



(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
플레 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) 요약

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 - RASSVSSSYLH (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 글리코스핑고리피드이다. 상기 탄소화물 항원의 기능은 완전히 이해되지 않지만; 종양 세포의 세포외 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. 이들 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 잔존 질환에는 일부 효과가 있지만, 거대 질환(bulky disease)에 대해서는 효과가 없는 꽤 독성인 제제이다. Ch14.18는 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 이펙터 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] 이들 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. 몇가지 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 근절시킬 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 εR1-γ 또는 CD3ζ 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 스톱(stalk)이라는 점을 제외하면 (c)와 동일한 포맷; (e) 스페이서가 CD8 스톱스톡인 점을 제외하면 (c)와 동일; (f) 스페이서가 IgG1 힌지만인 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; "28OXZ"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 형문근육종 세포주), 및 LAN-1 세포(GD2 양성인 신경모세포종 세포주)로 챌린지된다. 증식 및 사이토카인 방출은 수용체 활성이 28tmZ < 28Z < 28OXZ임을 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 리투시맵(Rituximab) 및 보체의 존재 하에 고갈될 수 있다. (d) 리투시맵으로 고갈된 T 세포는 GD2 발현 표적을 더 이상 인식하지 않는다.

도 10 - (a) GM3 생성효소 및 GD2 생성효소를 발현하는 2시스트론성 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-CD28OXZ - 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. iCasp9 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 벡터 코딩이었다. 작제물들간의 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) 24시간제에, 인터페론-감마를 상청액으로부터 측정하였다. huK666 CAR T 세포는 더 많은 IF- 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 - RASSSVSSSYLH (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 나타난 서열을 갖는 VH 도메인; 또는 서열 번호 11 또는 서열 번호 12로서 나타난 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 나타난 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 나타난 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 힌지; IgG1 힌지-CD8 스톱; 또는 CD8 스톱
- [0031] 중 하나를 포함할 수 있다.
- [0032] 스페이서는 IgG1 힌지-CD8 스톱 또는 CD8 스톱을 포함할 수 있다.
- [0033] 스페이서는 IgG1 Fc 도메인 또는 이의 변이체를 포함할 수 있다.
- [0034] 스페이서는 서열 번호 23 또는 서열 번호 24로서 나타난 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 나타난 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 나타난 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 이중 핵산 및 GD2 생성효소를 코딩하는 이중 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.

[0062] 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 이펙터 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 임상 세포 전달을 위해 생성될 수 있다. 상기 접근법의 1상 임상시험은 효능을 보인다.

[0065] CAR의 표적-항원 결합 도메인은 흔히 스페이서 및 막관통 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 (젓과(Murine) KM666 서열)
- [0079] QVQLKESGPNLVAPSQTLSITCTVSGFSLASYNIHWRQPPGKLEWLGVIWAGGSTNYSALMSRLSISKDNSKSQVFLQMNSLQTDDTAMYYCAKRSDDY
SWFAYWGQGLTVTVSASGGGGSGGGSGGGGSENVLTQSPAIMASAPGKVTMTCRASSSVSSSYLHWYQQKSGASPKVWIYSTSNLASGVPGRFSGSGSGT
SYSLTISSVEAEDAATYYCQQYSGYPITFGAGTKVEVKR
- [0080] 서열 번호 8 (인간화 KM666 서열)
- [0081] QVQLQESGPNLVKPSQTLSITCTVSGFSLASYNIHWRQPPGKLEWLGVIWAGGSTNYSALMSRLTISKDNSKNQVFLKMSSLTAADTAVYYCAKRSDDY
SWFAYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGGSENVLTQSPSSLSASVGDRTMTCRASSSVSSSYLHWYQQKSGKAPKVVWIYSTSNLASGVPSPRFSGSGSGTD
YTLTISSLQPEDFATYYCQQYSGYPITFGAGTKVEIKR
- [0082] 본 발명의 CAR은 하기 VH 서열 중 하나를 포함할 수 있다:
- [0083] 서열 번호 9 (젓과 KM666 VH 서열)
- [0084] QVQLKESGPNLVAPSQTLSITCTVSGFSLASYNIHWRQPPGKLEWLGVIWAGGSTNYSALMSRLSISKDNSKSQVFLQMNSLQTDDTAMYYCAKRSDDY
SWFAYWGQGLTVTVSA
- [0085] 서열 번호 10 (인간화 KM666 VH 서열)
- [0086] QVQLQESGPNLVKPSQTLSITCTVSGFSLASYNIHWRQPPGKLEWLGVIWAGGSTNYSALMSRLTISKDNSKNQVFLKMSSLTAADTAVYYCAKRSDDY
SWFAYWGQGLTVTVSS
- [0087] 본 발명의 CAR은 하기 VL 서열 중 하나를 포함할 수 있다:
- [0088] 서열 번호 11 (젓과 KM666 VL 서열)
- [0089] ENVLTQSPAIMASAPGKVTMTCRASSSVSSSYLHWYQQKSGASPKVWIYSTSNLASGVPGRFSGSGSGTSYSLTISSVEAEDAATYYCQQYSGYPITFGAG
TKVEVK
- [0090] 서열 번호 12 (인간화 KM666 VH 서열)
- [0091] ENQMTQSPSSLSASVGDRTMTCRASSSVSSSYLHWYQQKSGKAPKVVWIYSTSNLASGVPSPRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQYSGYPITFGAG
TKVEIK
- [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 12로 서 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] FWVLVVVGGLACYSLLVTVAFIIFWV
- [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 적절한 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 모두가 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 18로 서 나타낸 서열 또는 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 이의 변이체를 포함할 수 있다.
- [0103] 서열 번호 14 (CD28 엔도도메인)
- [0104] RSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAY
- [0105] 서열 번호 15 (CD40 엔도도메인)
- [0106] RSRDQRLPPDAHKKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKI
- [0107] 서열 번호 16 (CD3 제타 엔도도메인)
- [0108] RSRVKFSRSADAPAYQQGNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
- [0109] 서열 번호 17 (CD28Z)
- [0110] RSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
- [0111] 서열 번호 18 (CD28OXZ)
- [0112] RSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRDQRLPPDAHKKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKIRVKFSRSADAPAYQQGNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
- [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 펩티드
- [0115] 본 발명의 CAR은 신호 펩티드를 포함할 수 있어서, CAR이 세포, 예컨대 T 세포 내에서 발현되는 경우, 초기 단백질은 소포체로 유도되고 이어서 이것이 발현되는 세포 표면으로 유도된다.
- [0116] 신호 펩티드의 코어는 단일 알파 나선을 형성하는 성향을 가진 소수성 아미노산의 긴 스트레치를 함유할 수 있다. 신호 펩티드는 아미노산의 양으로 하전된 짧은 스트레치로 시작할 수 있으며, 이는 전좌(translocation) 동안 폴리펩티드의 적절한 토폴로지를 시행하는 것을 돕는다. 신호 펩티드의 단부에는 전형적으로 신호 펩티다제에 의해 인식되어 절단되는 아미노산의 스트레치가 존재한다. 신호 펩티다제는 전좌 동안 또는 이의 완료 후에 절단되어 유리 신호 펩티드 및 성숙 단백질을 생성할 수 있다. 유리 신호 펩티드는 이후에 특이적인 프로테아제에 의해 분해된다.
- [0117] 신호 펩티드는 분자의 아미노 말단에 존재할 수 있다.
- [0118] 본 발명의 CAR은 하기 일반식을 가질 수 있다:
- [0119] 신호 펩티드 - GD2 결합 도메인 - 스페이서 도메인 - 막관통 도메인 - 세포내 T 세포 신호전달 도메인.
- [0120] 신호 펩티드는, 신호 펩티드가 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: METDTLLLVWLLLVWPGSTG
- [0122] 서열 번호 19의 신호 펩티드는 소형이고 매우 효율적이다. 이는 말단 글리신 이후에 약 95% 절단을 제공하여, 신호 펩티다제에 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 힌지 또는 CD8 스톱, 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다. 스페이서는 대안으로 IgG1 Fc 영역, IgG1 힌지 또는 CD8 스톱과 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 힌지-CH2CH3)
- [0129] AEPKSPDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIARTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFNCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKKD
- [0130] 서열 번호 21 (인간 CD8 스톱):
- [0131] TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDI
- [0132] 서열 번호 22 (인간 IgG1 힌지):
- [0133] AEPKSPDKTHTCPPCPKDPK
- [0134] 서열 번호 23 (IgG1 힌지-Fc)
- [0135] AEPKSPDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIARTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFNCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKKDPK
- [0136] 서열 번호 24 (IgG1 힌지 - Fc 수용체 인식 모티프를 제거하도록 수식된 Fc)
- [0137] AEPKSPDKTHTCPPCPAPPVA*GPSVFLFPPKPKDTLMIARTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFNCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKKDPK
- [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 향상시키도록 코돈 최적화된 프레임 및 SAR 영역을 갖는 RQR8 자살 유전자와 공발현된다

```

1  tgaagagacc cactgtagg ttggcaagc tagcttaagt aacgccatth tgcaaggcat ggaaaaatac
   >>.....LTR.....>
71  ataactgaga atagaaaagt tcagatcaag gtcaggaaca gatggaacag ctgaatatgg gccaaacagg
   >.....LTR.....>
141 atatctgtgg taagcagttc ctgcccggc tcagggccaa gaacagatgg aacagctgaa tatgggccaa
   >.....LTR.....>
211 acaggatata tgtggttaagc agttcctgac ccggctcagg gccaaagaca gatgggtccc agatcggtc
   >.....LTR.....>
281 cagccctcag cagtttctag agaaccatca gatgtttcca ggggtcccca aggaacctgaa atgacctgt
   >.....LTR.....>
351 gccttatttg aactaaoaa tcagttcgtc totcgttct gttcgcgcgc ttatgctccc cgaactcaat
   >.....LTR.....>
421 aaaagagccc acaaccctc actcggggcg ccagtcctcc gattgactga gtgcgccggg taccctgta
   >.....LTR.....>
491 tccaataaac cctcttgcag ttgcatcoga cttgtggtct cgtgttctc tgggagggtc tcctctgagt
   >.....LTR.....>
561 gattgactac ccgtcagcgg gggcttttca ttggggggc cgtccgggat cgggagagacc ctgccaggg
   >.....LTR.....>>
631 accacgacc caccacggg aggttagctg gccagcaact tatctgtgta tgcctgattg tctagtgtc
701 atgactgatt ttatgcgctc gcgtcgttac tagttagcta actagctctg tatctggcgg acccgtggtg
      Eco52I
      -----
771 gaactgacga gttcggaaca ccgggcgcga accctgggag acgtcccagg gaattcgggg gccgtttttg
      PshAI
      -----
841 tggcccgacc tgagtoctaa aatcccgata gtttaggact ctttggtgca ccccccctag aggagggata

```

[0147]

```

911  tgtggttctg gtaggagaag agaactctaa acagtcccg cctcgtctg aatttttget ttggttttg
981  gaccgaagcc ggcgcgcgcg tcttgtctgc tgcagcatcg ttctgtgttg tctctgtctg actgtgttct

          SrfI
          -----
1051  tgtatttctg tgaataatg ggcccggtt acgtgttac cactccctta agtttgacct taggtcactg
1121  gaaagatgto gagcgatcg ctcacaacca gtoggttagat gtaagaaga gacgttgggt taacttctgc
1191  tctgcagaat ggccaacctt taactgcga tggccgcgag acgacacctt taacagagac ctcacacccc
1261  aggttaagat caaggtcttt tcacctggcc cgcctggaca cccagaccag gtgggtgtaca tctgacctg
1331  ggaagccttg gcttttgacc cccctccctg ggtcaagccc ttgttacacc ctaagcctcc gctcctctt
1401  cctccatccg ccccgctctt ccccttgaa cctcctcgtt cgaaccgcgc tcatcctcc ctttatccag

          BglII
          -----
1471  ccctcactcc ttcttaggc gccccatat ggccatatga gatcttatat ggggcacccc cgcctctgt
1541  aaacttcctc gacctgaca tgacaagagt taactaacgc cctctctcc aagtcactt acagctctc

          AgeI
          -----
1611  tacttagtcc agcacgaagt ctggagacct ctggcggcag cctaccaaga acaactggac cgaacggtg
1681  tacctcacc ctaacagagc ggcacacag tgtgggtccg cgcacaccag actaagaacc tagaacctg

          AclI
          -----
1751  ctggaagga ccttacacg tctgtctgac cccccccac gccctcaaag tagagggcat cgcagcttg

          PmlI
          -----
1821  atacgcgcg ccaactgaa ggtgcgcgac ccggggggtg gacctctc tagactgcca acatgggac
>.....orf.....>
>.....RQR8.....>

1891  cagcctctg tctggtatg cctgtgctt gctgggcgc gaccacgcg atgcctgcc ctacagcaac
>.....orf.....>
>.....RQR8.....>

1961  cccagcctg gcagcgagg cggcggcgc gagctgcca cccagggcac cttctccaac gtgtccacca
>.....orf.....>
>.....RQR8.....>

2031  acgtgagccc agccaagccc accaccacc cctgtcctta ttcaatcct tccctgtgta ggcgagggg
>.....orf.....>
>.....RQR8.....>

2101  aggcagccca gcccccagac ctcacacccc agccccccc atgcagccc agcctctgag cctgagccc
>.....orf.....>
>.....RQR8.....>

          SgrAI
          -----
2171  gaggcctgcc gccacgcgc cggcggcgc gtgcacacca gaggcctgga ttctcctgc gatctctaca
>.....orf.....>
>.....RQR8.....>

          BclI
          -----
2241  tctgggccc actggcggc acctgtggc tctgtctgt gagcctggt atcacctgt actgcaacca
>.....orf.....>
>.....RQR8.....>

2311  ccgcaaccg aggcgctgt gcaagtccc caggccctg gtgagagcc agggcagagg cagcctctg

```

[0148]

```

>.....orf.....>
>.....RQR8.....>>.....FMD-2A.....>

                NcoI
                -----
2381  acctgcggcg acgtggagga gaaccaggc cccatggaga ccgacaccct gctgctgtgg gtgctgtgc
>.....orf.....>
>.....FMD-2A.....>>.....CAR.....>

2451  tgtgggtgcc aggcagcacc ggccaggtgc agctgcagga gtctggccca ggccctgtga agcccagcca
>.....orf.....>
>.....CAR.....>

2521  gaccctgagc atcacctgca ccgtgagcgg ctccagcctg gccagctaca acatccactg ggtgcggcag
>.....orf.....>
>.....CAR.....>

2591  ccccaggcca agggcctgga gtggctgggc gtgatctggg ctggcggcag caocaaactac aacagcgccc
>.....orf.....>
>.....CAR.....>

2661  tgatgagcgg gctgaccatc agcaaggaca acagcaagaa ccaggtgttc ctgaagatga gcagcctgac
>.....orf.....>
>.....CAR.....>

2731  agccgcggac accgcctgtg actactgcgc caagcggagc gacgactaca gctggttgcg ctactggggc
>.....orf.....>
>.....CAR.....>

2801  cagggcaccg ttggtgacct gagctctggc ggaggcggct ctggcggagg cggctctggc ggagcggcca
>.....orf.....>
>.....CAR.....>

2871  gcgagaacca gatgaccagc agcccagca gcttgagcgc cagcgtgggc gaocgggtga ccatgacctg
>.....orf.....>
>.....CAR.....>

2941  cagagccagc agcagcgtga gcagcagcta cctgcactgg taccagcaga agagcggcaa ggcccacaa
>.....orf.....>
>.....CAR.....>

3011  gtgtggatct acagcaccag caacctggcc agcggcgtgc ccagccggtt cagcggcagc ggcagcggca
>.....orf.....>
>.....CAR.....>

3081  ccgactacac cctgaccatc agcagcctgc agcccgagga ctccgccacc tactactgcc agcagtacag
>.....orf.....>
>.....CAR.....>

                BamHI
                -----
3151  cggctacccc atcaccttgg gccagggcac caaggtggag atcaagcggc cggatccgcg cgagcccaaa
>.....orf.....>
>.....CAR.....>

                FseI
                -----
3221  tctcctgaca aaactcacac atgccaccgg tgcccagcac ctcccgctgg cggcccgtea gtattctct
>.....orf.....>
>.....CAR.....>

3291  tcccccaaaa acccaaggac accctcatga tcgccgggac cctgaggttc acatcggtgg ttgtggacgt
>.....orf.....>
>.....CAR.....>

3361  gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtactgt gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca
>.....orf.....>
>.....CAR.....>

                SacII
                -----
3431  aagccggggg aggagcagta caacagcacg tacctgtgtg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact
>.....orf.....>
>.....CAR.....>

```

[0149]

```

3501 ggctgaatgg caaggagtac aagtgaagg tctccaacaa agccctccca gcccccatcg agaaaacat
>.....orf.....>
>.....CAR.....>

3571 ctccaaagcc aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgccc catccggga tgagctgacc
>.....orf.....>
>.....CAR.....>

3641 aagaaccagg tcagcctgac ctgocctgtc aaaggcttct atccagcga catgcogtg gagtgggaga
>.....orf.....>
>.....CAR.....>

3711 gcaatgggca accggagaac aactacaaga ccaagcctcc cgtgctggac tccgaaggct cttcttctct
>.....orf.....>
>.....CAR.....>

Ppu10I
-----
NsiI
-----
BfrBI
-----

3781 ctacagcaag ctacccgtgg acaagagcag gtggcagcag gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat
>.....orf.....>
>.....CAR.....>

Van91I
-----

3851 gagccctgc acaataacta taccagaaa tctotgagtc tgagccagg caagaaggac cccaagttct
>.....orf.....>
>.....CAR.....>

3921 gggtoctggt ggtggggga ggcgtgtgg cctgttactc tctcctggtg accgtggcct tcatcatctt
>.....orf.....>
>.....CAR.....>

3991 ctgggtgctc tccaagagga gcaggctctc gcacagtgac tacatgaaca tgactcccg ccgccccggg
>.....orf.....>
>.....CAR.....>

4061 cccaccgca agcattacca gccctatgcc ccaccacgcg acttcgcagc ctatcgtcc cggtgaagt
>.....orf.....>
>.....CAR.....>

4131 tctctogctc tgccgatgcc ccagcctatc agcagggcca gaatcagctg tacaatgaac tgaacctggg
>.....orf.....>
>.....CAR.....>

4201 caggcgggag gagtaogacg tgctggataa gcggagaggg agagaccccg agatggggcg caaacacgg
>.....orf.....>
>.....CAR.....>

4271 cgaataaato cccaggaggg actctataac gagctgcaga aggacaaaat ggcagaggcc tattcogaga
>.....orf.....>
>.....CAR.....>

4341 toggcatgaa gggagagaga agacogggaa agggccaaga cggcctgtat cagggtattgt ccaccgtac
>.....orf.....>
>.....CAR.....>

MluI ClaI
-----

4411 aaaagataca tatgatgccc tgcacatgca ggcocctgcc ccagatgac gogtatcgat actgtttctc
>.....orf.....>
>.....CAR.....>>

>>..SAR..>

4481 tcacatcata tcaagttat ataccatcaa tattgccaca gatgttactt agccttttaa tattttctc
>.....SAR.....>

4551 atttagtgta tatgcaatga tagttctctg attctctaga ttgagttct catgtgtaat gattatttag
>.....SAR.....>

4621 agttttctct tcatctgttc aaattttgt ctagttttat tttttactga tttgtaagac ttctttttat
>.....SAR.....>

```

[0150]


```

4691 aatctgcata ttacaattct ctttactggg gtgttgcaaa tttttctgt cattctatgg cctgactttt
>.....SAR.....>
4761 cttaaatggt ttttaatttt aaaaataagt cttaatatto atgcaatcta attaacaato ttttctttgt
>.....SAR.....>

                                SphI
                                -----
4831 ggtagtgact ttgagtcata agaaattttt ctctacactg aagtcacgat ggcacgtctt tatattattt
>.....SAR.....>
4901 tctaaaagat ttaagatttt gccttctcca ttttagactta taattcactg gaattttttt gtgtgtatgg
>.....SAR.....>
4971 tatgacatat ggggtccott ttatttttta catataaata tatttccctg tttttctaaa aaagaaaaag
>.....SAR.....>
5041 atcatcattt toccattgta aaatgccata ttttttcat aggtcaccta catatatcaa tgggtctgtt
>.....SAR.....>
5111 totgagctct aactctattt atcagcctca ctgtctatcc ccacacatct catgctttgc tctaaatott
>.....SAR.....>
5181 gatatttagt ggaacattct ttccattttt gttctacaag aatatttttg ttattgtctt tgggctttct
>.....SAR.....>
5251 atatacattt tgaatgaggg ttgacaagtt cggattagtc caattgttta aagacaggat atcagtggtc
>.....SAR.....>>
5321 caggctctag ttttgactca acaatatcac cagctgaagc ctatagagta cgagccatag ataaaaataa
5391 agattttatt tagctctocag aaaaaggggg gaatgaaaga cccacactgt aggtttggca agctagctta
>>.....LTR.....>
5461 agtaacgcca ttttgcaagg catggaaaaa tacataactg agaatagaga agttcagatc aaggtcagga
>.....LTR.....>
5531 acagatggaa cagctgaata tgggccaacac aggatattctg tggtaagcag ttctgcccc ggctcagggc
>.....LTR.....>
5601 caagaacaga tggaaacagct gaatatgggc caaacaggat atctgttgta agcagttcct gccccggctc
>.....LTR.....>
5671 agggccaaga acagatggto cccagatgog gtccagccct cagcagtttc tagagaacca tcagatgttt
>.....LTR.....>
5741 ccagggtgcc ccaaggaccc gaaatgaccc tgtgccttat ttgaactaac caatcagtto gottctcgtc
>.....LTR.....>

5811 totgttcgog cgctctctgt ccccgagcto aataaaagag cccacaaccc ctcaactggg ggcacagtc
>.....LTR.....>
5881 tcagattgac tgagtcgccc gggtaaccgt gtatccaata aacctcttg cagttgcato cgacttgttg
>.....LTR.....>
5951 tctcgtctgt ccttgggagg gtctctctgt agtgattgac taacctcag cgggggtctt 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 접합하며(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(haploidentical) 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]

MLEGVQVETISPGDGRTPFKRGQTCVVHYTGMLDGGKKVDSSRDNRNPKFKFMLGKQEVIRGWEEGVAQMSVGQRAKLTI SPDYAYGATGHPGIIPPHATLVF
DVELLKLESGGGSGVDGFGDVGALSLRGNADLAYILSMEPCGHCLINNVNFCRESGLRTRTGSNIDCEKLRRRFSSLHFMVEVKGDLTAKKMLALLELA
QQDHGALDCCVVVILSHGCQASHLQFPGAVYGTDCGPVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGKPKLFFIQACGGEQKDHGFEVASTSPEDESPGSNPEPDATPFQEG

LRTFDQLDAISSLPTSDIFVSYSTFPGFVSWRDPKSGSWYVETLDDIFEQWAHSEDLQSLLLRVANAVSVKGIYKQMPGCFNFLRKKLFFKTSAS

- [0158] 최근 본 발명의 발명자들은, 항체 QBEnd10로 검출되고 치료 항체 리톡시맙으로 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] MGTSLLCWMLCLLGADHADACYPNSPLCSGGGGSELPTQGTFSNVSTNVSPAKPTTTACYPNSPLCSGGGGSPAPRPPTAPTASQPLSLRPEACRPA
AGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNRRRVCKCPRPVV
- [0162] 자살 유전자는, 예를 들어 두 서열 사이에 자기 절단 펩티드를 이용함으로써, CAR을 갖는 단일 폴리펩티드로서 발현될 수 있다.
- [0163] 벡터
- [0164] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 핵산 서열을 포함하는 벡터를 제공한다. 이러한 벡터는 핵산 서열을 숙주 세포 내에 도입하여 상기 세포가 본 발명의 제1 양태에 따른 분자를 발현하고 생성하도록 사용될 수 있다.
- [0165] 벡터는 예를 들면, 플라스미드 또는 바이러스 벡터, 예컨대 레트로바이러스 벡터 또는 렌티바이러스 벡터일 수 있다.
- [0166] 벡터는 T 세포를 형질감염 또는 형질도입시키는 것이 가능할 수 있다.
- [0167] 벡터는 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 벡터 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 이식체의 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. 이들 경우에, CAR T 세포는 바이러스 벡터를 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 피험체에게 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 이중 핵산 및 GD2 생성효소를 코딩하는 이중 핵산을 포함하는 GD2 발현 세포에 관한 것이다.
- [0185] 핵산은 이것이 일반적으로 세포 내에 존재하지 않는다는 점에서 "이중"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 역할하고자 하며 본 발명의 범위를 어떠한 형태로든 제한하고자 하는 의도가 아니다.
- [0189] **[실시예]**
- [0190] **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 이들 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).
- [0192] **실시예 2 - 발현 및 기능에 대한 상이한 스페이스 포맷 효과의 효과 시험**
- [0193] Fc 스페이스, 힌지, 힌지-CD8 스톱 및 Cd8 스톱을 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 펩티드와 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-스톱 = 스톱 > 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-스톱 = 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-스톱 및 스톱과의 CAR과 유사하였으나, 힌지 변이체에서는 더 적었다. IL2 방출은 하기 순서로 검출되었다: Fc, 스톱, 힌지-스톱, 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-스톱, Fc, 힌지(도 4 (d) 및 (e)).
- [0198] **실시예 3 - FcR 돌연변이가 비특이적 활성을 저해한다**
- [0199] 상기 실시예들로부터의 전체 데이터는 Fc 스페이스가 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)).

[0201] 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 답 베타 헤모글로빈 염색질 절연체(CHS4)의 포함 및 (c) 개방형 해독들의 코돈 최적화(도 6 (a)). SAR의 포함은 코돈 최적화가 그러하듯이 발현의 특성을 개선하였으며, 반면 CHS4는 적은 효과를 가진다는 것이 나타났다(도 6 (b)). SAR 및 코돈 최적화의 조합은 추가적으로 발현을 개선하였다(도 6 (c)).

[0203] 실시예 5 - 상이한 엔도도메인의 비교

[0204] 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(CD28OXZ). 증식, IFN γ 방출 및 IL-2 방출은 CD28tmZ < CD28Z < CD28OXZ의 순서로 증가하는 것으로 주목되었다(도 7).

[0205] 실시예 6 - iCasp9 자살 유전자와의 공발현

[0206] iCasp9 자살 유전자는 항-GD2 CAR과 공발현된다(도 8 (a) - CAR은 Fc-스페이서의 포맷이며, CD28OXZ는 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)).

[0207] 실시예 7 - RQR8 자살 유전자와의 공발현

[0208] 항-GD2 CAR은 RQR8 부류-자살 유전자와 공발현된다(도 9 (a) - CAR은 Fc-스페이서의 포맷이며, CD28Z는 기능을 입증하기 위해 임의로 선택됨). 수용체 및 CAR을 공발현하는 것이 가능하였다(도 9 (b)). 리톡시맙 및 보체로의 RQR8의 자살 유전자 기능의 활성화는 형질도입 T 세포의 결실 및 GD2 인식의 상실을 야기하였다(도 9 (c) 및 (d)).

[0209] 실시예 8 - GD2 생성효소 및 GM3 생성효소의 발현은 임의 세포주에서의 GD2 발현을 야기한다

[0210] 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).

[0211] 실시예 9 - 항-GD2 CAR의 생체내 기능

[0212] 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 켈린지 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 성장 커브를 나타낸다. 항-GD2 CAR T 세포를 제공받은 마우스의 GD2 양성 종양만이 생장이 없거나 조금 있다.

[0213] 실시예 10 - huK666 및 14g2a 기초 항원 결합 도메인을 포함하는 CAR의 기능의 비교

[0214] 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 레트로넡틴(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.

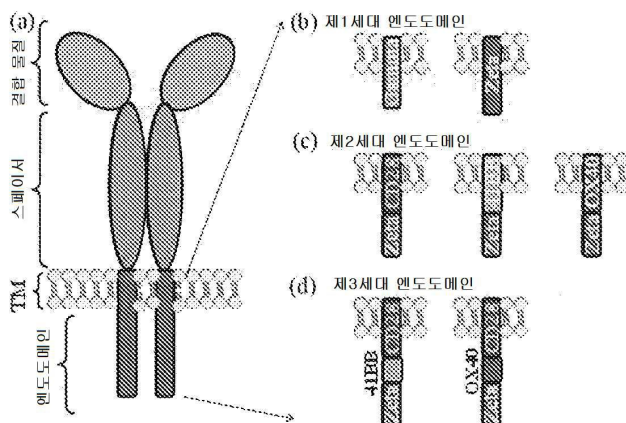
[0218] 결과를 도 14 및 도 15에 나타내었다. 24시간제에, 인터페론-감마를 상청액으로부터 측정하였다. huK666 CAR T 세포는 더 많은 IFN- γ 를 생성하는 것으로 나타났다(도 14 (b)). 1주 후 T 세포를 계수하였고, huK666 CAR는 더 많이 증식하는 것으로 나타났다(도 14 (c)).

[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).

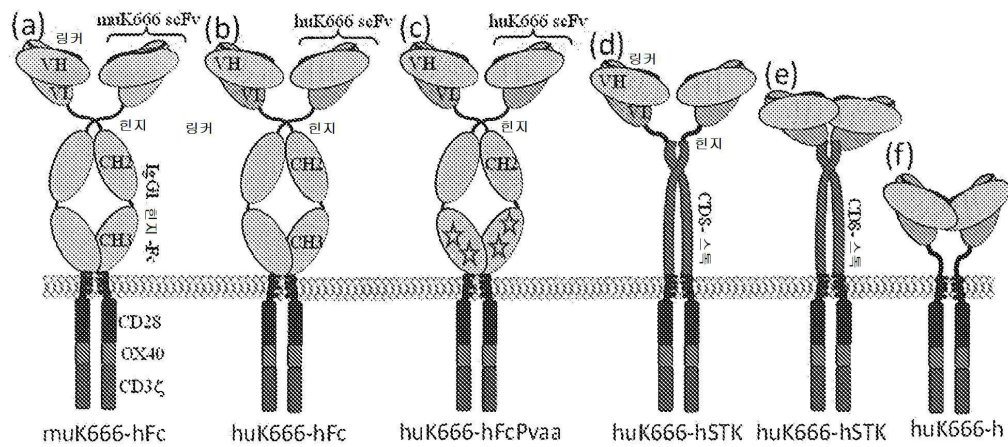
[0220] 상기 명세서에서 언급된 모든 공개문헌은 본원에서 참고 인용된다. 기재된 본 발명의 방법 및 시스템의 다양한 변형 및 수정은 본 발명의 범위 및 취지에서 벗어남이 없이 당업자에게 자명할 것이다. 비록 본 발명이 구체적인 바람직한 실시양태들과 함께 기재되어 있으나, 청구된 발명은 이러한 구체적인 실시양태들로 부당하게 제한되지 않는 것으로 이해되어야 한다. 실제로, 분자 생물학, 세포 면역학 또는 관련 분야에서의 숙련인에게 자명한, 본 발명을 실시하기 위해 기재된 방식에 대한 다양한 변형은 하기 청구범위의 범위 내인 것으로 의도된다.

도면

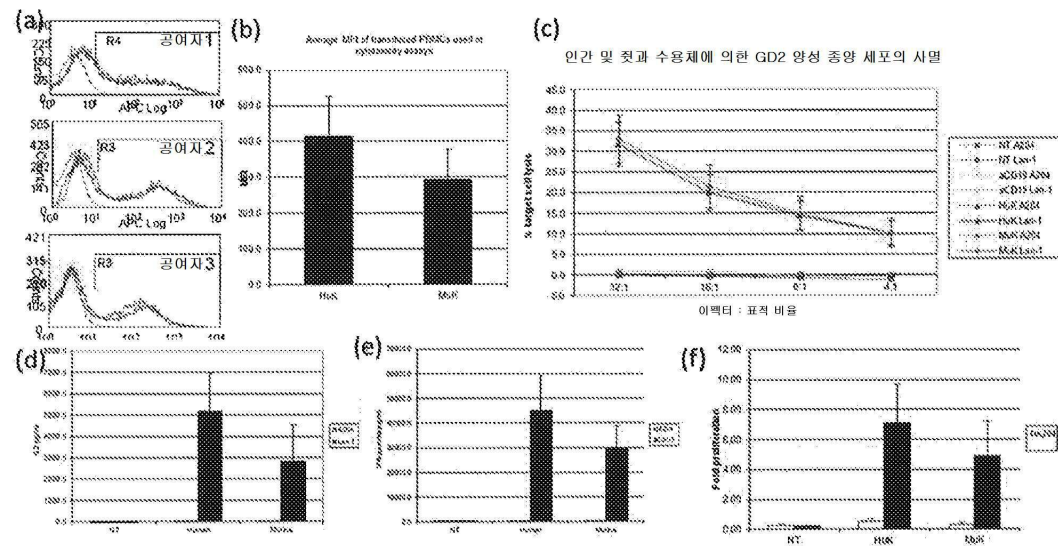
도면1



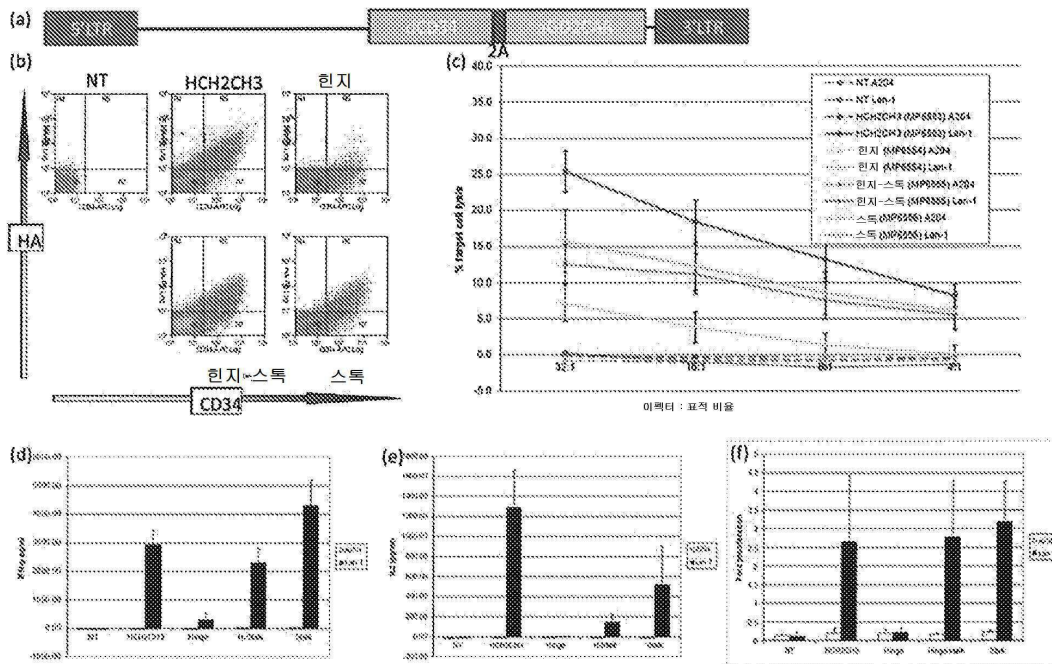
도면2



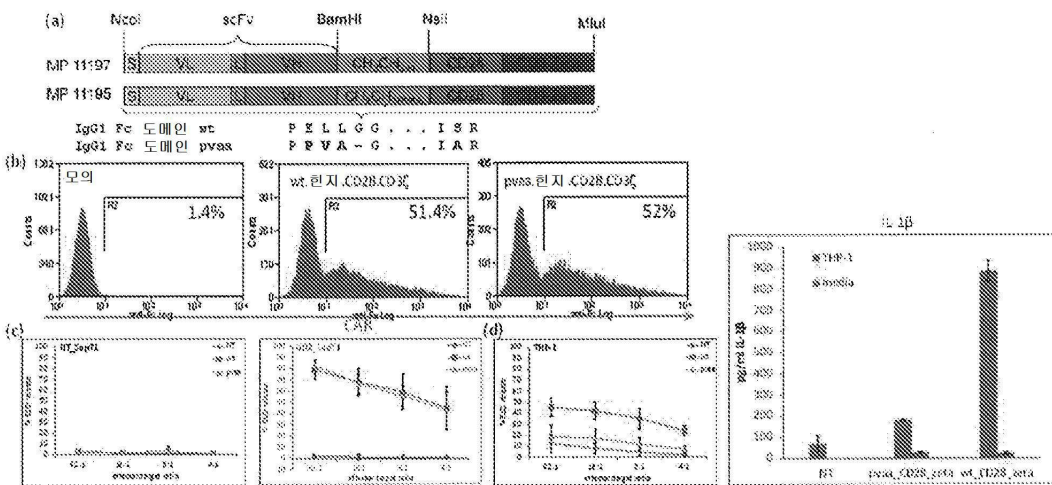
도면3



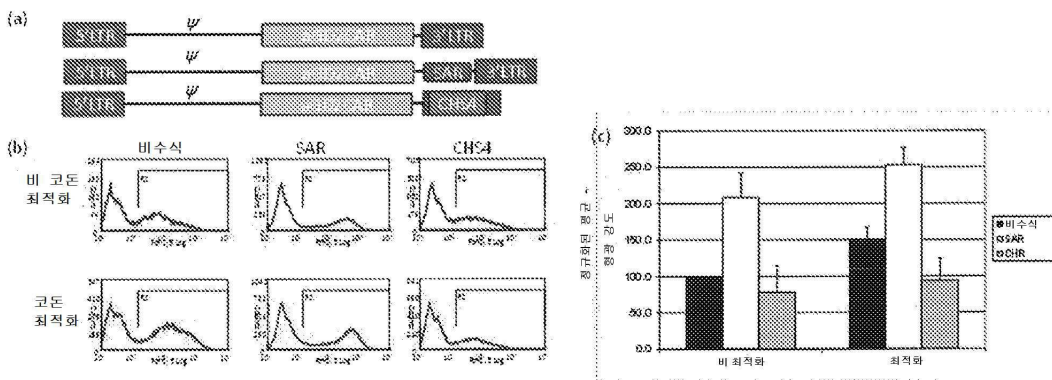
도면4



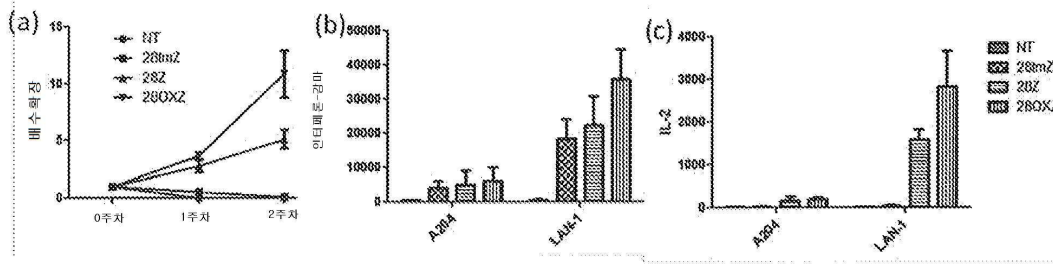
도면5



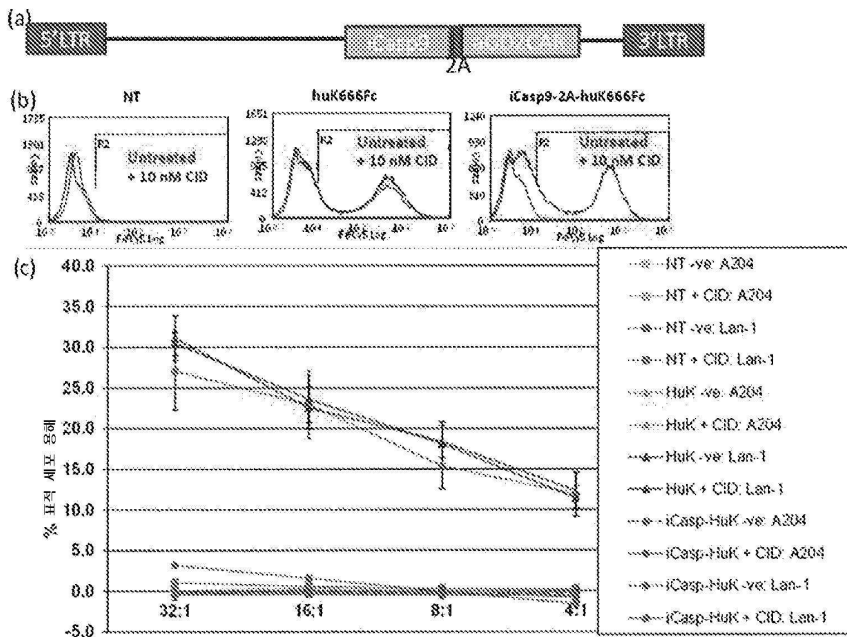
도면6



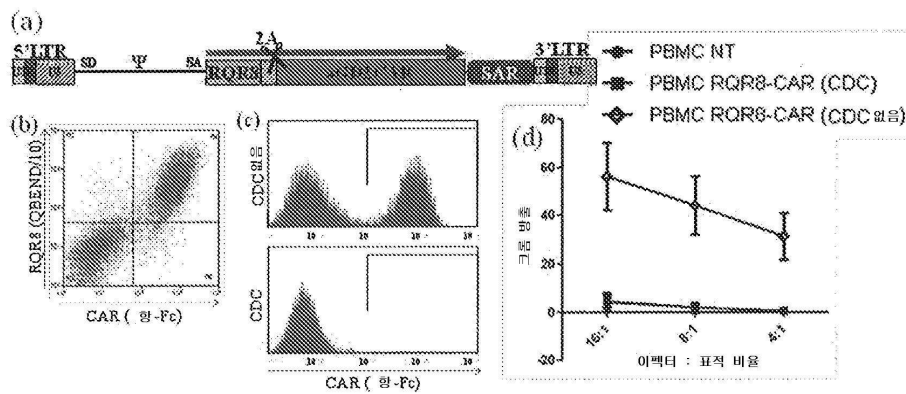
도면7



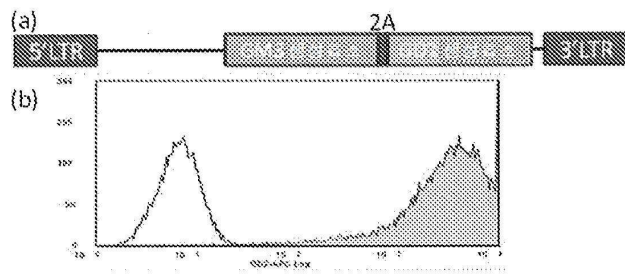
도면8



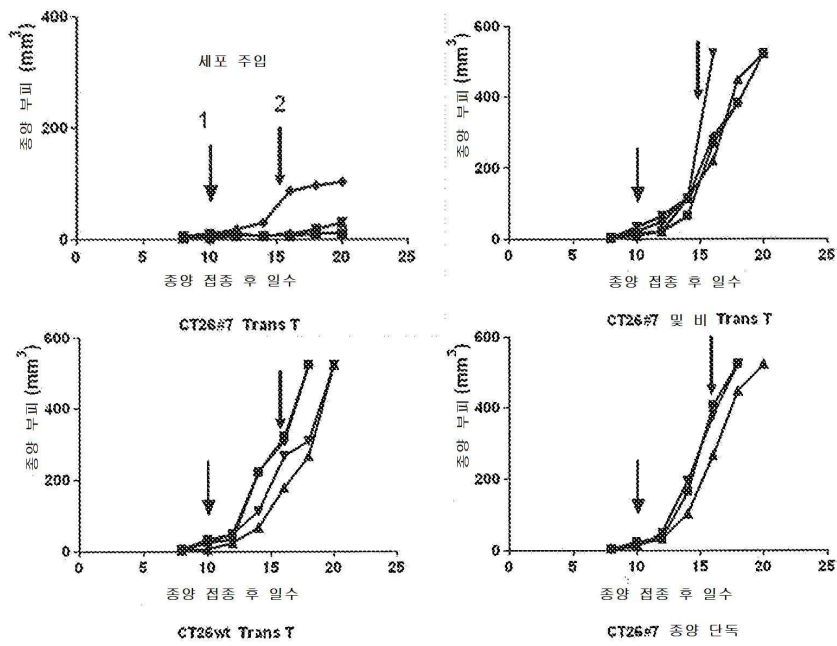
도면9



도면10



도면11



도면12a

A.

MEITDTLLLVLLLVVPGSTGGVQLQESGPGVLVPSQTLSTICTVSGFSLASYNIHVVRQPPGKGLEWLGVIWAGGS
 TNYSALMSRLTISKDNKSNQVFLKMSLTAAATVAVYCAKRSDDYSWFAYWQGTLLTVTSAGGGGGGGGGGGGGGG
 GSENVLTQSPAIMSASPGKVTMTCRASSSVSSSYLHWYQOKSGKAFKVIYSTNLASGVPSRFSGSGSGTDYTLT
 TISSVEAEADAATYYCOQYSGYPITFGAGTKVEVKRSDF

FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV
 KPELLHSDYMMMTERRPGTTRKHQPYAPPRDFAAYPSRDORLPEDARKPPGGGSPRTPIQEEQADAHSTLAKI
 FTERSDAFATYCOQYSGYDYNINSGPEAYDVEHSGRPSSTGKAPKVIYSTNLASGVPSRFSGSGSGTDYTLT
 TISSVEAEADAATYYCOQYSGYPITFGAGTKVEVKRSDF

B.

MEITDTLLLVLLLVVPGSTGGVQLQESGPGVLVPSQTLSTICTVSGFSLASYNIHVVRQPPGKGLEWLGVIWAGGS
 TNYSALMSRLTISKDNKSNQVFLKMSLTAAATVAVYCAKRSDDYSWFAYWQGTLLTVTSAGGGGGGGGGGGGGGG
 SENQMTQSPSSLSASVGDRTVMTCRASSSVSSSYLHWYQOKSGKAFKVIYSTNLASGVPSRFSGSGSGTDYTLT
 ISSLQPEDFATYYCOQYSGYPITFGAGTKVEIKRSDF

FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV
 KPELLHSDYMMMTERRPGTTRKHQPYAPPRDFAAYPSRDORLPEDARKPPGGGSPRTPIQEEQADAHSTLAKI
 FTERSDAFATYCOQYSGYDYNINSGPEAYDVEHSGRPSSTGKAPKVIYSTNLASGVPSRFSGSGSGTDYTLT
 TISSVEAEADAATYYCOQYSGYPITFGAGTKVEIKRSDF

C.

MEITDTLLLVLLLVVPGSTGGVQLQESGPGVLVPSQTLSTICTVSGFSLASYNIHVVRQPPGKGLEWLGVIWAGGS
 TNYSALMSRLTISKDNKSNQVFLKMSLTAAATVAVYCAKRSDDYSWFAYWQGTLLTVTSAGGGGGGGGGGGGGGG
 SENQMTQSPSSLSASVGDRTVMTCRASSSVSSSYLHWYQOKSGKAFKVIYSTNLASGVPSRFSGSGSGTDYTLT
 ISSLQPEDFATYYCOQYSGYPITFGAGTKVEIKRSDF

FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV
 KPELLHSDYMMMTERRPGTTRKHQPYAPPRDFAAYPSRDORLPEDARKPPGGGSPRTPIQEEQADAHSTLAKI
 FTERSDAFATYCOQYSGYDYNINSGPEAYDVEHSGRPSSTGKAPKVIYSTNLASGVPSRFSGSGSGTDYTLT
 TISSVEAEADAATYYCOQYSGYPITFGAGTKVEIKRSDF

D.

MEITDTLLLVLLLVVPGSTGGVQLQESGPGVLVPSQTLSTICTVSGFSLASYNIHVVRQPPGKGLEWLGVIWAGGS
 TNYSALMSRLTISKDNKSNQVFLKMSLTAAATVAVYCAKRSDDYSWFAYWQGTLLTVTSAGGGGGGGGGGGGGGG
 SENQMTQSPSSLSASVGDRTVMTCRASSSVSSSYLHWYQOKSGKAFKVIYSTNLASGVPSRFSGSGSGTDYTLT
 ISSLQPEDFATYYCOQYSGYPITFGAGTKVEIKRSDF

FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV
 KPELLHSDYMMMTERRPGTTRKHQPYAPPRDFAAYPSRDORLPEDARKPPGGGSPRTPIQEEQADAHSTLAKI
 FTERSDAFATYCOQYSGYDYNINSGPEAYDVEHSGRPSSTGKAPKVIYSTNLASGVPSRFSGSGSGTDYTLT
 TISSVEAEADAATYYCOQYSGYPITFGAGTKVEIKRSDF

E.

MEITDTLLLVLLLVVPGSTGGVQLQESGPGVLVPSQTLSTICTVSGFSLASYNIHVVRQPPGKGLEWLGVIWAGGS
 TNYSALMSRLTISKDNKSNQVFLKMSLTAAATVAVYCAKRSDDYSWFAYWQGTLLTVTSAGGGGGGGGGGGGGGG
 SENQMTQSPSSLSASVGDRTVMTCRASSSVSSSYLHWYQOKSGKAFKVIYSTNLASGVPSRFSGSGSGTDYTLT
 ISSLQPEDFATYYCOQYSGYPITFGAGTKVEIKRSDF

FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV
 KPELLHSDYMMMTERRPGTTRKHQPYAPPRDFAAYPSRDORLPEDARKPPGGGSPRTPIQEEQADAHSTLAKI
 FTERSDAFATYCOQYSGYDYNINSGPEAYDVEHSGRPSSTGKAPKVIYSTNLASGVPSRFSGSGSGTDYTLT
 TISSVEAEADAATYYCOQYSGYPITFGAGTKVEIKRSDF

도면12b

[illegible]

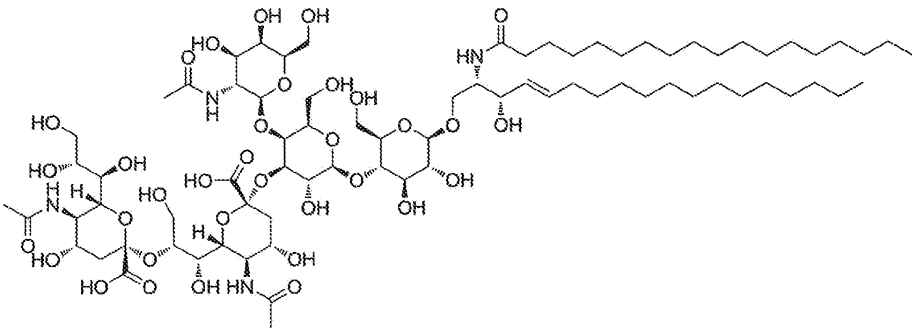
G.
 MEEDTILLMLVLLIWWPGSTGCVQLQESGPGLVKPSQTLSITCTFVSGFSLASYNIHVWRPPPKGLEWLGVIWAGGS
 TYNLSALMSRLTISKNSKNQVFLKMSSLTAAADTAVVYICAKRSDDYSWFAYWQGGTLTVTVSSCGGGSGCGGCGGGG
 SENCMQSPSPSLASAVGDRVTMTCRASSVSSTYLHWYCKSKKAPKVMVLYTSTNLASGVPSRFSGSGSGTDYTLT
 ISSLQPEDFATYYCQQYSGYPITFGQGTKVEIKRSDP
 ITWLTITSGVLGKSLITVAFLLEW
 FTSKADAPAYOOVLCFLYHLLGKPEPEYDVLKTSRDIFSGEPARTIHPSSTLNDQKLSAFTLTKR
 ENRPGTHGELYQCLTATPTLALHQAAPH

[illegible][illegible][illegible]

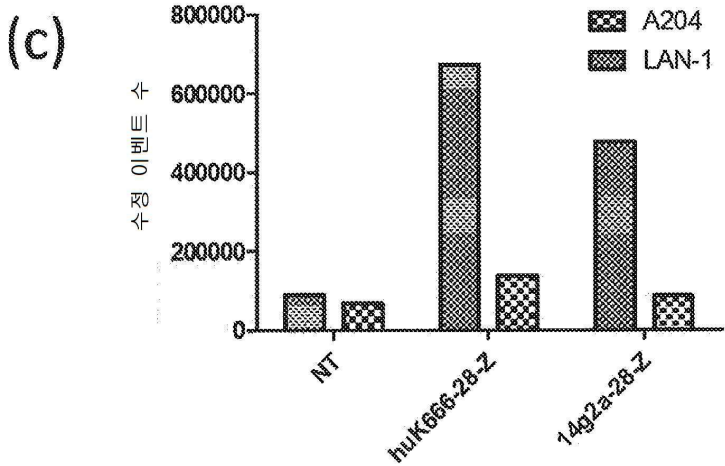
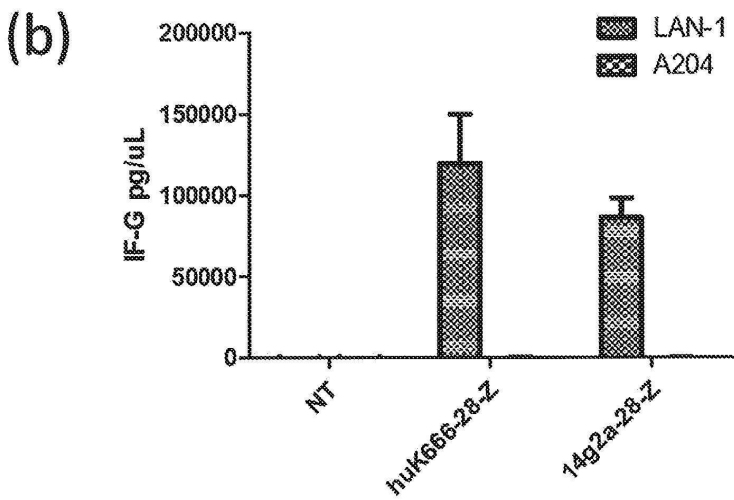
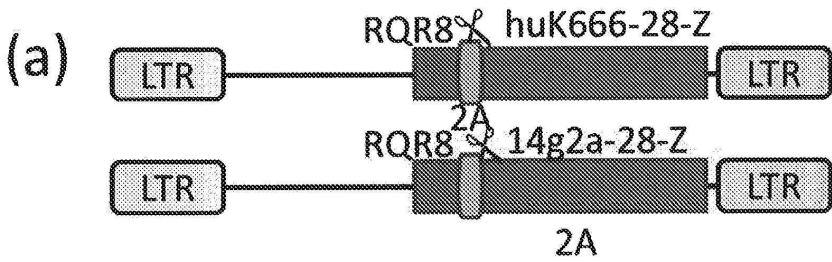
도면12c

영역	설명
iCasp9 또는 RQR8	
구제역 질환 2A 펩티드	
신호 펩티드	
scFv1	scFv {muKM666 또는 huKM666}
SDP	링크 및 사슬 절단
CD8알파 스푼	
CD28 TM	CD28 막관통 도메인
CD28 endo	CD28 엔도도메인
OX40 endo	OX40 엔도도메인
CD3 제타 엔도도메인	

도면13

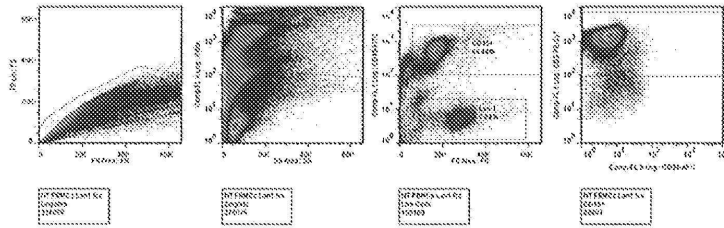


도면14

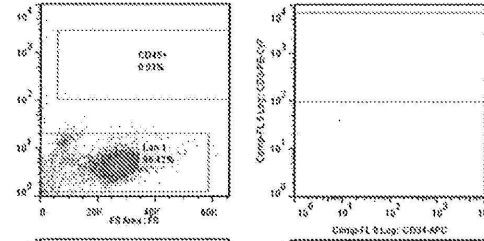


도면15

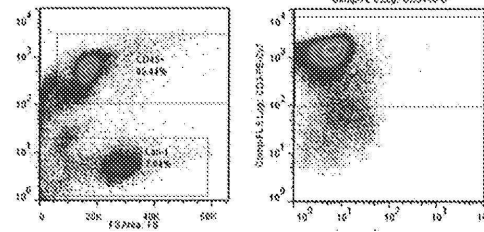
(a) 단일 → 생세포 → CD45+ → CD3+ 대 CD34+



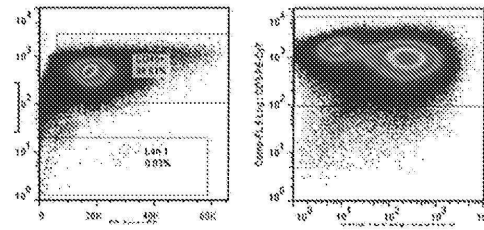
(b)
Lan 1 단독



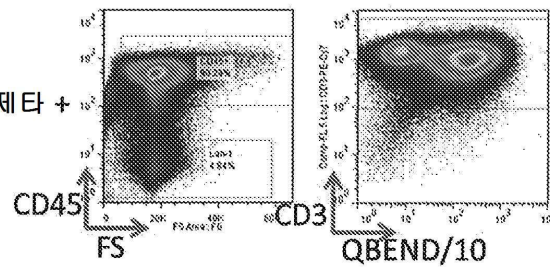
(c)
NT
PBMC +
Lan-1



(d)
HuK-28제타 +
Lan1



(e)
14g2a-28제타 +
Lan1v



서열목록

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 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 Gly Ser Gly Gly Gly Gly
115 120 125
Ser Gly 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 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 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
115 120 125

Gly 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 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 Arg Gly Lys Gly 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 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

tgaaagacc caccgttagg ttggcaagc tagcttaagt aacgccattt tgcaaggcat 60

ggaaaaatac ataactgaga atagaaaagt tcagatcaag gtcaggaaca gatggaacag 120

ctgaatatgg gccaaacagg atatctgtgg taagcagttc ctgccccggc tcagggccaa 180

gaacagatgg aacagctgaa tatgggccaa acaggatata tgtgtaagc agttcctgcc 240

ccggctcagg gccagaaca gatgtcccc agatgcggtc cagccctcag cagtttctag 300

agaaccatca gatgtttcca ggggtcccca aggacctgaa atgacctgt gccttatattg 360

aactaacaa tcagttcgct tctcgtttct gttcgcgcg tttatgctcc cgagctcaat 420

aaaagagccc acaaccctc actcggggcg ccagtcctcc gattgactga gtcgcccggg 480

taccgtgta tccaataaac cctcttgacg ttgcatccga cttgtgtgtc cgtgtttct 540

tgggagggtc tctctgagt gattgactac ccgtcagcgg gggcttttca tttgggggct 600

cgtcgggat cgggagacc ctgcccagg accaccgacc caccaccggg aggtaagctg 660

gccagcaact tatctgtgtc tgtccgattg tctagtgtct atgactgatt ttatgcgcct 720

gcgtcgggtac tagttagcta actagctctg tatctggcgg acccgtggtg gaactgacga 780

gttcggaaca cccggccgca accctgggag acgtcccagg gacttcgggg gccgtttttg 840
 tggcccgacc tgagtcctaa aatcccgatc gtttaggact ctttggtgca ccccccttag 900
 aggagggata tgtggttctg gtaggagacg agaacctaaa acagtccccg cctccgtctg 960
 aatttttgc ttcggtttgg gaccgaagcc gcgccgcgcg tcttgtctgc tgcagcatcg 1020

tctgtgttg tctctgtctg actgtgtttc tgtatttgc tgaaaatatg ggcccgggct 1080
 agcctgttac cactccctta agtttgacct taggtcactg gaaagatgtc gagcggatcg 1140
 ctcaacaaca gtcggtagat gtcaagaaga gacgttgggt taccttctgc tctgcagaat 1200
 ggccaacctt taacgtcgga tggccgcgag acggcacctt taaccgagac ctcatcacc 1260
 aggttaagat caaggtcttt tcacctggcc cgcattggaca cccagaccag gtggggtaca 1320
 tctgtacctg ggaagccttg gcttttgacc ccctccctg ggtcaagccc tttgtacacc 1380
 ctaagcctcc gcctcctctt cctccatccg ccccgctctt ccccttgaa cctcctcgtt 1440

cgaccccgcc tcgactctcc ctttatccag cctcactcc ttctctaggc gccccatat 1500
 ggccatatga gatcttatat ggggcacccc cggcccttgt aaacttcct gaccctgaca 1560
 tgacaagagt tactaacage ccctctctcc aagctcactt acaggctctc tacttagtec 1620
 agcacgaagt ctggagacct ctggcggcag cctaccaaga acaactggac cgaccgttg 1680
 tacctcacc ttaccgagtc ggcgacacag tgtgggtccg ccgacaccag actaagaacc 1740
 tagaacctcg ctggaaagga ctttacacag tctgtctgac cacccccacc gccctcaaag 1800
 tagacggcat cgcagcttgg atacacgccg ccacgtgaa ggctgccgac cccgggggtg 1860

gaccatctc tagactgcca acatgggcac cagcctgctg tgctggatgg ccctgtgcct 1920
 gctgggcgcc gaccacgccg atgcctgccc ctacagcaac cccagcctgt gcagcggagg 1980
 cggcggcagc gagctgcca cccagggcac ctctccaac gtgtccacca acgtgagccc 2040
 agccaagccc accaccaccg cctgtcctta ttccaatcct tcctgtgtga gcggaggggg 2100
 aggcagccca gccccagac ctcccacccc agccccacc atcgccagcc agcctctgag 2160
 cctgagacc gaggcctgcc gccagccgc cggcggcgcc gtgcacacca gaggcctgga 2220
 ttctgcctgc gatattaca tctgggcccc actggccggc acctgtggcg tgctgtctgt 2280

gagcctggtg atcacctgt actgcaacca ccgaaccgc aggcgcgtgt gcaagtcccc 2340
 caggccctgt gtgagagccg agggcagagg cagcctgctg acctgcggcg acgtggagga 2400
 gaaccaggc cccatggaga ccgacaccct gctgtgtgtg gtgtgtgtgc tgtgggtgcc 2460
 aggcagcacc ggccagggtc agctgcagga gtctggcca gccctggtga agcccagcca 2520
 gacctgagc atcacctgca ccgtgagcgg ctctagcctg gccagctaca acatccactg 2580
 ggtgcggcag cccccaggca agggcctgga gtggctgggc gtgatctggg ctggcggcag 2640

caccaactac aacagcgccc tgatgagccg gctgaccatc agcaaggaca acagcaagaa	2700
ccaggtgttc ctgaagatga gcagcctgac agccgccgac accgccgtgt actactgcgc	2760
caagcggagc gacgactaca gctggttcgc ctactggggc cagggcaccc tggtagcgt	2820
gagctctggc ggaggcggt ctggcggagg cggctctggc ggaggcggca gcgagaacca	2880
gatgaccag agccccagca gcttgagcgc cagcgtgggc gaccgggtga ccatgacctg	2940
cagagccagc agcagcgtga gcagcagcta cctgactgg taccagcaga agagcggcaa	3000
ggcccaaaag gtgtggatct acagcaccag caacctggcc agcggcgtgc ccagccggtt	3060
cagcggcagc ggcagcggca ccgactacac cctgaccatc agcagcctgc agcccagga	3120
cttcgccacc tactactgcc agcagtacag cggtacccc atcaccttcg gccagggcac	3180
caaggtggag atcaagcgtt cggatccgc cgagcccaaa tctcctgaca aaactcacac	3240
atgccaccg tgcaccagc ctccctggc cggcccgta gtcttctct tcccccaaa	3300
accaaggac acctcatga tgcgccgac ccttaggtc acatgcgtgg tggtagcgt	3360
gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg gacggcgtgg aggtgcataa	3420
tgccaaagca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg taccgtgtgg tcagcgtcct	3480
caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac aagtgcagg tctccaaca	3540
agccctccca gccccatcg agaaaacat ctccaaagcc aaagggcagc cccgagaacc	3600
acaggtgtac acctgcccc catcccgga tgagctgacc aagaaccagg tcagcctgac	3660
ctgcctggc aaaggttct atcccagca catcgccgtg gaggggaga gcaatgggca	3720
accggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac tccgacggt ccttcttct	3780
ctacagcaag ctaccgtgg acaagagcag gtggcagcag gggaacgtct tctcatgctc	3840
cgtgatgcat gaggccctgc acaatcacta taccagaaa tctctgagtc tgagcccagg	3900
caagaaggac cccaagtctt gggctcctgt ggtggtggga ggcgtgctgg cctgttactc	3960
tctcctggtg accgtggcct tcatcatctt ctgggtgcgc tccaagagga gcaggtcct	4020
gcacagtac tacatgaaca tgactcccc cgccccggg cccaccgca agcattacca	4080
gccctatgcc ccaccacgcg acttcgcagc ctatcgctcc cgggtgaagt tctctcgctc	4140
tgccgatgcc ccagcctatc agcaggcca gaatcagctg tacaatgaac tgaacctggg	4200
caggcgggag gactacgac tgctggataa gcggagaggc agagacccc agatgggcgg	4260
caaaccacgg cgaaaaatc cccaggaggg actctataac gagctgcaga aggacaaaat	4320
ggccgaggcc tattccgaga tcggcatgaa ggagagaga agacgcggaa agggccacga	4380

cggcctgtat cagggattgt ccaccgctac aaaagataca tatgatgccc tgcacatgca 4440
 ggccctgccca ccagatgac gcgtatcgat actgtttctca tcacatcata tcaaggttat 4500
 ataccatcaa tattgccaca gatgttactt agccttttaa tttttctcta atttagtgta 4560
 tatgcaatga tagttctctg atttctgaga ttgagtttct catgtgtaat gattatttag 4620
 agttttctctt tcatctgttc aaatttttgt ctagttttat tttttactga tttgtaagac 4680
 ttctttttat aatctgcata ttacaattct ctttactggg gtgttgcaaa tttttctgt 4740
 cattctatgg cctgactttt cttaatgggt ttttaatttt aaaaataagt cttaatatc 4800

 atgcaatcta attaacaatc ttttctttgt ggtaggact ttgagtcata agaaattttt 4860
 ctctacactg aagtcgatgat ggcatgcttc tatattattt tctaaaagat ttaaagtttt 4920
 gccttctcca tttagactta taattcacig gaattttttt gtgtgtatgg tatgacatat 4980
 gggttccctt ttatttttta catataaata ttttccctg tttttctaaa aaagaaaaag 5040
 atcatcattt tccatttgta aaatgccata ttttttcat aggtcactta catatatcaa 5100
 tgggtctgtt tctgagctct actctatttt atcagcctca ctgtctatcc ccacacatct 5160
 catgctttgc tctaaatctt gatatttagt ggaacattct ttccatttt gtcttacaag 5220

 aatatttttg ttattgtctt tgggctttct atatacattt tgaaatgagg ttgacaagtt 5280
 cggattagtc caatttgta aagacaggat atcagtggtc caggctctag ttttgactca 5340
 acaatatcac cagctgaagc ctatagagta cgagccatag ataaaaataa agattttatt 5400
 tagtctccag aaaaaggggg gaatgaaaga cccacctgt aggtttggca agctagctta 5460
 agtaacgcca ttttgcaagg catggaaaaa tacataactg agaatagaga agttcagatc 5520
 aaggtcagga acagatggaa cagctgaata tgggccaac aggatatctg tggtaagcag 5580
 ttctgcccc ggctcagggc caagaacaga tggaacagct gaatatgggc caaacaggat 5640

 atctgtggta agcagttcct gccccgctc agggccaaga acagatggtc ccagatgcg 5700
 gtccagccct cagcagtttc tagagaacca tcagatgttt ccagggtgcc ccaaggacct 5760
 gaaatgaccc tgtgccttat ttgaactaac caatcagttc gcttctcgct tctgttcgcg 5820
 cgcttctgct ccccgagctc aataaaagag cccacaacce ctactcggg gcgccagtec 5880
 tccgattgac tgagtcgccc gggtagccgt gtatccaata aacctcttg cagttgcatc 5940
 cgacttgtag tctcgctgtt ccttgggagg gtctctcttg agtgattgac taccgctcag 6000
 cgggggtctt tcac 6014

<210> 26

<211> 719

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-GD2 CAR, muKM666-HCH2CH3-CD28OXZ

<400> 26

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 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 Gly Ser

130 135 140

Gly Gly Gly Gly Ser Gly 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 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 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-CD280XZ

<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 Gly Ser Gly

130 135 140

Gly Gly Gly Ser Gly 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 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
 465 470 475 480
 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
 545 550 555 560
 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 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
 625 630 635 640
 Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly 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-CD28OXZ

<400> 28

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 Gly Ser Gly

130 135 140

Gly Gly Gly Ser Gly 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 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	320
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	400
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 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 Gly Ser Gly
 130 135 140
 Gly Gly Gly Ser Gly 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 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 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 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><223> anti-GD2 CAR, huKM666-STK-CD28XOXZ

<400> 30

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 Gly Ser Gly
 130 135 140
 Gly Gly Gly Ser Gly 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 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 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 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> 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 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 Gly Ser Gly

130 135 140

Gly Gly Gly Ser Gly 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 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

305 310 315 320
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

385 390 395 400
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 Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln

465 470 475 480
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 Gly Ser Gly

130 135 140

Gly Gly Gly Ser Gly 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 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

320

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

400

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 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

545 550 555 560
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

625 630 635 640
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 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 Gly Ser Gly

130 135 140

Gly Gly Gly Ser Gly 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 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

305 310 315 320
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

385 390 395 400
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 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 Gly	Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly 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 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 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 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 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 Gly Ser
 305 310 315 320
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly 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 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

625 630 635 640
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 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 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

<210> 37

<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 5 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 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