이 IgG Fc 단편으로 막에 연결되었고 CD28 및 CD3-제타로부터 세포내 활성화 모티프를 보유하였다. 형질도입 6일 후 CAR 발현이 유세포 분석에 의해 입증되었고 PBMC는 GD2-양성 Lan1 세포(GD2 양성 세포주) 또는 GD2-음성 A204 세포(GD2 음성 횡문근육종 세포주)와 함께 1:1의 비율로 배양되었다. 1일 후 상기 공배양으로부터의 상청액을 ELISA에 의해 인터페론- γ 수준에 대해 분석하고 6일 후 T 세포 증식을 유세포 분석법에 의해 분석하였다.
- [0218] 결과를 도 14 및 도 15에 나타내었다. 24시간째에, 인터페론- γ 를 상청액으로부터 측정하였다. huK666 CAR T 세포는 더 많은 IFN- γ 를 생성하는 것으로 나타났다(도 14 (b)). 1주 후 T 세포를 계수하였고, huK666 CAR는 더 많이 증식하는 것으로 나타났다(도 14 (c)).
- [0219] 신경모세포종 세포주 LAN1와의 공배양 1주일 후, 세포를 회수하고 유세포 분석법으로 분석하였다. CD45 발현은 림프계 세포 및 비림프계 세포를 구별하게 하였고 CD45- 세포는 LAN-1 세포였다. CD3/QBEND/10로의 추가 염색은 CAR T 세포의 계수를 가능하게 하였다. huK666 CAR T 세포가 14g2a 등가물보다 더 우수하게 증식하고 보다 완전히 사멸시킨다는 점이 밝혀졌다(도 15).
- [0220] 상기 명세서에서 언급된 모든 공개문헌은 본원에서 참고 인용된다. 기재된 본 발명의 방법 및 시스템의 다양한 변형 및 수정은 본 발명의 범위 및 취지에서 벗어남이 없이 당업자에게 자명할 것이다. 비록 본 발명이 구체적인 바람직한 실시양태들과 함께 기재되어 있으나, 청구된 발명은 이러한 구체적인 실시양태들로 부당하게 제한되지 않는 것으로 이해되어야 한다. 실제로, 문자 생물학, 세포 면역학 또는 관련 분야에서의 숙련인에게 자명한, 본 발명을 실시하기 위해 기재된 방식에 대한 다양한 변형은 하기 청구범위의 범위 내인 것으로 의도된다.

도면

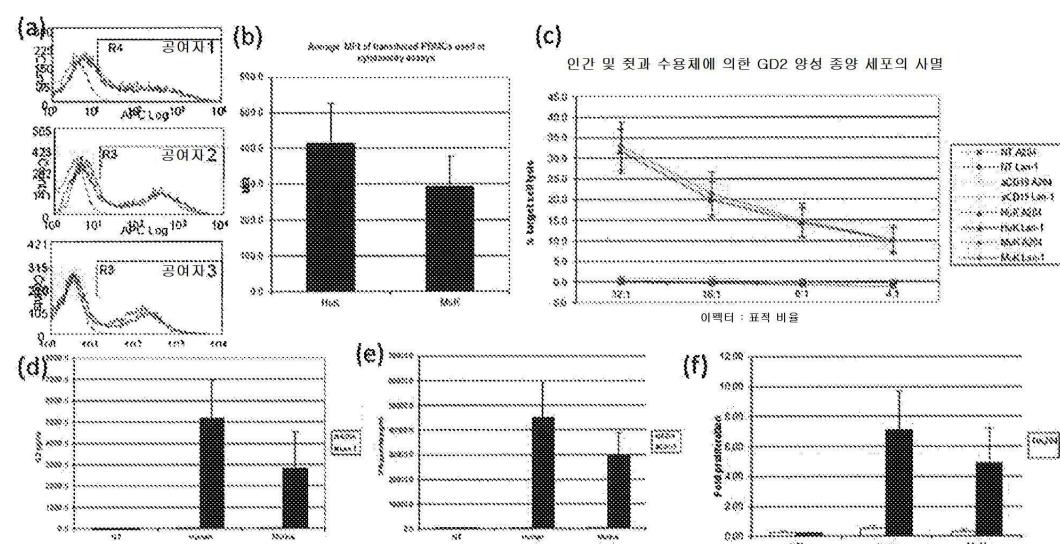
도면1



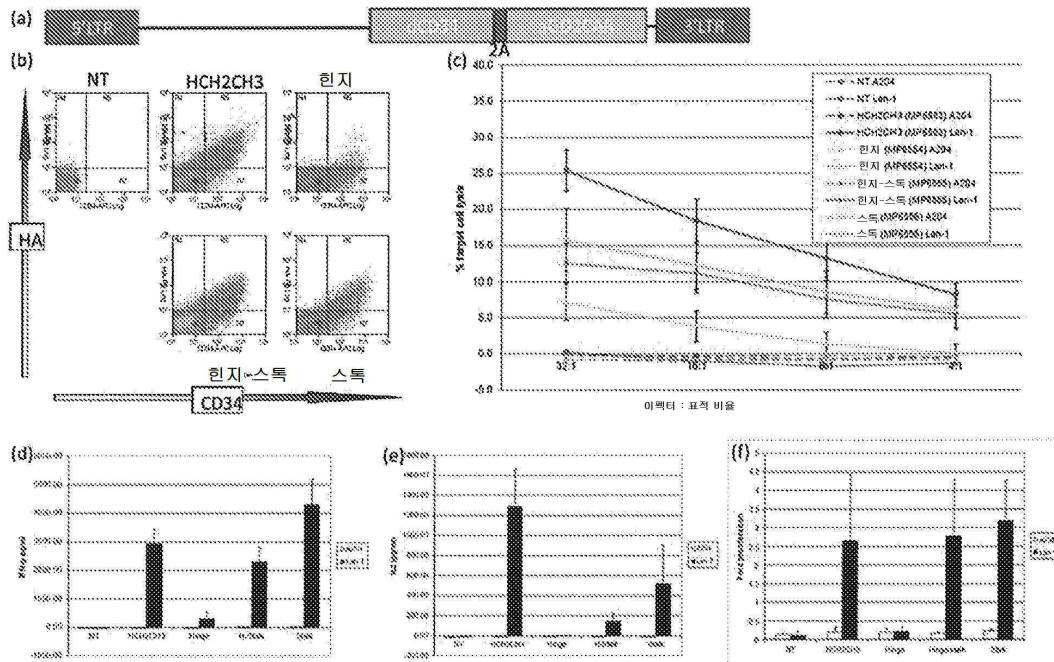
도면2



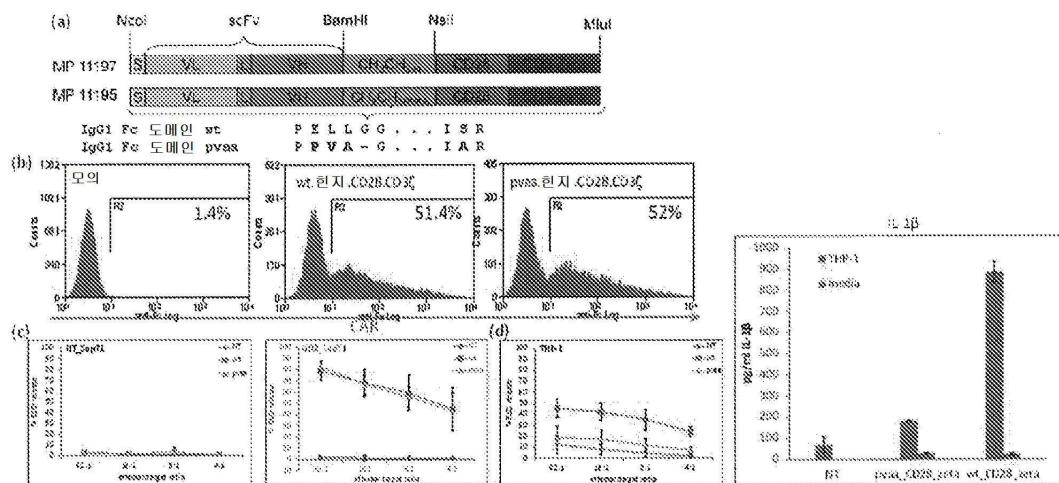
도면3



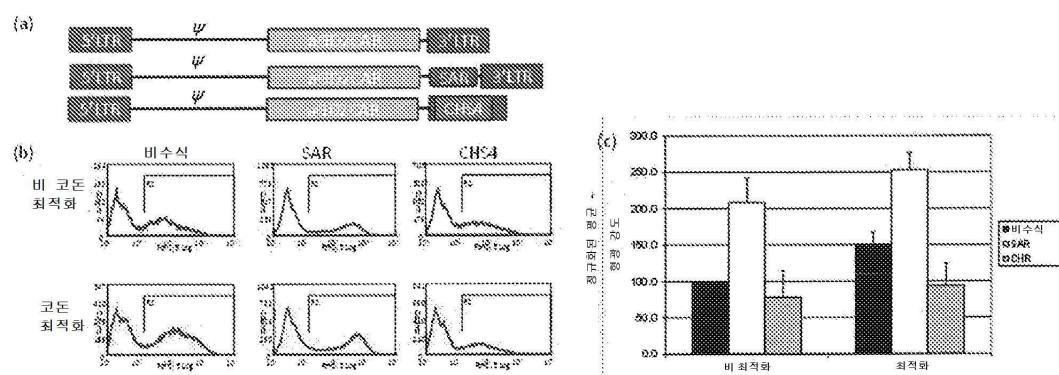
도면4



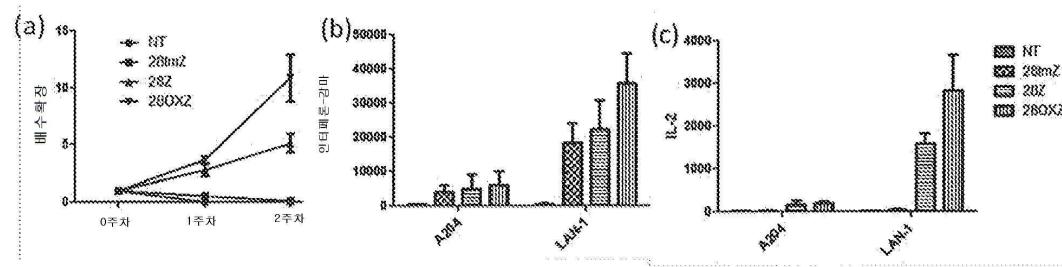
도면5



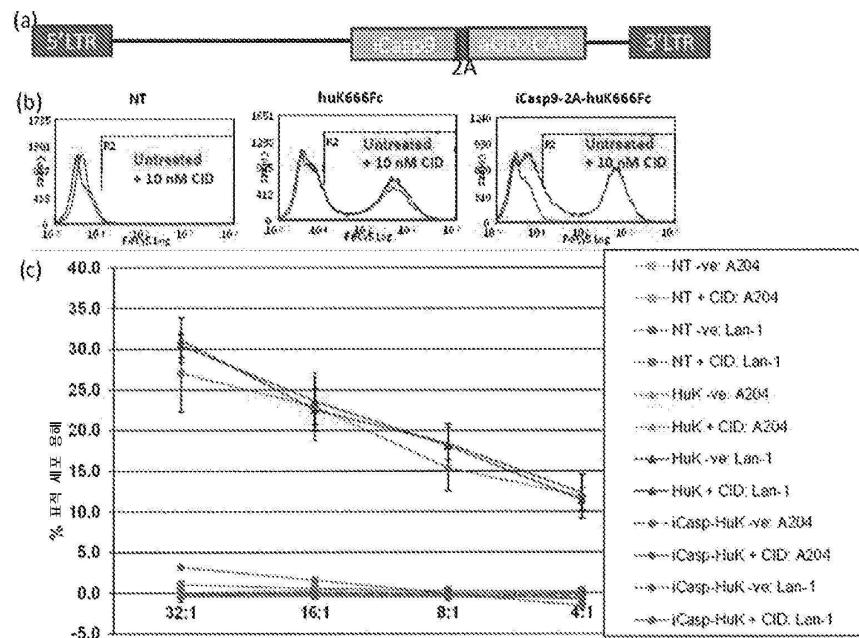
도면6



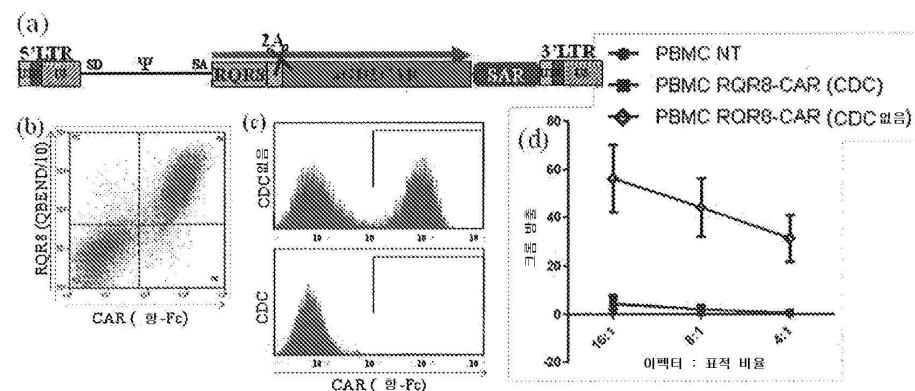
도면7



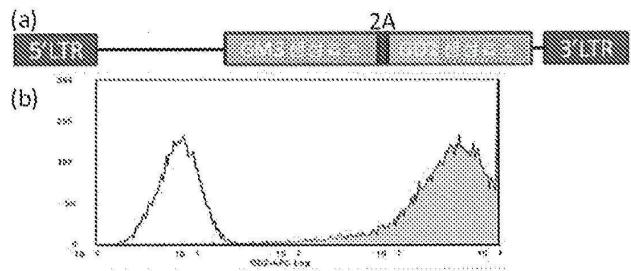
도면8



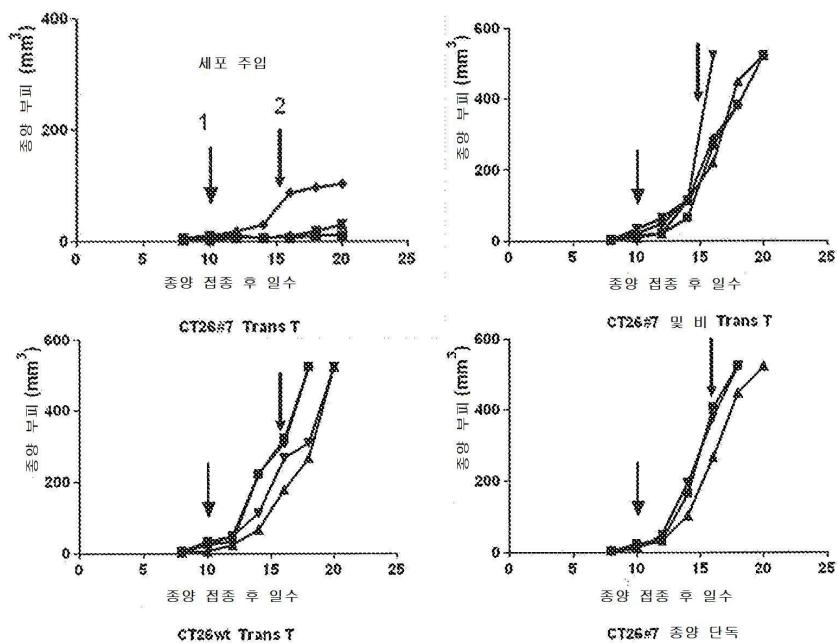
도면9



도면10



도면11



도면12a

A.

METDILLLIVLMLMVPGSTGQVQLKESGPVLVAPSQTLISITCTVSGFSLASPNIIHWVRCQQPGKGLEWLGVIWAGGS
THYNSSLARCLRSKTSKNSKPSLQFLMNSIQQDTTAMYCAKRRSDDSWFAWGGTLTIVSASGGSSGGGGGGGG
GSENALMTCQSPEAINASPGCEKVTMTCRASSSVSSSYLHWYQCGASPKVWVISTNTLASGVPCRFSGSGSGCTSYSL
TISSVEAEDAATYCCQNGSPYIPITFGAGTKVEVRS**SDE**

<http://www.ccgtac.org/CCGTVAPressRelease>

Digitized by srujanika@gmail.com

B.

METDPLLLQWVLLWVPGSISGQVQLQESGFLVKPSQLSITCTVSGFSIASYNIHWVQPPFGKGLWLQGYIWAIGC
TNYNQALMSPLTISDNKSNKGPMMSLTAITAVYCCAKRSDDYSWTFAYWGQSTLTIVTSSGGGGGGGGGGGGGG
SENQNTQSESSLSASVGDURVTTCRASSGVNQSSSYQNGSKAPKVWIYSTNLASGVPFRSGSGSGTDYLT
ISSLOPEDIATYYCQOYSGYPITPFGQGTKVEIKRSDP

EWVLEVVVKEESVLAICSEYLVLVTVAEELIEWV

Digitized by srujanika@gmail.com

9

METDDELLHILWVLLMNVFGSTGQVQLQESCPGLVKPSQTLISITCTVSGFLASAYNIIHWYRQPPIKGLEWLGVIAWGG
TNYNSALMSRLITTSKDNKSNQVFLKMSLTTAQTAVYVCAKRSDDYDSNFAYW3GTLTVTSSGGGSGGGCGGG
SENQNTQSPLSLSAGDRYTMTCRASSWVSSSYLHWYQOMSKGPKVWIVYSTSHIASCQVPFRFSGGSCTDYLITL
ESLQELDFPATTYVQCYQSYGIPFEGGQTRVKEIKRSDP

<http://www.wiley.com/go/advances>

PHOTOGRAPH BY JAMES D. WOODS

D.

METDIDLLEWVLLNWFVGSTGQVQLQESGPGLVKPSQTLISITCTVSGFSLASYNIHWWKQPPGKGLEWLGVIWAGGS
TINYNSALMSRLLTISKUNSKNGYFLKGSSLSIAAOTAVVYCAKSDDYEWTFAYWGCGTLTIVSSGGGSGGGSGGG
SENQMTQSISLSSLAASVGDGRVITMCPRAASSSVVSSYLYHOOQ3GKAEPKVWIYSTENILASGVPSRFSCSGSCTDYTL
ISSLQIPEFDATTYQCQSYGTVFIFQCGTKVEIHRSDT

BRADY'S WEAC GUIDE TO THE WORLD OF SECURITY: FROM CYBER TO PHYSICAL

1

E.
MEIDIDILLWLLIIMVPGSTGQVOLPSCGPGLVKPSQTLISITCTVSGFSLASYNIIHWVPRQPPGKGLEWLGVINAGGS
TNYNSALMSRLTISKDNKNQVFKLMSLTAADTVAVYCAKRSDDY3WNFAYWQGQTIVTVSSGGCGSGGGCGCGGG

TQSPSSSLGASVGDRVTMTCRASSSVGGSYLHWYQOKSGKAPKVWVYSTSBNLASGVPSRFGCGGSDTDTLT

도면 12b

G.
HEEDDTILLIWVLLIWVPGSTGQVQLQESGPGLVKPSQTLSITCIVSGF3LASYNIHWVWRQPGBKLEWLGVIWAGGS
TNVNSALMSRLITKDNSKRNQVFLKMSSITAADTAVYYCARRSDDYSENFAWQGQTLTVT3S3GGGSCGGG3GGGCG
SEMMOPQSPPSLASASVGDVRIMTCRASSSVSSSYLHWWYQOKSKCAPKVWIYTSNIALASGVPSRFSGSGSGTDYTL
ISSLOPEDIATYCCQYSGYPLTFQGQGTKVWEIKRSDP

H.
METDTIDILWILLNLYPGSTGQVOLQESGPGLVKP3QTLSITCTVSGFSLASYNIHWWVRQPPGKGLEWLGVIWAGGS
TNYNSALMSRLTISKUNSKNQVFLKSSLTIAATVYYCAKRSDDYDSWFAYWQGZPLVTVSSCGGGSCGGGSCGGG
SERQMTQPSPLSASAVGDYRIVMTCRASSSSSYSLHWWQOKSCAKPVWYIYSTSNLASCGVFRSGCGGSTDYLTL
ISSLQFEDFATYCCQYSGYFILTQGQGTKEIKR**SDE**

L.
SQLTSITCTVSGFSLASYNIHAWVRQPPGKCLEWLGVWAGGSTNYINSALMGRITISXDNNSKNQVFLXMSSTLAALT
AVYYCAKRSLDYSWEAYWGQGTIVTVSSGGGGSGGGGSGGGSENQMPSPSLSASVGDRVTMTCRASSVSSSEY
LHWYQQKSGKAPKVW1Y9T8NIALSGVFSRFGSGSGCTDYTLTISLQPEDFATYYDQOYEGSYITFCGQGTKEI
SDP

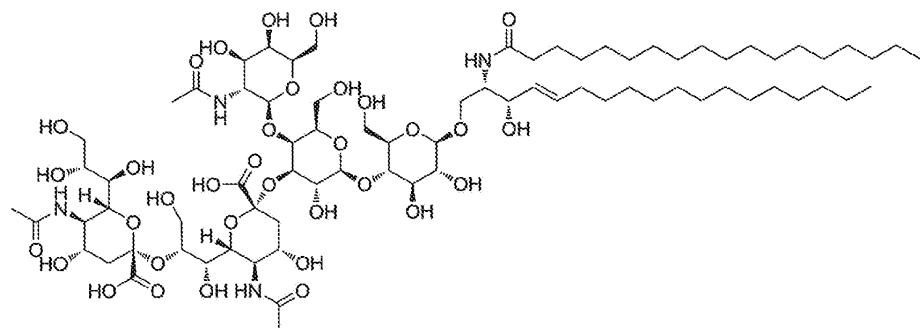
FWVLVVVGGVLACYELLVTVAFIIIFWWV
KMPKRLVLLVLTGNTPEHGGETHNGPYYRERGFAE

L
MEEITDILLLVLLWVPGSTGOVQLOESGPGLVKPSQTLISITCTVSGFSILAS
YNIHWVVRQFPGKOLEWLGVIVIAGGGSTNYNSAIMSRLTISKDNISKNOVFLKMSSLTAA
DTAVYYCAKRSDDYSWFAY
WGCGTLLTVESGGGGSGGGGSENOQTQSPSLSA3VCDRVTMTCRASSSVSSSEYLHNYQOKSGKA
STEMLASCVESRFSCSGSGTBYTLTISSLQPEDFATYYCQYSEGYPIFEFGQTKVEIKRSDF
FWVLV
VGGVILACISSLVIAFLLFLV

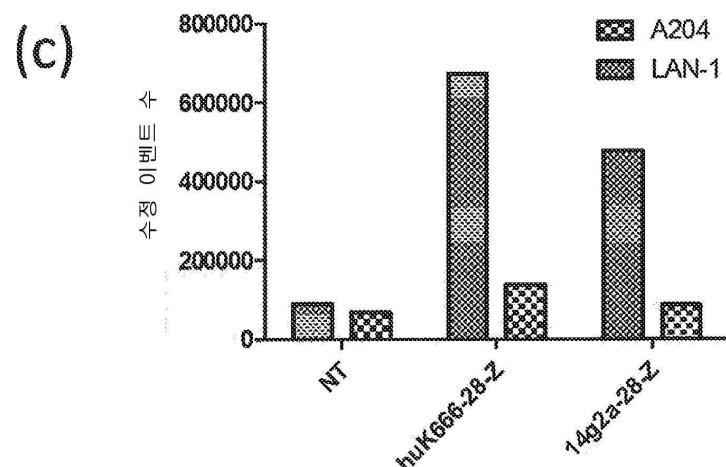
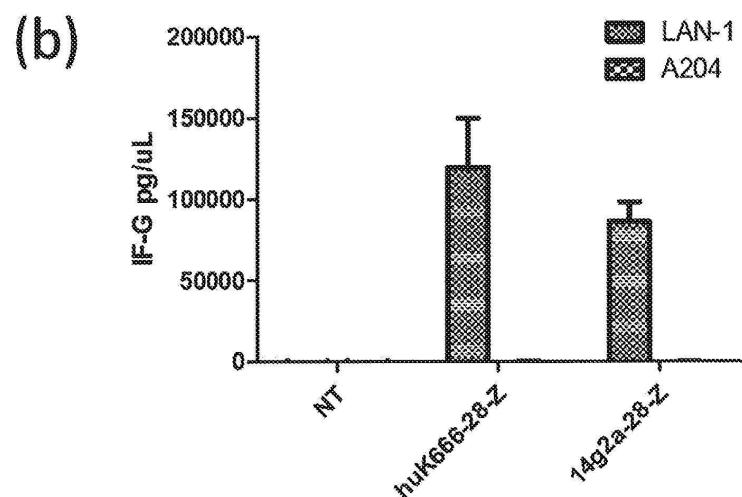
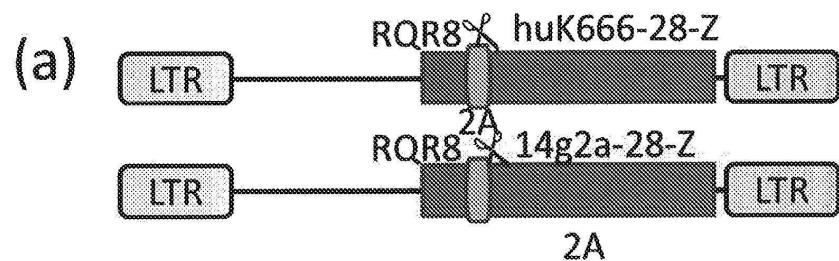
도면 12c

영역	설명
iCasp9	iCas9 또는 RQR8
구제역 질환 2A 펩티드	구제역 질환 2A 펩티드
신호 펩티드	신호 펩티드
scFv1	scFv (muKM666 또는 huKM666)
SDP	령커 및 시슬 절단
CD28 / TM	CD28 막관통 도메인
CD28 endo	CD28 엔도도메인
OX40 endo	OX40 엔도도메인
CD3 Zeta	CD3 제타 엔도도메인

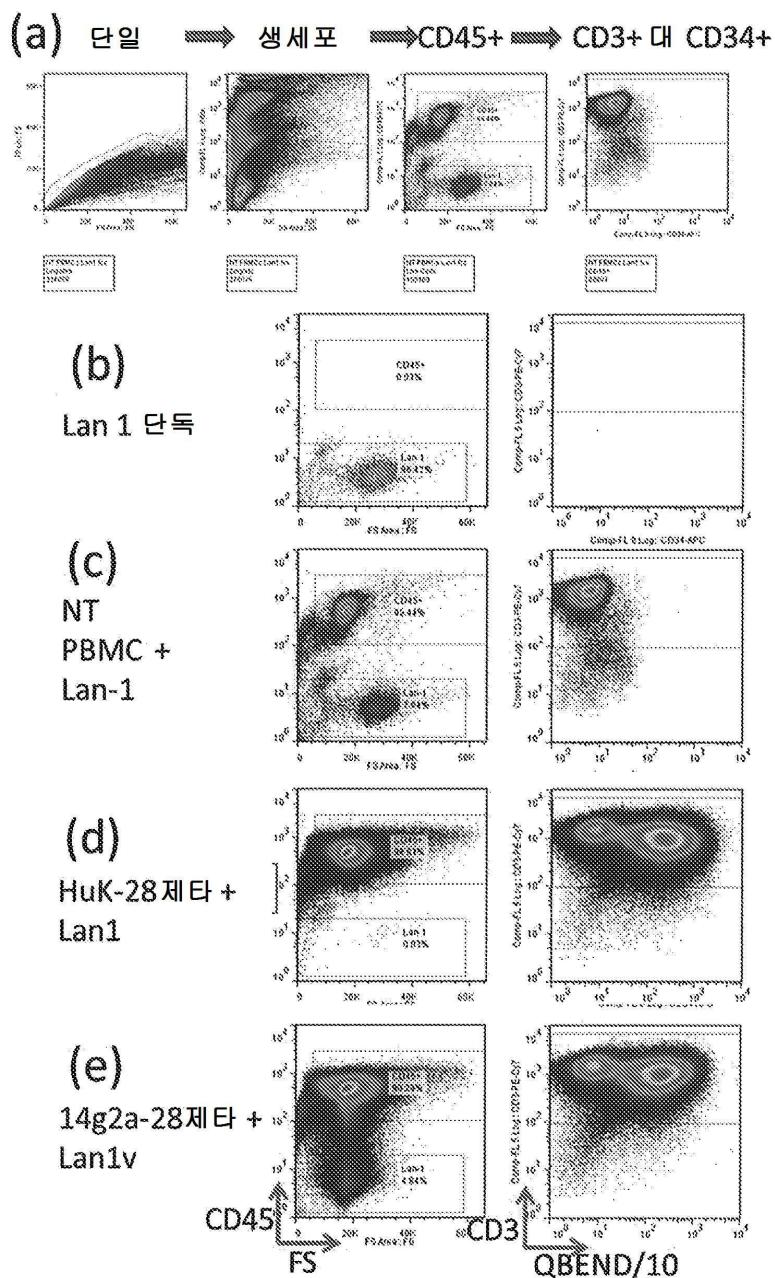
도면13



도면14



도면15



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> UCL Business PLC

<120> CHIMERIC ANTIGEN RECEPTOR

<130> P103293PCT

<150> 1403972.1

<151> 2014-03-06

<160> 37

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Heavy chain variable region CDR1

<400> 1

Ser Tyr Asn Ile His

1 5

<210> 2

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Heavy chain variable region CDR2

<400> 2

Val Ile Trp Ala Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Leu Met Ser

1 5 10 15

<210> 3

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Heavy chain variable region CDR3

<400> 3

Arg Ser Asp Asp Tyr Ser Trp Phe Ala Tyr

1 5 10

<210> 4

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Light chain variable region CDR1

<400> 4

Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu His

1 5 10

<210> 5

<211>

> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Light chain variable region CDR2

<400> 5

Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser

1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Light chain variable region CDR3

<400> 6

Gln Gln Tyr Ser Gly Tyr Pro Ile Thr

1 5

<210> 7

<211> 243

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Murine KM666 sequence

<400> 7

Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Val Leu Val Ala Pro Ser Gln

1 5 10 15

Thr Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ala Ser Tyr

20 25 30

Asn Ile His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu

35 40 45

Gly Val Ile Trp Ala Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Leu Met

50 55 60

Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu

65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala

85 90 95

Lys Arg Ser Asp Asp Tyr Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ala Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly

115 120 125

Ser Gly Gly Gly Ser Glu Asn Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile

130 135 140

Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser

145 150 155 160

Ser Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly

165 170 175

Ala Ser Pro Lys Val Trp Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly

180 185 190

Val Pro Gly Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu

195 200 205

Thr Ile Ser Ser Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln

210 215 220

Gln Tyr Ser Gly Tyr Pro Ile Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Val Glu

225 230 235 240

Val Lys Arg

<210> 8

<211> 242

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Humanised KM666 sequence

<400> 8

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln

1 5 10 15

Thr Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ala Ser Tyr

20 25 30

Asn Ile His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu

35 40 45

Gly Val Ile Trp Ala Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Leu Met

50 55 60

Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val Phe Leu

65 70 75 80

Lys Met Ser Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala

85 90 95

Lys Arg Ser Asp Asp Tyr Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser

115 120 125

Gly Gly Gly Ser Glu Asn Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu

130 135 140

Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser

145 150 155 160

Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Lys

165 170 175

Ala Pro Lys Val Trp Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val

180 185 190

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr

195 200 205

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln

210 215 220

Tyr Ser Gly Tyr Pro Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile

225 230 235 240

Lys Arg

<210> 9

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Murine KM666 VH (heavy chain variable region) sequence

<400> 9

Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Val Leu Val Ala Pro Ser Gln

1 5 10 15

Thr Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ala Ser Tyr

20 25 30

Asn Ile His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu

35 40 45

Gly Val Ile Trp Ala Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Leu Met

50 55 60

Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu

65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala

85 90 95

Lys Arg Ser Asp Asp Tyr Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ala

115

<210> 10

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Humanised KM666 VH sequence

<400> 10

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln

1 5 10 15

Thr Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ala Ser Tyr

20 25 30

Asn Ile His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu

35 40 45

Gly Val Ile Trp Ala Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Leu Met

50 55 60

Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val Phe Leu

65	70	75	80
Lys Met Ser Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala			
85	90	95	
Lys Arg Ser Asp Asp Tyr Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr			
100	105	110	
Leu Val Thr Val Ser Ser			

115

<210> 11

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Murine KM666 VL (light chain variable region) sequence

<400> 11

Glu Asn Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser

20 25 30

Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Ala Ser Pro Lys Val Trp

35 40 45

Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Gly Arg Phe Ser

50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Val Glu

65 70 75 80

Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Gly Tyr Pro

85 90 95

Ile Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Val Glu Val Lys

100 105

<210> 12

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Humanised KM666 VL sequence

<400> 12

Glu Asn Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser

20 25 30

Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Lys Ala Pro Lys Val Trp

35 40 45

Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser

50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln

65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Gly Tyr Pro

85 90 95

Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 13

<211> 27

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Transmembrane domain

<400> 13

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> 14

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD28 endodomain

<400> 14

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

35

<210> 15

<211> 38

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD40 endodomain

<400> 15

Arg Ser Arg Asp Gln Arg Leu Pro Pro Asp Ala His Lys Pro Pro Gly

1 5 10 15

Gly Gly Ser Phe Arg Thr Pro Ile Gln Glu Glu Gln Ala Asp Ala His

20 25 30

Ser Thr Leu Ala Lys Ile

35

<210> 16

<211> 114

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD3 zeta endodomain

<400> 16

Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln

1 5 10 15

Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu

20 25 30

Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly

35 40 45

Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu

50 55 60

Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly

65 70 75 80

Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser
 85 90 95
 Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro
 100 105 110
 Pro Arg

<210> 17
 <211> 153
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CD28Z
 <400> 17

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 Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser
 35 40 45
 Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu
 50 55 60

Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg
 65 70 75 80
 Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln
 85 90 95
 Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr
 100 105 110
 Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Gly Lys His Asp
 115 120 125

Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala
 130 135 140
 Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 145 150

<210> 18

<211> 189

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD280XZ

<400> 18

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 Arg Asp Gln Arg Leu Pro Pro

35 40 45

Asp Ala His Lys Pro Pro Gly Gly Ser Phe Arg Thr Pro Ile Gln

50 55 60

Glu Glu Gln Ala Asp Ala His Ser Thr Leu Ala Lys Ile Arg Val Lys

65 70 75 80

Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln

85 90 95

Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu

100 105 110

Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg

115 120 125

Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met

130 135 140

Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly

145 150 155 160

Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp

165 170 175

Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg

180 185

<210> 19

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Signal peptide

<400> 19

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro

1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly

20

<210> 20

<211> 234

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Hinge-CH2CH3 of human IgG1 spacer

<400> 20

Ala Glu Pro Lys Ser Pro Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro

1 5 10 15

Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro

20 25 30

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ala Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val

35 40 45

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val

50 55 60

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln

65 70 75 80

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln

85 90 95

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala

100 105 110

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro

115 120 125

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr

130 135 140

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 145 150 155 160
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 165 170 175

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 180 185 190

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 195 200 205

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 210 215 220

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Lys Asp
 225 230

<210> 21

<211> 46

<212>

PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Human CD8 stalk spacer

<400> 21

Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala

1 5 10 15

Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly

20 25 30

Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile

35 40 45

<210> 22

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Human IgG1 hinge spacer

<400> 22

Ala Glu Pro Lys Ser Pro Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro

1 5 10 15

Lys Asp Pro Lys

20

<210> 23

<211> 237

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IgG1 Hinge-Fc spacer

<400> 23

Ala Glu Pro Lys Ser Pro Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro

1 5 10 15

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys

20 25 30

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val

35 40 45

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr

50 55 60

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu

65 70 75 80

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His

85 90 95

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys

100 105 110

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln

115 120 125

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu

130 135 140

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro

145 150 155 160

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn

165 170 175

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu

180 185 190

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 195 200 205
 Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln

210 215 220
 Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Lys Asp Pro Lys
 225 230 235
 <210> 24
 <211> 236
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> IgG1 Hinge spacer - Fc modified to remove Fc receptor recognition motifs

<400> 24
 Ala Glu Pro Lys Ser Pro Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 1 5 10 15
 Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro

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

85 90 95
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 100 105 110
 Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 115 120 125
 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
 130 135 140

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser

145 150 155 160

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr

165 170 175

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr

180 185 190

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe

195 200 205

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys

210 215 220

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Lys Asp Pro Lys

225 230 235

<210> 25

<211> 6014

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Retroviral cassette

<400> 25

tgaaagaccc caccgttagg tttggcaagc tagcttaagt aacgccattt tgcaaggcat	60
ggaaaaatac ataactgaga atagaaaagt tcagatcaag gtcaggaaca gatgaaacag	120
ctgaatatgg gccaaacagg atatctgtgg taagcagttc ctgccccggc tcagggccaa	180

gaacagatgg aacagctgaa tatggccaa acaggatatac tgtggtaagc agttcctgcc	240
ccggctcagg gccaagaaca gatggcccc agatcggtc cagccctcag cagtttctag	300
agaaccatca gatgttcca gggtgcccc aggacctgaa atgaccctgt gccttatttg	360
aactaaccaa tcagttcgct tctcgcttct gttcgccgc ttatgctccc cgagctaat	420
aaaagagccc acaaccctc actcgccccg ccagtcctcc gattgactga gtcgccccgg	480
tacccgtgta tccaataaac cctcttgcag ttgcattccga cttgtggct cgctgttct	540
tgggagggtc tcctctgagt gattgactac ccgtcagcgg gggtctttca tttggggct	600

cgtccggat cgggagaccc ctgcccagg accaccgacc caccaccggg aggttaagctg	660
gccagcaact tatctgtgtc tgtccgattt tctagtgct atgactgatt ttatgcgcct	720
gcgtcggtac tagtagcta actagctctg tatctggcgg acccgtgggt gaactgacga	780

gttcggaaca cccggccga accctggag acgtcccagg gacttcgggg gccgttttg	840
tggcccgacc tgagtctaa aatcccgatc gttaggact ctttggtgca ccccccttag	900
aggagggata tgggttctg gtaggagacg agaacctaaa acagttcccg cctccgtctg	960
aatttttgtt ttcggtttgg gaccgaagcc gcgcgcgcg tcttgcgtcg tgcagcatcg	1020
ttctgtgttg tctctgtctg actgtgttc tgtattgtc taaaaatatg ggccggcgt	1080
agcctgttac cactccctta agttgacct taggtactg gaaagatgtc gagcggatcg	1140
ctcacaacca gtcggtagat gtcaagaaga gacgtgggt tacttctgc tctcagaat	1200
ggccaacctt taacgtcgga tggccgcgag acggcacctt taaccgagac ctcatcaccc	1260
aggttaagat caaggcttt tcacctggcc cgcatggaca cccagaccag gtgggtaca	1320
tcgtgacctg ggaaggcttg gctttgacc cccctccctg ggtcaagccc ttttacacc	1380
ctaagectcc gcctccctt cctccatecg ccccgctct ccccttgaa cctcctcggt	1440
cgaccccgcc tcgatccctcc ctttatccag ccctactcc ttctctaggc gccccatata	1500
ggccatatga gatcttatat gggcaccccc cgcccttgt aaactccct gaccctgaca	1560
tgacaagagt tactaacagc ccctctctcc aagctactt acaggctctc tacttagtcc	1620
agcacgaagt ctggagacct ctggggcag cctaccaaga acaactggac cgaccgggtgg	1680
tacccctaccc ttaccgagtc ggacacacag tgtgggtccg ccgacaccag actaagaacc	1740
tagaacctcg ctggaaagga ctttacacag tcctgctgac cacccccacc gccctcaaag	1800
tagacggcat cgacgttgg atacacgcgc cccacgtgaa ggctgcgcac cccgggggtg	1860
gaccatcctc tagactgcca acatggcac cagcgtgtc tgctggatgg ccctgtgcct	1920
gctggcgcc gaccacgccc atgcctgccc ctacagcaac cccagcctgt gcagcggagg	1980
cggccgcagc gagctgccc cccagggcac ctttccaaac gtgtccacca acgtgagccc	2040
agccaaagccc accaccaccc cctgtcctta ttccaaatct tccctgtgtaa gcggaggggg	2100
aggcagccca gccccagac ctccccaccc agccccacc atgcgcagcc agccctgtgag	2160
cctgagaccc gaggcctgccc gcgcgcgc cggccgcgc gtgcacacca gaggcctgga	2220
tttcgcctgc gatatctaca tctggccccc actggccgc acctgtggcg tgctgctgct	2280
gagcgtggtg atcacctgt actgcaacca cgcacccgc aggccgtgt gcaagtgc	2340
caggccctgt gtgagagccg agggcagagg cagcgtgtc acctgcggcg acgtggagga	2400
gaacccagggc cccatggaga ccgcacccct gctgtgtgg gtgtgtgc tgggtgcc	2460
aggcagccacc gcgcagggtgc agctgcagga gtctggccca ggcctggta agcccgccca	2520
gaccctgagc atcacctgca cctgtgcggg cttcagccctg gcgcacacca acatccatg	2580
gtgcggcag ccccccaggca agggcctgga gtggctggc gtgatctgg ctggccgcag	2640

caccaactac aacagcgccc tcatgagccg gctgaccatc agcaaggaca acagcaagaa	2700
ccaggtgttc ctgaagatga gcagcctgac agccgcccac accggcgtgt actactgcgc	2760
caagcggagc gacgactaca gctggttcgc ctactggggc cagggcaccc tggtgaccgt	2820
gagctctggc ggaggcggct ctggcggagg cggctctggc ggaggcggca gcgagaacca	2880
gatgaccagg agccccagca gtttgagcgc cagcgtggc gaccgggtga ccatgacctg	2940
cagagccagc agcagcgtga gcagcagcta cctgactgg taccagcaga agagcggcaa	3000
ggccccaag gtgtggatct acagcaccag caacctggcc agcggcgtgc ccagccggtt	3060
cagcggcagc ggcagcggca ccgactacac cctgaccatc agcagcctgc agcccgagga	3120
cttcgccacc tactactgcc agcagtacag cggctacccc atcaccccg gccagggcac	3180
caaggtggag atcaagcggt cgatcccgcc cgagccaaa tctcctgaca aaactcacac	3240
atgcccaccg tgcccagcac ctcccggtgc cggccgtca gtcttcctct tccccccaaa	3300
acccaaggac accctcatga tcgcccggac ccctgaggc acatgcgtgg tggtggacgt	3360
gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtaacgtg gacggcgtgg aggtgcataa	3420
tgccaagaca aagcgcggg aggagcagta caacagcacg taccgtgtgg tcagcgtcct	3480
caccgtctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac aagtgcaggaa tctccaacaa	3540
agccctccca gccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc aaagggcagc cccgagaacc	3600
acaggtgtac accctgcccc catcccgga tgagctgacc aagaaccagg tcagccctgac	3660
ctgcctggtc aaaggcttct atcccagcga catgcgtgt gagtgggaga gcaatggca	3720
accggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgtggac tccgacggct ctttcttct	3780
ctacagcaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag gggAACGTCT tctcatgctc	3840
cgtgatgcat gaggccctgc acaatacta taccagaaaa tctctgagtc tgagccagg	3900
caagaaggac cccaagttct gggtctggg ggtgggtggaa ggcgtgtgg cctgttactc	3960
tctcctgggt accgtggct tcatcattt ctgggtgcgc tccaagagga gcaggctct	4020
gcacagtgtac tacatgaaca tgactccccg ccgccccggg cccaccgcgca agcattacca	4080
gccctatgcc ccaccacgcg acttcgcagc ctatgcgtcc cgggtgaagt tctctcgctc	4140
tgccgatgcc ccagcctatc agcaggccca gaatcagctg tacaatgaac tgaacctggg	4200
caggcgggag gactacgacg tgctggataa gcggagagggc agagaccccg agatggcgg	4260
caaaccacgg cggaaaaatc cccaggaggg actctataac gagctgcaga aggacaaaat	4320
ggccgaggcc tattccgaga tcggcatgaa gggagagaga agacgcggaa agggccacga	4380

cggcctgtat cagggattgt ccaccgctac aaaagataca tatgatgcc tgcacatgca	4440
ggccctgcca cccagatgac gcgttatcgat actgttctca tcacatcata tcaaggttat	4500
ataccatcaa tattgccaca gatgttactt agcctttaa tatttccta atttagtgta	4560
tatgcaatga tagtctctg atttctgaga ttgagttct caigtgtaat gattatttag	4620
agtttcttt tcatctgttc aaattttgt ctatgtttat ttttactga tttgtaaagac	4680
ttcttttat aatctgcata ttacaattct cttaactggg gtgtgcaaa tatttctgt	4740
cattctatgg cctgactttt cttaatggtt ttttaatttt aaaaataagt cttaatattc	4800
atgcaatcta attaacaatc ttttcttgt ggtaggact ttgagtcata agaaatttt	4860
ctctacactg aagtcatgat ggcatgcic tatattattt tctaaaagat ttaagttt	4920
gccttctcca tttagactta taattcactg gaatttttt gtgttatgg tatgacatat	4980
gggttccctt ttatTTTta catataaata tattccctg ttttctaaa aaagaaaaag	5040
atcatcattt tcccattgta aaatgccata tttttcat aggtcactta catatatcaa	5100
tgggtctgtt tctgagctct actctatTTt atcagcctca ctgtctatcc ccacacatct	5160
catgctttgc tctaaatctt gatatttagt ggaacattct ttcccatTTt gtttacaag	5220
aatatttttg ttattgtctt tgggcttct atatacattt tgaaatgagg ttgacaagtt	5280
cgaggtagtc caattgtta aagacaggat atcagtggtc caggctctag ttttgactca	5340
acaatatcac cagctgaagc ctatagagta cgagccatag ataaaataaa agattttatt	5400
tagtctccag aaaaaggggg gaatgaaaga ccccacctgt aggtttggca agctagctt	5460
agtaacgcca ttttgcagg catgaaaaaa tacataactg agaatagaga agttcagatc	5520
aaggctagga acagatggaa cagctgaata tggccaaac aggatatctg tggtaagcag	5580
ttcctgcccc ggctcaggc caagaacaga tggaacagct gaatatggc caaacaggat	5640
atctgtggta agcagttcct gccccggctc agggccaaga acagatggtc cccagatgct	5700
gtccagccct cagcagttc tagagaacca tcagaatgtt ccaggggcc ccaaggacct	5760
gaaatgaccc tgcgccttat ttgactaac caatcagtcc gttctcgct tctttcgcg	5820
cgcttctgct ccccgagctc aataaaagag cccacaaccc ctcaactcggg ggcgcagtc	5880
tccgattgac tgagtcgccc gggtaaccgt gtatccaata aaccctttg cagttgcac	5940
cgacttgcgg tctcgctgtt cttggggagg gtctctctg agtgattgac taccctcag	6000
cgggggtctt tcac	6014

<210> 26

<211> 719

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-GD2 CAR, muKM666-HCH2CH3-CD280XZ

<400> 26

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Trp Val Pro

1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Val Leu Val

20 25 30

Ala Pro Ser Gln Thr Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser

35 40 45

Leu Ala Ser Tyr Asn Ile His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly

50 55 60

Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Ala Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Asn

65 70 75 80

Ser Ala Leu Met Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser

85 90 95

Gln Val Phe Leu Gln Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Met

100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Lys Arg Ser Asp Asp Tyr Ser Trp Phe Ala Tyr Trp

115 120 125

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ser Gly Gly Gly Ser

130 135 140

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Asn Val Leu Thr Gln

145 150 155 160

Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr

165 170 175

Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu His Trp Tyr Gln

180 185 190

Gln Lys Ser Gly Ala Ser Pro Lys Val Trp Ile Tyr Ser Thr Ser Asn

195 200 205

Leu Ala Ser Gly Val Pro Gly Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr

210 215 220

Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr

225	230	235	240
-----	-----	-----	-----

Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Gly Tyr Pro Ile Thr Phe Gly Ala Gly

245	250	255
-----	-----	-----

Thr Lys Val Glu Val Lys Arg Ser Asp Pro Ala Glu Pro Lys Ser Pro

260	265	270
-----	-----	-----

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly

275	280	285
-----	-----	-----

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met

290	295	300
-----	-----	-----

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His

305	310	315	320
-----	-----	-----	-----

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val

325	330	335
-----	-----	-----

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr

340	345	350
-----	-----	-----

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly

355	360	365
-----	-----	-----

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile

370	375	380
-----	-----	-----

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val

385	390	395	400
-----	-----	-----	-----

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser

405	410	415
-----	-----	-----

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu

420	425	430
-----	-----	-----

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro

435	440	445
-----	-----	-----

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val

450	455	460
-----	-----	-----

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met

465	470	475	480
-----	-----	-----	-----

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser

485 490 495

Pro Gly Lys Lys Asp Pro Lys Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly

500 505 510

Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe

515 520 525

Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn

530 535 540

Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr

545 550 555 560

Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Asp Gln Arg Leu

565 570 575

Pro Pro Asp Ala His Lys Pro Pro Gly Gly Ser Phe Arg Thr Pro

580 585 590

Ile Gln Glu Glu Gln Ala Asp Ala His Ser Thr Leu Ala Lys Ile Arg

595 600 605

Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln

610 615 620

Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp

625 630 635 640

Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Lys Pro

645 650 655

Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp

660 665 670

Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg

675 680 685

Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr

690 695 700

Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg

705 710 715

<210> 27

<211> 718

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-GD2 CAR, huKM666-HCH2CH3-CD28OXZ

<400> 27

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro

1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val

20 25 30

Lys Pro Ser Gln Thr Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser

35 40 45

Leu Ala Ser Tyr Asn Ile His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly

50 55 60

Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Ala Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Asn

65 70 75 80

Ser Ala Leu Met Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn

85 90 95

Gln Val Phe Leu Lys Met Ser Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val

100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Lys Arg Ser Asp Asp Tyr Ser Trp Phe Ala Tyr Trp

115 120 125

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly

130 135 140

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Asn Gln Met Thr Gln Ser

145 150 155 160

Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Met Thr Cys

165 170 175

Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln

180 185 190

Lys Ser Gly Lys Ala Pro Lys Val Trp Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu

195 200 205

Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp

210 215 220

Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr

225 230 235 240

Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Gly Tyr Pro Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr

245 250 255

Lys Val Glu Ile Lys Arg Ser Asp Pro Ala Glu Pro Lys Ser Pro Asp

260 265 270

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly

275 280 285

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile

290 295 300

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu

305 310 315 320

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His

325 330 335

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg

340 345 350

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys

355 360 365

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu

370 375 380

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr

385 390 395 400

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu

405 410 415

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp

420 425 430

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val

435 440 445

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp

450	455	460
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His		
465	470	475
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro		
485	490	495
Gly Lys Lys Asp Pro Lys Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val		
500	505	510
Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp		
515	520	525
Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met		
530	535	540
Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala		
545	550	555
Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Asp Gln Arg Leu Pro		
565	570	575
Pro Asp Ala His Lys Pro Pro Gly Gly Ser Phe Arg Thr Pro Ile		
580	585	590
Gln Glu Glu Gln Ala Asp Ala His Ser Thr Leu Ala Lys Ile Arg Val		
595	600	605
Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn		
610	615	620
Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val		
625	630	635
Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Lys Pro Arg		
645	650	655
Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys		
660	665	670
Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg		
675	680	685
Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys		
690	695	700

Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg

705 710 715

<210> 28

<211> 717

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-GD2 CAR, huKM666-HCH2CH3pvaa-CD280XZ

<400> 28

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Trp Val Pro

1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val

20 25 30

Lys Pro Ser Gln Thr Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser

35 40 45

Leu Ala Ser Tyr Asn Ile His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly

50 55 60

Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Ala Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Asn

65 70 75 80

Ser Ala Leu Met Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn

85 90 95

Gln Val Phe Leu Lys Met Ser Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val

100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Lys Arg Ser Asp Asp Tyr Ser Trp Phe Ala Tyr Trp

115 120 125

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly

130 135 140

Gly Gly Ser Gly Gly Ser Glu Asn Gln Met Thr Gln Ser

145 150 155 160

Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Met Thr Cys

165 170 175

Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln

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

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 435 440 445
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 450 455 460
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 465 470 475 480
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 485 490 495

 Lys Lys Asp Pro Lys Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu
 500 505 510
 Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val
 515 520 525
 Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr
 530 535 540
 Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro
 545 550 555 560

 Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Asp Gln Arg Leu Pro Pro
 565 570 575
 Asp Ala His Lys Pro Pro Gly Gly Ser Phe Arg Thr Pro Ile Gln
 580 585 590
 Glu Glu Gln Ala Asp Ala His Ser Thr Leu Ala Lys Ile Arg Val Lys
 595 600 605
 Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln
 610 615 620

 Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu
 625 630 635 640
 Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg
 645 650 655
 Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met
 660 665 670
 Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly

675

680

685

Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp

690

695

700

Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg

705

710

715

<210> 29

<211> 527

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-GD2 CAR, huKM666-HSTK-CD280XZ

<400> 29

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro

1

5

10

15

Gly Ser Thr Gly Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val

20

25

30

Lys Pro Ser Gln Thr Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser

35

40

45

Leu Ala Ser Tyr Asn Ile His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly

50

55

60

Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Ala Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Asn

65

70

75

80

Ser Ala Leu Met Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn

85

90

95

Gln Val Phe Leu Lys Met Ser Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val

100

105

110

Tyr Tyr Cys Ala Lys Arg Ser Asp Asp Tyr Ser Trp Phe Ala Tyr Trp

115

120

125

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly

130

135

140

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Glu Asn Gln Met Thr Gln Ser

145

150

155

160

Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Met Thr Cys

165 170 175

Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln

180 185 190

Lys Ser Gly Lys Ala Pro Lys Val Trp Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu

195 200 205

Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp

210 215 220

Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr

225 230 235 240

Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Gly Tyr Pro Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr

245 250 255

Lys Val Glu Ile Lys Arg Ser Asp Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg

260 265 270

Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg

275 280 285

Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly

290 295 300

Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly

305 310 315 320

Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe

325 330 335

Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn

340 345 350

Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr

355 360 365

Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Asp Gln Arg Leu

370 375 380

Pro Pro Asp Ala His Lys Pro Pro Gly Gly Ser Phe Arg Thr Pro

385 390 395 400

Ile Gln Glu Glu Gln Ala Asp Ala His Ser Thr Leu Ala Lys Ile Arg

405 410 415

Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln

420 425 430

Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp

435 440 445

Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro

450 455 460

Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp

465 470 475 480

Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg

485 490 495

Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr

500 505 510

Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg

515 520 525

<210> 30

<211> 527

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><23> ant i-GD2 CAR, huKM666-STK-CD28XOZ

<400> 30

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Trp Val Pro

1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val

20 25 30

Lys Pro Ser Gln Thr Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser

35 40 45

Leu Ala Ser Tyr Asn Ile His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly

50 55 60

Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Ala Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Asn

65 70 75 80

Ser Ala Leu Met Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn

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

Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn

340 345 350

Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr

355 360 365

Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Asp Gln Arg Leu

370 375 380

Pro Pro Asp Ala His Lys Pro Pro Gly Gly Ser Phe Arg Thr Pro

385 390 395 400

Ile Gln Glu Glu Gln Ala Asp Ala His Ser Thr Leu Ala Lys Ile Arg

405 410 415

Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln

420 425 430

Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp

435 440 445

Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Lys Pro

450 455 460

Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp

465 470 475 480

Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg

485 490 495

Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr

500 505 510

Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg

515 520 525

<210> 31

<211> 501

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-GD2 CAR, huKM666-HNG-CD280XZ

<400> 31

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro

1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val

20 25 30

Lys Pro Ser Gln Thr Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser

35 40 45

Leu Ala Ser Tyr Asn Ile His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly

50 55 60

Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Ala Gly Ser Thr Asn Tyr Asn

65 70 75 80

Ser Ala Leu Met Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn

85 90 95

Gln Val Phe Leu Lys Met Ser Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val

100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Lys Arg Ser Asp Asp Tyr Ser Trp Phe Ala Tyr Trp

115 120 125

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly

130 135 140

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Glu Asn Gln Met Thr Gln Ser

145 150 155 160

Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Met Thr Cys

165 170 175

Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln

180 185 190

Lys Ser Gly Lys Ala Pro Lys Val Trp Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu

195 200 205

Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp

210 215 220

Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr

225 230 235 240

Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Gly Tyr Pro Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr

245 250 255

Lys Val Glu Ile Lys Arg Ser Asp Pro Ala Glu Pro Lys Ser Pro Asp

260	265	270
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Lys Asp Pro Lys Phe Trp Val		
275	280	285
Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr		
290	295	300
Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu		
305	310	315
His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg		
325	330	335
Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg		
340	345	350
Ser Arg Asp Gln Arg Leu Pro Pro Asp Ala His Lys Pro Pro Gly Gly		
355	360	365
Gly Ser Phe Arg Thr Pro Ile Gln Glu Glu Gln Ala Asp Ala His Ser		
370	375	380
Thr Leu Ala Lys Ile Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro		
385	390	395
Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly		
405	410	415
Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro		
420	425	430
Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr		
435	440	445
Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly		
450	455	460
Met Lys Gly Glu Arg Arg Gly Lys His Asp Gly Leu Tyr Gln		
465	470	475
Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln		
485	490	495
Ala Leu Pro Pro Arg		
500		

<210> 32

<211> 642

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-GD2 CAR, huKM666-HCH2CH3pvaa-CD28tmZ

<400> 32

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro

1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val

20 25 30

Lys Pro Ser Gln Thr Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser

35 40 45

Leu Ala Ser Tyr Asn Ile His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly

50 55 60

Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Ala Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Asn

65 70 75 80

Ser Ala Leu Met Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn

85 90 95

Gln Val Phe Leu Lys Met Ser Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val

100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Lys Arg Ser Asp Asp Tyr Ser Trp Phe Ala Tyr Trp

115 120 125

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly

130 135 140

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Glu Asn Gln Met Thr Gln Ser

145 150 155 160

Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Met Thr Cys

165 170 175

Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln

180 185 190

Lys Ser Gly Lys Ala Pro Lys Val Trp Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu

195 200 205

Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Thr Asp

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

450	455	460
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu		
465	470	475
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly		
485	490	495
Lys Lys Asp Pro Lys Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu		
500	505	510
Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val		
515	520	525
Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln		
530	535	540
Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu		
545	550	555
Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly		
565	570	575
Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu		
580	585	590
Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly		
595	600	605
Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser		
610	615	620
Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro		
625	630	635
Pro Arg		
<210> 33		
<211> 681		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		
<220><223> anti-GD2 CAR, huMK666-HCH2CH3pvaa-CD28Z		
<400> 33		

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Trp Val Pro

1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val

20 25 30

Lys Pro Ser Gln Thr Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser

35 40 45

Leu Ala Ser Tyr Asn Ile His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly

50 55 60

Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Ala Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Asn

65 70 75 80

Ser Ala Leu Met Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn

85 90 95

Gln Val Phe Leu Lys Met Ser Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val

100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Lys Arg Ser Asp Asp Tyr Ser Trp Phe Ala Tyr Trp

115 120 125

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly

130 135 140

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Glu Asn Gln Met Thr Gln Ser

145 150 155 160

Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Met Thr Cys

165 170 175

Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln

180 185 190

Lys Ser Gly Lys Ala Pro Lys Val Trp Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu

195 200 205

Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp

210 215 220

Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr

225 230 235 240

Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Gly Tyr Pro Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr

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

Lys Lys Asp Pro Lys Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu

500 505 510

Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val

515 520 525

Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr

530 535 540

Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro

545 550 555 560

Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser

565 570 575

Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu

580 585 590

Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg

595 600 605

Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln

610 615 620

Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr

625 630 635 640

Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp

645 650 655

Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala

660 665 670

Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg

675 680

<210> 34

<211> 1103

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-GD2 CAR co-expressed with iCasp9 suicide gene

<400> 34

Met Leu Glu Gly Val Gln Val Glu Thr Ile Ser Pro Gly Asp Gly Arg

1	5	10	15
---	---	----	----

Thr Phe Pro Lys Arg Gly Gln Thr Cys Val Val His Tyr Thr Gly Met

20	25	30
----	----	----

Leu Glu Asp Gly Lys Lys Val Asp Ser Ser Arg Asp Arg Asn Lys Pro

35	40	45
----	----	----

Phe Lys Phe Met Leu Gly Lys Gln Glu Val Ile Arg Gly Trp Glu Glu

50	55	60
----	----	----

Gly Val Ala Gln Met Ser Val Gly Gln Arg Ala Lys Leu Thr Ile Ser

65	70	75	80
----	----	----	----

Pro Asp Tyr Ala Tyr Gly Ala Thr Gly His Pro Gly Ile Ile Pro Pro

85	90	95
----	----	----

His Ala Thr Leu Val Phe Asp Val Glu Leu Leu Lys Leu Glu Ser Gly

100	105	110
-----	-----	-----

Gly Gly Ser Gly Val Asp Gly Phe Gly Asp Val Gly Ala Leu Glu Ser

115	120	125
-----	-----	-----

Leu Arg Gly Asn Ala Asp Leu Ala Tyr Ile Leu Ser Met Glu Pro Cys

130	135	140
-----	-----	-----

Gly His Cys Leu Ile Ile Asn Asn Val Asn Phe Cys Arg Glu Ser Gly

145	150	155	160
-----	-----	-----	-----

Leu Arg Thr Arg Thr Gly Ser Asn Ile Asp Cys Glu Lys Leu Arg Arg

165	170	175
-----	-----	-----

Arg Phe Ser Ser Leu His Phe Met Val Glu Val Lys Gly Asp Leu Thr

180	185	190
-----	-----	-----

Ala Lys Lys Met Val Leu Ala Leu Leu Glu Leu Ala Gln Gln Asp His

195	200	205
-----	-----	-----

Gly Ala Leu Asp Cys Cys Val Val Val Ile Leu Ser His Gly Cys Gln

210	215	220
-----	-----	-----

Ala Ser His Leu Gln Phe Pro Gly Ala Val Tyr Gly Thr Asp Gly Cys

225	230	235	240
-----	-----	-----	-----

Pro Val Ser Val Glu Lys Ile Val Asn Ile Phe Asn Gly Thr Ser Cys

245	250	255
-----	-----	-----

Pro Ser Leu Gly Gly Lys Pro Lys Leu Phe Phe Ile Gln Ala Cys Gly

260 265 270

Gly Glu Gln Lys Asp His Gly Phe Glu Val Ala Ser Thr Ser Pro Glu

275 280 285

Asp Glu Ser Pro Gly Ser Asn Pro Glu Pro Asp Ala Thr Pro Phe Gln

290 295 300

Glu Gly Leu Arg Thr Phe Asp Gln Leu Asp Ala Ile Ser Ser Leu Pro

305 310 315 320

Thr Pro Ser Asp Ile Phe Val Ser Tyr Ser Thr Phe Pro Gly Phe Val

325 330 335

Ser Trp Arg Asp Pro Lys Ser Gly Ser Trp Tyr Val Glu Thr Leu Asp

340 345 350

Asp Ile Phe Glu Gln Trp Ala His Ser Glu Asp Leu Gln Ser Leu Leu

355 360 365

Leu Arg Val Ala Asn Ala Val Ser Val Lys Gly Ile Tyr Lys Gln Met

370 375 380

Pro Gly Cys Phe Asn Phe Leu Arg Lys Lys Leu Phe Phe Lys Thr Ser

385 390 395 400

Ala Ser Arg Ala Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp Val

405 410 415

Glu Glu Asn Pro Gly Pro Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val

420 425 430

Leu Leu Leu Trp Val Pro Gly Ser Thr Gly Gln Val Gln Leu Gln Glu

435 440 445

Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln Thr Leu Ser Ile Thr Cys

450 455 460

Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ala Ser Tyr Asn Ile His Trp Val Arg

465 470 475 480

Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Ala Gly

485 490 495

Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Leu Met Ser Arg Leu Thr Ile Ser

500	505	510
Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val Phe Leu Lys Met Ser Ser Leu Thr		
515	520	525
Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Arg Ser Asp Asp Tyr		
530	535	540
Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser		
545	550	555
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu		
565	570	575
Asn Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp		
580	585	590
Arg Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Tyr		
595	600	605
Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Lys Ala Pro Lys Val Trp Ile		
610	615	620
Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly		
625	630	635
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro		
645	650	655
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Gly Tyr Pro Ile		
660	665	670
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Ser Asp Pro Ala		
675	680	685
Glu Pro Lys Ser Pro Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala		
690	695	700
Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys		
705	710	715
Asp Thr Leu Met Ile Ala Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val		
725	730	735
Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp		
740	745	750

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
 755 760 765
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 770 775 780

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
 785 790 795 800
 Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 805 810 815
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
 820 825 830
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 835 840 845

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 850 855 860
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 865 870 875 880
 Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 885 890 895
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 900 905 910

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Lys Asp Pro Lys Phe Trp Val Leu Val
 915 920 925
 Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala
 930 935 940
 Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser
 945 950 955 960
 Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His
 965 970 975

Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg
 980 985 990
 Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln

995	1000	1005
Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr		
1010	1015	1020
Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly		
1025	1030	1035
Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu		
1040	1045	1050
Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys		
1055	1060	1065
Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly		
1070	1075	1080
Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln		
1085	1090	1095
Ala Leu Pro Pro Arg		
1100		
<210> 35		
<211> 858		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		
<220><223> anti-GD2 CAR co-expressed with RQR8 suicide gene		
<400> 35		
Met Gly Thr Ser Leu Leu Cys Trp Met Ala Leu Cys Leu Leu Gly Ala		
1	5	10
Asp His Ala Asp Ala Cys Pro Tyr Ser Asn Pro Ser Leu Cys Ser Gly		
20	25	30
Gly Gly Gly Ser Glu Leu Pro Thr Gln Gly Thr Phe Ser Asn Val Ser		
35	40	45
Thr Asn Val Ser Pro Ala Lys Pro Thr Thr Ala Cys Pro Tyr Ser		
50	55	60
Asn Pro Ser Leu Cys Ser Gly Gly Ser Pro Ala Pro Arg Pro		
65	70	75
Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro		

85 90 95

Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu

100 105 110

Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys

115 120 125

Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Asn His Arg

130 135 140

Asn Arg Arg Arg Val Cys Lys Cys Pro Arg Pro Val Val Arg Ala Glu

145 150 155 160

Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly

165 170 175

Pro Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val

180 185 190

Pro Gly Ser Thr Gly Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu

195 200 205

Val Lys Pro Ser Gln Thr Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe

210 215 220

Ser Leu Ala Ser Tyr Asn Ile His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys

225 230 235 240

Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Ala Gly Gly Ser Thr Asn Tyr

245 250 255

Asn Ser Ala Leu Met Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys

260 265 270

Asn Gln Val Phe Leu Lys Met Ser Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala

275 280 285

Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Arg Ser Asp Asp Tyr Ser Trp Phe Ala Tyr

290 295 300

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser

305 310 315 320

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Asn Gln Met Thr Gln

325 330 335

Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Met Thr

340 345 350

Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Tyr Leu His Trp Tyr Gln

355 360 365

Gln Lys Ser Gly Lys Ala Pro Lys Val Trp Ile Tyr Ser Thr Ser Asn

370 375 380

Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr

385 390 395 400

Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr

405 410 415

Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Gly Tyr Pro Ile Thr Phe Gly Gln Gly

420 425 430

Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Ser Asp Pro Ala Glu Pro Lys Ser Pro

435 440 445

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly

450 455 460

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile

465 470 475 480

Ala Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu

485 490 495

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His

500 505 510

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg

515 520 525

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys

530 535 540

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu

545 550 555 560

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr

565 570 575

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu

580	585	590
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp		
595	600	605
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val		
610	615	620
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp		
625	630	635
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His		
645	650	655
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro		
660	665	670
Gly Lys Lys Asp Pro Lys Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val		
675	680	685
Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp		
690	695	700
Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met		
705	710	715
720		
Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala		
725	730	735
Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg		
740	745	750
Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn		
755	760	765
Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg		
770	775	780
Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro		
785	790	795
800		
Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala		
805	810	815
Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Gly Lys Gly His		
820	825	830

Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp
 835 840 845

Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 850 855

<210> 36

<211> 402

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Inducible Caspase 9 (iCasp9) sequence

<400> 36

Met Leu Glu Gly Val Gln Val Glu Thr Ile Ser Pro Gly Asp Gly Arg
 1 5 10 15

Thr Phe Pro Lys Arg Gly Gln Thr Cys Val Val His Tyr Thr Gly Met
 20 25 30

Leu Glu Asp Gly Lys Lys Val Asp Ser Ser Arg Asp Arg Asn Lys Pro
 35 40 45

Phe Lys Phe Met Leu Gly Lys Gln Glu Val Ile Arg Gly Trp Glu Glu
 50 55 60

Gly Val Ala Gln Met Ser Val Gly Gln Arg Ala Lys Leu Thr Ile Ser
 65 70 75 80

Pro Asp Tyr Ala Tyr Gly Ala Thr Gly His Pro Gly Ile Ile Pro Pro
 85 90 95

His Ala Thr Leu Val Phe Asp Val Glu Leu Leu Lys Leu Glu Ser Gly
 100 105 110

Gly Gly Ser Gly Val Asp Gly Phe Gly Asp Val Gly Ala Leu Glu Ser
 115 120 125

Leu Arg Gly Asn Ala Asp Leu Ala Tyr Ile Leu Ser Met Glu Pro Cys
 130 135 140

Gly His Cys Leu Ile Ile Asn Asn Val Asn Phe Cys Arg Glu Ser Gly
 145 150 155 160

Leu Arg Thr Arg Thr Gly Ser Asn Ile Asp Cys Glu Lys Leu Arg Arg
 165 170 175

Arg Phe Ser Ser Leu His Phe Met Val Glu Val Lys Gly Asp Leu Thr

180 185 190

Ala Lys Lys Met Val Leu Ala Leu Leu Glu Leu Ala Gln Gln Asp His

195 200 205

Gly Ala Leu Asp Cys Cys Val Val Val Ile Leu Ser His Gly Cys Gln

210 215 220

Ala Ser His Leu Gln Phe Pro Gly Ala Val Tyr Gly Thr Asp Gly Cys

225 230 235 240

Pro Val Ser Val Glu Lys Ile Val Asn Ile Phe Asn Gly Thr Ser Cys

245 250 255

Pro Ser Leu Gly Gly Lys Pro Lys Leu Phe Phe Ile Gln Ala Cys Gly

260 265 270

Gly Glu Gln Lys Asp His Gly Phe Glu Val Ala Ser Thr Ser Pro Glu

275 280 285

Asp Glu Ser Pro Gly Ser Asn Pro Glu Pro Asp Ala Thr Pro Phe Gln

290 295 300

Glu Gly Leu Arg Thr Phe Asp Gln Leu Asp Ala Ile Ser Ser Leu Pro

305 310 315 320

Thr Pro Ser Asp Ile Phe Val Ser Tyr Ser Thr Phe Pro Gly Phe Val

325 330 335

Ser Trp Arg Asp Pro Lys Ser Gly Ser Trp Tyr Val Glu Thr Leu Asp

340 345 350

Asp Ile Phe Glu Gln Trp Ala His Ser Glu Asp Leu Gln Ser Leu Leu

355 360 365

Leu Arg Val Ala Asn Ala Val Ser Val Lys Gly Ile Tyr Lys Gln Met

370 375 380

Pro Gly Cys Phe Asn Phe Leu Arg Lys Lys Leu Phe Phe Lys Thr Ser

385 390 395 400

Ala Ser

<211> 157

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Novel marker/suicide gene RQR8 sequence

<400> 37

Met	Gly	Thr	Ser	Leu	Leu	Cys	Trp	Met	Ala	Leu	Cys	Leu	Leu	Gly	Ala
1								10						15	
Asp His Ala Asp Ala Cys Pro Tyr Ser Asn Pro Ser Leu Cys Ser Gly															
	20								25					30	

Gly	Gly	Gly	Ser	Glu	Leu	Pro	Thr	Gln	Gly	Thr	Phe	Ser	Asn	Val	Ser
35			40											45	

Thr	Asn	Val	Ser	Pro	Ala	Lys	Pro	Thr	Thr	Thr	Ala	Cys	Pro	Tyr	Ser
50			55										60		
Asn Pro Ser Leu Cys Ser Gly Gly Gly Ser Pro Ala Pro Arg Pro															
65			70			75							80		
Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro															
	85			90			95								

Glu	Ala	Cys	Arg	Pro	Ala	Ala	Gly	Gly	Ala	Val	His	Thr	Arg	Gly	Leu
100			105							110					

Asp	Phe	Ala	Cys	Asp	Ile	Tyr	Ile	Trp	Ala	Pro	Leu	Ala	Gly	Thr	Cys
115			120			125									
Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Asn His Arg															
130			135			140									

Asn	Arg	Arg	Arg	Val	Cys	Lys	Cys	Pro	Arg	Pro	Val	Val			
145			150			155									