

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 746 555**

51 Int. Cl.:

C07K 19/00 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

C12N 15/867 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.07.2015 PCT/CN2015/084023**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.01.2016 WO16008405**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.07.2015 E 15821331 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.09.2019 EP 3170842**

54 Título: **Célula efectora inmunológica de CLD18A2 dirigido, y método de preparación y uso de la misma**

30 Prioridad:

17.07.2014 CN 201410341504

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

06.03.2020

73 Titular/es:

**CARSGEN THERAPEUTICS LIMITED (100.0%)
4F, Building 3, 466 Yindu Rd., Xuhui District
Shanghai 200231, CN**

72 Inventor/es:

**WANG, HUAMAO;
SONG, BO y
CAI, XIUMEI**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 746 555 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Célula efectora inmunológica de CLD18A2 dirigido, y método de preparación y uso de la misma

Campo técnico

5 La invención pertenece al campo de la terapia celular para el tumor, y se refiere en particular a una célula efectora inmune dirigida a CLD18A2, un método de preparación y aplicación del mismo para su uso en el tratamiento del tumor.

Técnica anterior

10 Se ha prestado cada vez más atención al papel de los linfocitos T en las respuestas inmunes tumorales. La inmunoterapia adoptiva basada en linfocitos T tiene cierto efecto en algunos tumores, más aún, dicho método de inmunoterapia puede superar los defectos anteriores del tratamiento con anticuerpos; sin embargo, el efecto terapéutico en la mayoría de los tumores todavía no es satisfactorio [GruppSA, et al., Adoptive cellular therapy. CurrTop Microbiol Immunol., 2011; 344:149-72]. En los últimos años, en base al descubrimiento de que la identificación de una célula diana por CTL depende específicamente de un receptor de linfocitos T (receptor de células T, TCR), el scFv del anticuerpo contra el antígeno relacionado con células tumorales se fusiona con un motivo de activación de señal intracelular tal como el receptor de linfocitos T CD3 ζ o Fc ϵ R1 γ para formar receptores de antígeno quimérico (CAR), y pueden modificarse genéticamente en la superficie de los linfocitos T por medios como la infección por lentivirus. Tal linfocito T CAR puede dirigir selectivamente el linfocito T a las células tumorales y específicamente matar las células tumorales de una manera independiente del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). Los linfocitos T CAR son una nueva estrategia de inmunoterapia en el campo de la inmunoterapia tumoral [Schmitz M. et al. Chimeric antigen receptor-engineered T cells for immunotherapy of Cancer. J Biomed Biotechnol, 2010, doi:10.1155/2010/956304].

15 El receptor de antígeno quimérico comprende un dominio de unión extracelular, una región transmembrana y un dominio de señalización intracelular. En general, el dominio extracelular comprende un scFv que es capaz de reconocer un antígeno asociado al tumor, la región transmembrana emplea la región transmembrana de moléculas como CD8, CD28, y similares, y el dominio de señalización intracelular emplea un motivo de activación en base a tirosina inmunorreceptora (ITAM) CD3 ζ o Fc ϵ R1 γ y el dominio de señalización intracelular de la molécula de señalización coestimuladora tales como CD28, CD27, CD137, CD134, y similares.

20 En los linfocitos T CAR de primera generación, el dominio de señalización intracelular comprende solo ITAM, y partes del receptor de antígeno quimérico están conectadas en forma de scFv-TM-ITAM. Tal CAR T puede inducir un efecto citotóxico celular contra el tumor, pero el nivel de citoquinas secretadas es relativamente bajo, y no podría inducirse ningún efecto antitumoral sostenido en el cuerpo (Zhang T. et al., Chimeric NKG2D-modified T cells inhibit systemic T-cell lymphoma growth in a manner involving multiple cytokines and cytotoxic pathways, Can Res 2007, 67 (22): 11029-11036).

25 En la segunda generación de linfocitos T CAR que se desarrolló después, se incluye también un dominio de señalización intracelular de CD28 o CD137 (también conocido como 4-1BB), y partes del receptor de antígeno quimérico se conectan en forma de scFv-TM-CD28-ITAM o scFv-TM-/CD137-ITAM. El efecto coestimulador de B7/CD28 o 4-1BBL/CD137 en el dominio de señalización intracelular induce una proliferación sostenida de linfocitos T y es capaz de aumentar el nivel de citoquinas como IL-2, IFN- γ y otras secretadas por linfocitos T, además de mejorar el período de supervivencia in vivo y el efecto antitumoral del CAR T (Dotti G. et al., CD28 costimulation improves expansion and persistence of chimeric antigen receptor modified T cells in lymphoma patients. J Clin Invest, 2011, 121 (5):1822-1826).

30 En la tercera generación de linfocitos T CAR que se desarrolló en los últimos años, partes del receptor de antígeno quimérico están conectadas en forma de scFv-TM-CD28-CD137-ITAM o scFv-TM-CD28-CD134-ITAM, la supervivencia in vivo y el efecto antitumoral de CAR T se mejora aún más (Carpenito C, et al., Control of large established tumor xenografts with genetically retargeted human T cells containing CD28 and CD 137 domains, PNAS, 2009, 106(9): 3360-3365).

35 El documento WO2015/113576A1 describe un CAR quimérico que reconoce específicamente los mimotopos peptídicos de CLDN18A2, y el documento WO2005/113587A2 se refiere a proteínas, polipéptidos y péptidos (anticuerpos monoclonales) expresados de manera asociada a tumores para su uso en el diagnóstico y el tratamiento de tumores.

40 Además de la atractiva perspectiva de los linfocitos T CAR en la inmunoterapia tumoral, se debe tener en cuenta su riesgo relativamente alto. Por ejemplo, ciertos tejidos normales pueden exhibir una baja expresión de antígeno específico para ser reconocido por el CAR, esto puede resultar en el daño por los linfocitos T CAR a dichos tejidos normales. Por ejemplo, el tratamiento contra la anhidrasa carbónica IX (CAIX), el antígeno expresado en las células tumorales de pacientes con carcinoma de células renales, es el primer caso informado de aplicación clínica de terapia adoptiva con linfocitos T CAR, que también es el primer caso que informa sobre el efecto tumoral fuera de objetivo de los linfocitos T CAR. Después de múltiples administraciones de linfocitos T CAR, los pacientes

desarrollaron toxicidad hepática de grados 2-4. Tras el análisis, se cree que la causa es la expresión de CAIX en un nivel bajo en células epiteliales de las vías biliares, este ensayo clínico se suspendió mientras se excluye la evaluación sobre los resultados terapéuticos en pacientes (Stoter G. et al., Treatment of metastatic renal cell carcinoma with autologous T-lymphocytes genetically retargeted against carbonic anhydrase IX: first clinical experience, J clin oncol, 2006, 24 (13): e20-e22; Ngo MC, et al., Ex vivo gene transfer for improved adoptive immunotherapy of cancer Human Molecular Genetics, 2011, R1_R7). Además, la señal de coestimulación excesiva en CAR puede reducir el umbral requerido para activar las células efectoras, de modo que los linfocitos T genéticamente modificados pueden activarse en condiciones de nivel bastante bajo de antígeno o en ausencia de pulso de antígeno, y dando como resultado la liberación de gran cantidad de citoquinas que pueden inducir la llamada "tormenta de citoquinas". Esta fuga de señales causará citotoxicidad fuera del objetivo, lo que provocará daños tisulares no específicos. Por ejemplo, se observó la muerte súbita de un paciente causada por tal "tormenta de citoquinas" inducida por la baja expresión de Her2 en el tejido pulmonar normal durante un tratamiento clínico utilizando células T CAR de tercera generación dirigidas a Her2 para pacientes con cáncer colorrectal avanzado con metástasis de hígado y pulmón (Morgan RA, et al., Report of a serious adverse event following the administration of T cells transduced with a chimeric antigen receptor recognizing Erbb2 Molecular Therapy, 2010, 18 (4): 843-851).

Cuando se diseña CAR T, la selección del gen del antígeno objetivo es crucial. Debido a la complejidad de la expresión génica in vivo y varios factores incontrolables, es extremadamente difícil seleccionar un gen adecuado para CAR T. Además, para muchos antígenos específicos de tumor, es muy difícil encontrar una molécula específica que lo dirija y sea adecuada para construir células efectoras inmunes modificadas con CAR. Después de que se establece el CAR T, a menudo es incapaz de obtener una región de unión extracelular activa, que también es una dificultad para desarrollar la tecnología CAR T.

Sumario de la invención

El objeto de la presente invención es proporcionar una célula efectora inmune dirigida a CLD18A2 y su método de preparación y su uso.

En un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un receptor de antígeno quimérico (CAR) expresado en la superficie de una célula efectora inmune, en donde el receptor de antígeno quimérico comprende una región de unión extracelular, una región transmembrana y una región de señales intracelulares conectadas secuencialmente, en donde la región de unión extracelular comprende proteína que reconoce específicamente CLD18A2 (claudina 18.2), en donde la región de unión extracelular comprende una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO. 4 y 6, y en donde la secuencia de la región de señales intracelulares se selecciona de CD3ζ, EctPly, CD27, CD28, CD137, CD134, o una combinación de los mismos.

En una realización preferida, la proteína que reconoce específicamente CLD18A2 es un anticuerpo o un ligando; preferiblemente, el anticuerpo es un anticuerpo de cadena simple o un anticuerpo de dominio.

En otra realización preferida, la región transmembrana es una secuencia que comprende regiones transmembrana y regiones de bisagra de CD8 o CD28.

En otra realización preferida, el receptor de antígeno quimérico comprende una región de unión extracelular, una región transmembrana y una región de señales intracelulares conectada en la siguiente secuencia:

Anticuerpo de cadena simple que reconoce específicamente el CLD18A2, CD8 y CD3ζ;

Anticuerpo de cadena simple que reconoce específicamente CLD18A2, CD8, CD137 y CD3ζ;

Anticuerpo de cadena simple que reconoce específicamente CLD18A2, región transmembrana de CD28 (CD28a), región de señales intracelulares de la molécula CD28 (CD28b) y CD3ζ; o

Anticuerpo de cadena simple que reconoce específicamente CLD18A2, región transmembrana de CD28, región de señales intracelulares de CD28, CD137 y CD3ζ.

En otra realización preferida, el receptor de antígeno quimérico comprende cualquiera de las secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19-22.

En otra realización preferida, la célula efectora inmune comprende linfocitos T, células NK o células NKT.

En otro aspecto de la invención, se proporciona el ácido nucleico que codifica el receptor de antígeno quimérico.

En una realización preferida, el ácido nucleico comprende cualquiera de las secuencias de nucleótidos de SEQ ID NO: 15-18.

En otro aspecto de la presente invención, se proporciona un vector de expresión que comprende el ácido nucleico mencionado anteriormente.

En una realización preferida, el vector de expresión se deriva del plásmido lentivirus PWPT (o PWPT-eGFP).

En otro aspecto de la presente invención, se proporciona un virus, en el que dicho virus (tal como el vector lentiviral) comprende dicho vector.

5 En otro aspecto de la invención, se proporciona el uso del receptor de antígeno quimérico, el ácido nucleico, el vector de expresión o el virus, para preparar una célula efectora inmune modificada genéticamente dirigida a CLD18A2.

En otro aspecto de la invención, se proporciona una célula efectora inmune modificada genéticamente transducida por dicho ácido nucleico, dicho vector de expresión o dicho virus.

10 En otro aspecto de la invención, se proporciona una célula efectora inmune modificada genéticamente en la que se expresa un receptor de antígeno quimérico en su superficie, en donde la secuencia de aminoácidos del receptor de antígeno quimérico se selecciona de cualquiera de las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs: 19-22.

En otro aspecto de la presente invención, se proporciona el uso de las células efectoras inmunes genéticamente modificadas para la preparación de un medicamento para suprimir el tumor, en donde el tumor es un tumor CLD18A2 positivo (alta expresión).

En otra realización preferida, el tumor positivo CLD18A2 incluye cáncer pancreático, cáncer gástrico.

15 Otros aspectos de la invención serán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la divulgación en este documento.

Descripción de los dibujos

La FIG. 1 es el diagrama esquemático de la estructura del presente vector lentivirus pWPT-eGFP-F2A-CAR que comprende la secuencia de codificación de CAR.

20 La FIG. 2 es un diagrama esquemático de la secuencia de conexión de cada parte del receptor de antígeno quimérico.

La FIG. 3 es la imagen de electroforesis del anticuerpo de cadena simple anti-CLD18A2 purificado del Ejemplo 1.

La FIG. 4 es el resultado del ensayo de transferencia Western de las líneas celulares que expresan CLD18A1 y CLD18A2 de manera estable.

25 La FIG. 5 es la detección por citometría de flujo de la especificidad de unión del anticuerpo de cadena simple CLD18A2 con CLD18A1 y CLD18A2.

La FIG. 6 es la identificación por electroforesis de un receptor de antígeno quimérico empalmado.

Descripción de las realizaciones preferidas

30 Mediante un estudio exhaustivo y en profundidad, los inventores revelan por primera vez una célula efectora inmune modificada por CAR basada en el gen CLD18A2 y su método de preparación.

Gen CLD18A2

35 En una etapa temprana, los inventores investigaron varios tipos de genes específicos de tumores y descubrieron que una parte relativamente grande de estos genes también se expresa en parte de las células de tejido normal, por lo que no se puede aplicar en la célula T del receptor de antígeno quimérico. Algunos genes específicos de tumor tienen mejores características de expresión específicas de tumor, pero las células efectoras inmunes modificadas con CAR diseñadas correspondientemente no tienen citotoxicidad tumoral o tienen una citotoxicidad tumoral más bien baja. Esto puede deberse a que las proteínas expresadas por los genes correspondientes tienen una baja antigenicidad, o expresadas en una ubicación inapropiada, o expresadas en un nivel no lo suficientemente alto, etc. También es posible que sea causado por el proceso de construcción recombinante que debilitó la capacidad de matar el tumor de linfocitos T o causa la pérdida de la capacidad de matar tumores.

40 Después de repetidas investigaciones y exámenes, los inventores descubrieron el gen CLD18A2 como el gen diana para diseñar la célula efectora inmune modificada con CAR (por ejemplo, linfocito T). La molécula claudina 18 (CLD18) (número de acceso de Genbank: variante 1 de empalme (CLD18A1): NP.sub.-057453, NM.sub.-016369 y variante 2 de empalme (CLD18A2): NM.sub.-001002026, NP.sub.-001002026) es una proteína transmembrana con un peso molecular de aproximadamente 27,9/27,72 kD. La claudina es una proteína de membrana estrechamente conectada que se localiza en el epitelio y el endotelio.

45 El estudio muestra que el CLD18A1 se expresa selectivamente en el epitelio normal del pulmón y el estómago, mientras que el CLD18A2 solo se expresa en células diferenciadas con una vida útil corta en el epitelio del estómago, no en las células madre gástricas. Mientras tanto, las investigaciones han indicado que el CLD18A2 se expresa en diversas células tumorales. En vista de las características descritas anteriormente de CLD18A2, los

inventores han especulado que CLD18A2 es un objetivo terapéutico importante para estos tumores. Dicha especulación ha sido verificada por abundante trabajo posterior.

Receptor de antígeno quimérico y el ácido nucleico codificante del mismo

5 La presente invención proporciona un receptor de antígeno quimérico expresado en la superficie del linfocito T, en el que el receptor de antígeno quimérico comprende una región de unión extracelular, una región transmembrana y una región de señales intracelulares conectadas secuencialmente, en donde la región de unión extracelular comprende una proteína que reconoce específicamente CLD18A2 (claudina 18.2), en donde la región de unión extracelular comprende una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO. 4 y 6, y en donde la secuencia de la región de señales intracelulares se selecciona de CD3 ζ , E ϵ PI γ , CD27, CD28, CD137, CD134 o una combinación de los mismos. El receptor de antígeno quimérico se expresa en la superficie del linfocito T, lo que hace que el linfocito T tenga un efecto citotóxico altamente específico sobre las células tumorales que expresaron CLD18A2 a un nivel alto.

15 Como un modo preferido de la presente invención, la región de unión extracelular comprende un anticuerpo scFv de cadena simple que reconoce específicamente CLD18A2. La región de unión extracelular de la proteína receptora de antígeno quimérico mencionada anteriormente está conectada con una región transmembrana de CD8 o CD28 a través de una región de bisagra CD8, y la región de membrana cruzada es seguida inmediatamente por la región de señales intracelulares.

20 La presente invención también incluye ácido nucleico que codifica los receptores de antígeno quimérico. La secuencia de ácido nucleico de la presente invención puede ser una forma de ADN o una forma de ARN. La forma de ADN comprende ADNc, ADN genómico o ADN sintetizado artificialmente. El ADN puede ser monocatenario o bicatenario, una cadena codificante o una cadena no codificante. Los codones del ácido nucleico de la presente invención que codifican la secuencia de aminoácidos de la presente proteína receptora de antígeno quimérico pueden ser degenerados, es decir, una variedad de secuencias de ácido nucleico degeneradas que codifican la misma secuencia de aminoácidos están incluidas en el alcance de la presente invención. Los codones de ácido nucleico degenerados que codifican el aminoácido correspondiente son bien conocidos en la técnica. La presente invención también se refiere a variantes del polinucleótido, que codifican polipéptidos o fragmentos, análogos y derivados de los polipéptidos que tienen las mismas secuencias de aminoácidos que la presente invención. Las variantes del polinucleótido pueden ser variantes alélicas naturales o variantes no naturales. Estas variantes de nucleótidos incluyen variantes de sustitución, variantes de delección y variantes de inserción. Como se sabe en la técnica, una variante alélica es una forma alternativa de un polinucleótido, que puede ser la sustitución, delección o inserción de uno o más nucleótidos, pero no altera sustancialmente la funcionalidad del polipéptido codificado por el mismo.

35 El anticuerpo monoclonal que reconoce específicamente CLD18A2 humano se puede elegir entre los anticuerpos descritos en la técnica anterior. Una variedad de anticuerpos monoclonales que reconocen el epítipo c-terminal de CLD18A2 se puede aplicar en la presente invención de manera adecuada, siempre y cuando después de la construcción recombinante, finalmente se pueda obtener una célula efectora inmune modificada con CAR con actividad destructora. Preferiblemente, un anticuerpo de cadena simple, más preferiblemente los anticuerpos de cadena simple son los anticuerpos 163 y 175; los anticuerpos 163 y 175 pueden reconocer específicamente CLD18A2 pero no CLD18A1. Más preferiblemente, están conectados a Fc (ScFv-163 y ScFv-175).

40 La expresión "fragmento de anticuerpo de cadena simple (scFv)" como se usa en el presente documento se refiere a un fragmento de anticuerpo definido de la siguiente manera. Es una proteína recombinante que comprende la región variable de la cadena pesada (VH) y una región variable de la cadena liviana (VL) conectadas por un enlazador, y el enlazador asocia los dos dominios por los que, finalmente, se forma un sitio de unión al antígeno. El tamaño del scFv es generalmente 1/6 de un anticuerpo completo. Preferiblemente, el anticuerpo de cadena simple es una secuencia de cadena de aminoácidos codificada por una cadena de nucleótidos. Los anticuerpos de cadena simple usados en la presente invención pueden usarse solos o en combinación con técnicas convencionales conocidas en la técnica, por ejemplo, eliminación, inserción, sustitución, adición y/o recombinación de aminoácidos y/u otros métodos de modificación para una modificación adicional. Es bien sabido por los expertos en la técnica introducir modificaciones en la secuencia de ADN de acuerdo con la secuencia de aminoácidos del anticuerpo, por ejemplo, ver Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1989) N.Y. La modificación se realiza preferiblemente en el nivel de ácido nucleico. Los anticuerpos de cadena simple anteriores también pueden comprender derivados de los mismos. Los "derivados de anticuerpos" en la presente invención incluyen, por ejemplo, derivados de los anticuerpos que se obtuvieron mediante técnicas de presentación en fagos, y la eficacia de unión de dichos anticuerpos con el epítipo de antígeno CLD18A2 se incrementa mediante la técnica de resonancia de plasmón superficial que se usa en el sistema Biacore (Schier, Human Antibodies Hybridomas 7 (1996), 97-105; Malmberg «Journal of Immunological Methods»), 1995, 183:7-13). También se incluyen aquellos derivados de anticuerpos producidos por el método de preparación de anticuerpos quiméricos descrito en, por ejemplo, el documento WO 89/09622, el método de preparación de anticuerpos humanizado descrito en los documentos EP-A10239400 y WO 90/07861, el método para producir anticuerpos xenogénicos, por ejemplo, anticuerpos humanos en ratones, que se menciona en los documentos WO 91/10741, WO 94/02602 y WO 96/33735.

La expresión "reconocimiento específico" de la presente invención significa que el anticuerpo de la presente invención no reacciona o sustancialmente no reacciona con ningún polipéptido que no sea un antígeno diana. El grado de especificidad puede determinarse mediante técnicas de inmunología que incluyen, pero no se limitan a inmunotransferencia, cromatografía por inmutafinidad, citometría de flujo, y similares. En la presente invención, el reconocimiento específico se determina preferiblemente por citometría de flujo. En condiciones particulares, los expertos en la técnica pueden determinar el estándar de reconocimiento específico en función de su conocimiento de la técnica.

La región transmembrana del receptor de antígeno quimérico se puede seleccionar de la región transmembrana de proteínas tales como CD8 o CD28. CD8 o CD28 son los marcadores naturales en la superficie de los linfocitos T. La proteína CD8 humana es un heterodímero, que consta de dos cadenas, $\alpha\beta$ o $\gamma\delta$. En una realización de la invención, la región transmembrana se selecciona de la región transmembrana de CD8 alfa o CD28. Además, la región de bisagra alfa CD8 (bisagra) es una región flexible. Por lo tanto, la región transmembrana de CD8 o CD28 y la región de bisagra se pueden usar para conectar el dominio de reconocimiento diana scFv con una región de señales intracelulares en el receptor de antígeno quimérico (CAR).

La región de señales intracelulares se selecciona de las regiones de señales intracelulares de las proteínas CD3 ζ , E ζ , CD28, CD137 y CD134, y sus combinaciones. La molécula CD3 consta de cinco subunidades, en donde la subunidad CD3 ζ (también llamada CD3 zeta, para abreviar "Z") comprende un motivo 3-ITAM, que es una importante región de transducción de señales en el complejo TCRCD3. CD3 δ Z es una secuencia truncada de CD3 ζ sin motivo ITAM, que se usa comúnmente para construir el control negativo en la práctica de la presente invención. Fc ϵ R1 γ se distribuye principalmente tanto en los mastocitos como las superficies de granulocitos basófilos, que contiene un motivo ITAM, y es similar a CD3 ζ en estructura, distribución y función. Además, como se describió previamente, CD28, CD137 y CD134 son moléculas señalizadoras coestimuladoras, que pueden causar una proliferación sostenida de linfocitos T por la acción de coestimulación generada por los segmentos de señal intracelular después de la unión con los ligandos respectivos, y puede aumentar el nivel de citoquinas secretadas por linfocitos T como IL-2 e IFN-gamma, y similares, al tiempo que aumenta el ciclo de supervivencia in vivo y el efecto antitumoral de las células efectoras inmunes modificadas por CAR.

La proteína del receptor de antígeno quimérico anti-CLD18A2 codificada por el ácido nucleico de la presente invención puede conectarse secuencialmente de la siguiente manera:

scFv(CLD18A2)-CD8-CD3 ζ ;

scFv(CLD18A2)-CD8-CD137-CD3 ζ ;

scFv(CLD18A2)-CD28a-CD28b-CD3 ζ ;

scFv(CLD18A2)-CD28a-CD28b-CD137-CD3 ζ ;

y sus combinaciones, en donde CD28a en la proteína receptora de antígeno quimérico relacionada representa una región transmembrana CD28, CD28b representa la región de señales intracelulares de moléculas CD28. Los diversos receptores de antígeno quimérico anti-CLD18A2 anteriores se denominan colectivamente scFv (CLD18A2)-CAR.

En una realización de la invención, el ácido nucleico descrito por la invención tiene la secuencia que se muestra en la SEQ ID NO: 15-18. En otra realización de la presente invención, el ácido nucleico de la presente invención es un ácido nucleico que codifica la proteína del receptor de antígeno quimérico como se muestra en una de las SEQ ID NO: 19-22.

Vector de expresión y célula

La presente invención también proporciona un vector que comprende el ácido nucleico que codifica la proteína receptora de antígeno quimérico mencionada anteriormente expresada en la superficie del linfocito T. En una realización, el vector usado en la presente invención es un vector de plásmido lentivirus pWPT-eGFP. Dicho plásmido pertenece a un sistema de vector de lentivirus autoactivado de tercera generación, que tiene 3 plásmidos, es decir, el plásmido de relleno psPAX2 que codifica la proteína Gag/Pol y la proteína Rev; vector de envoltura PMD2.G que codifica la proteína VSV-G; y el vector vacío pWPT-eGFP, que puede usarse para la introducción recombinante de la secuencia de ácido nucleico diana, es decir, una secuencia de ácido nucleico que codifica un CAR. En el vector vacío pWPT-eGFP (que es simulado en los siguientes experimentos), el promotor del factor de elongación-1 alfa (EF-1 α) regula la expresión de la proteína fluorescente verde mejorada (eGFP), mientras que en el vector de expresión recombinante codifica gen diana CAR, la coexpresión de eGFP y CAR se realiza a través de la secuencia de omisión de ribosomas 2A (abreviada como "F2A") del virus de la fiebre aftosa (FMDV).

La presente invención comprende, además, el virus que comprende dicho plásmido. El virus divulgado por la invención comprende virus infeccioso después del empaquetamiento, así como el virus por empaquetar que comprende un elemento esencial para empaquetar en un virus infeccioso. Otros virus conocidos en la técnica para transferir genes extraños a linfocitos T y sus vectores plasmídicos correspondientes también pueden usarse en la

presente invención.

En una realización de la invención, dicho virus es un lentivirus que comprende el vector recombinante pWPT-eGFP2A-CAR mencionado anteriormente (es decir, que comprende scFv (CLD 18A2)-CAR).

5 La invención también proporciona un linfocito T genéticamente modificado, que es transducido por el presente ácido nucleico, donde el presente plásmido recombinante comprende el ácido nucleico mencionado anteriormente, o el virus comprende dicho plásmido. Los métodos de transducción de ácido nucleico convencionales en el presente campo, incluidos los métodos de transducción no virales y virales, pueden usarse en la presente invención. El método de transducción no basado en virus comprende el método de electroporación y el método de transposición. Recientemente, el aparato de transfección nuclear Nucleofector desarrollado por Amaxa puede introducir directamente un gen extraño en el núcleo para realizar una transducción de alta eficacia del gen diana. Además, la eficacia de transducción de los sistemas de transposones basados en el sistema Sleeping Beauty o el transposón PiggyBac se mejora en gran medida en comparación con el método de electroporación común, y ya se ha informado sobre la aplicación combinada del aparato de transfección Nucleofector y el sistema Sleeping Beauty (Davies JK., et al. Combining CD19 redirection and alloanergization to generate tumor-specific human T cells for allogeneic cell therapy of B-cell malignancies. *Cancer Res*, 2010, 70(10): OF1-10.). Tal método no solo tiene relativamente alta eficacia de transducción, sino también puede lograr la integración dirigida al sitio de genes diana. En una realización de la invención, el método de transducción de linfocitos T para realizar la modificación del receptor de antígeno quimérico se basa en virus tales como retrovirus o lentivirus. Dicho método tiene ventajas tales como alta eficacia de transducción, expresión estable de genes extraños, y puede acortar el tiempo para que el cultivo in vitro de linfocitos T alcance la escala clínica. El ácido nucleico transducido se expresa en la superficie del linfocito T transgénico mediante transcripción y traducción. El ensayo de citotoxicidad in vitro en varias células tumorales de cultivo diferente demuestra que el linfocito T modificado por el presente gen del receptor del antígeno quimérico anti-CLD18A2 tiene un efecto de destrucción de células tumorales altamente específico (también conocido como citotoxicidad). Por lo tanto, el presente ácido nucleico que codifica la proteína del receptor de antígeno quimérico, el plásmido que comprende dicho ácido nucleico, el virus que comprende dicho plásmido y los linfocitos T transgénicos transducidos por los ácidos nucleicos, plásmidos o virus anteriores pueden usarse eficazmente para inmunoterapia tumoral.

En una realización, el linfocito T modificado genéticamente de la invención expresa un receptor de antígeno quimérico en la superficie del mismo, en donde el receptor de antígeno quimérico está codificado y expresado por un ácido nucleico de una de las SEQ ID NO: 15-18. En otra realización, la superficie de linfocitos T transgénicos de la presente invención expresa un receptor de antígeno quimérico, cuya secuencia de aminoácidos se selecciona de una de las SEQ ID NO: 19-22.

Dado que actualmente no hay ningún informe de CAR T dirigido a CLD18A2, los inventores por primera vez descubrieron con éxito una célula efectora inmune (por ejemplo, linfocitos T) adecuada para la modificación de CAR de numerosos genes relacionados con tumores, y prepararon con éxito CAR-modificado células efectoras inmunes. Por lo tanto, se proporciona un nuevo medio de tratamiento para tumores como el cáncer pancreático y el cáncer de estómago.

Las realizaciones de la presente invención se describen adicionalmente a continuación con referencia a ejemplos específicos. Debe entenderse que estas realizaciones son solo para fines ilustrativos y no pretenden limitar el alcance de la invención. Los métodos experimentales no especialmente señalados de condiciones particulares están de acuerdo, en general, con condiciones convencionales, tales como las descritas en J. Sambrook et. al., Eds, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3ª edición, Science Publishing House (2002), o las condiciones recomendadas por el fabricante.

Ejemplo 1 La expresión del anticuerpo de cadena simple contra CLD18A2

Al investigar y analizar repetidamente, los inventores identificaron varios anticuerpos scFv que reconocen CLD18A2, para abreviar, denominados 125, 163 y 175.

125 (SEQ ID NO: 1 (nucleótido), 2 (aminoácido)), 163 (SEQ ID NO: 3 (nucleótido), 4 (aminoácido)), 175 (SEQ ID NO: 5 (nucleótido), y 6 (aminoácido)) secuencias de anticuerpos de cadena simple se sintetizaron mediante síntesis genética basada en un puente de PCR. Los productos sintetizados fueron digeridos por Nhe1/BamH1 (adquirido de NEB), ligados en el vector plasmídico pCMV-V5-Fc (dicho plásmido se fusiona y expresa el anticuerpo humano Fc corriente abajo del sitio de multiclonación, en lo sucesivo denominado V5-Fc para abreviar, comprado en Shanghai raygene biotechnology Co., LTD) digerido por el mismo Nhe1/BamH1 a través del ADN de T4 y se transformó en la bacteria huésped TOP10. Los clones se seleccionaron y los clones positivos se identificaron por PCR y se confirmaron por secuenciación. Se obtuvieron los plásmidos de expresión eucariotas V5-scFv-125-Fc, V5-scFv-163-Fc y V5-scFv-175-Fc.

Los plásmidos de expresión anteriores se usaron para transfectar HEK-293F bien crecido, cultivado a 37°C, 5% de CO₂, 125 rpm en un lecho de agitación durante 7 días. Se centrifugaron durante 10 minutos a 4000 rpm y se eliminó el precipitado. El sobrenadante se recogió y se filtró con una película de filtro de 0,45 µm. La muestra procesada se purificó mediante una columna de afinidad de proteína A (comprada de GE) y, eventualmente, se obtuvieron la

proteína de fusión de anticuerpo monocatenario-Fc purificada scFv-125-fc (para abreviar, scFv-125), scFv-163-fc (para abreviar, scFv-163), scFv-175-fc (scFv-175 para abreviar). El resultado de identificación se muestra en la FIG. 3)

Ejemplo 2. Construcción de la línea celular de expresión estable de CLD18A1 o CLD18A2

5 1. Construcción de vectores de expresión de CLD18A1 y CLD18A2 y preparación de lentivirus

Las secuencias de codificación completas de CLD18A1 (GenBank: NM_016369) y la secuencia de codificación completa de CLD18A2 (Genbank: nm_001002026) se sintetizaron mediante tecnología de síntesis genética basada en puente de PCR. Se insertó una marca de bandera (DYKDDDK) en el terminal c, y se agregaron MluI/SalI (comprado a NEB) en ambos extremos de los segmentos de genes sintetizados. Los segmentos fueron doblemente digeridos por MluI/SalI, ligados en el vector plasmídico pWPT (adquirido de addgene) doblemente digeridos por el mismo MluI/SalI a través de ADN T4, y se transformaron en la bacteria huésped TOP10. Los clones fueron seleccionados e identificados por PCR y confirmados por secuenciación. Se obtuvieron los plásmidos de vector lentivirus correctos PWPT-CLD18A1, PWPT-CLD18A2. Los plásmidos anteriores y los plásmidos accesorios de empaquetamiento (pGagpol, pREV, pVsv-g (todos adquiridos de addgene)) se cotransfectaron en determinada proporción de células 293T. Después de 48 h y 72 h de transfección, las soluciones de virus CLD18A1 y CLD18A2 se recogieron, se subempaquetaron y se almacenaron a -80°C.

2. Establecimiento de linaje de expresión exógena estable para CLD18A1 y CLD18A2 y ensayo de transferencia Western

Las soluciones de virus CLD18A1 o CLD18A2 recogidas anteriormente se agregaron a células 293T en un plato de 6 cm, respectivamente. Después de 72 horas, las células se recogieron y se lisaron mediante solución de lisis celular. Por otro lado, BGC-823 (adquirido de la biblioteca celular de Shanghai de la Institución de Ciencias de China, TCHul 1) y NCI-N87 (adquirido de ATCC, CRL-5822) de cáncer de estómago humano fueron infectados por el virus CLD18A2, respectivamente. Después de que las células crecieron hasta completarse, se lisaron mediante una solución de lisis celular. 40 µg de proteína de células lisadas recogidas se sometieron a electroforesis en gel SDS-PAGE, y el gel se ensayó por inmunotransferencia, teñido con anticuerpo anti-FLAG de ratón (adquirido de Sigma Aldrich). Después de lavar con PBS, se incubó junto con anticuerpos antiratón de cabra marcados con peroxidasa de rábano picante (comprado en Santa Cruz) y se colorearon con reactivo ECL, y finalmente se desarrollaron.

Los resultados de la transferencia Western mostraron tiras con un peso molecular de aproximadamente 28 kD en células 293T transfectadas con CLD18A1 o CLD18A2 (es decir, 293T-CLD18A1, 293T-CLD18A2) y células BGC-823 y NCI-N87 transfectadas por CLD18A2 (es decir, BGC-823-CLD18A2, NCI-N87-CLD18A2), pero ninguna tira en las células vacías no transfectadas (FIG. 4), lo que indica la construcción exitosa de líneas celulares que expresan CLD18A1 y CLD18A2 de manera exógena.

3. Etapas del experimento de análisis de citometría de flujo del perfil de unión de cada línea celular con anticuerpo anti-CLD18A2

Usando un clasificador celular activado por fluorescencia (FACS) (compañía BD, FACSCalibur), se probó la capacidad de unión respectiva de los anticuerpos de cadena simple scFv-125, scFv-163 y scFv-175 con cada una de las siguientes líneas celulares.

El método específico es el siguiente:

1) Células tumorales 293T, 293T-CLD18A1, 293T-CLD18A1, 293T-CLD18A2, BGC-823, BGC-823-CLD18A2, NCI-N87, NCI-N87CLD18A2 en fase de crecimiento exponencial se inocularon en una placa plana de 6 cm con una densidad celular de inoculación de aproximadamente el 90%, y se incubaron durante la noche a 37°C en incubadora.

2) Las células se digirieron con EDTA 10 mM y se recogieron por centrifugación a 200 g x 5 min. Las células se resuspendieron en una solución reguladora de fosfato al 1% que contenía suero de ternera (NBS PBS) a una concentración de 1×10^6 - 1×10^7 /ml) y se añadieron a un tubo citométrico a 100 µl/tubo.

3) Se centrifugaron a 200 g durante 5 min, y se descartó el sobrenadante.

4) Se agregaron los anticuerpos por analizar, scFv-125, scFv163 y scFv-175, y simultáneamente se usaron anticuerpos no relacionados como control negativo con concentración final de anticuerpo de 20 µg/ml y 100 µl de anticuerpo en cada tubo. Luego se dejaron en el baño de hielo durante 45 minutos.

5) A cada tubo se le añadieron 2 mL de NBS PBS al 1%, se centrifugó a 200 g durante 5 minutos dos veces.

6) Se descartó el sobrenadante. 1:50 de anticuerpo antihumano de cabra marcado con FITC diluido (de Shanghai KangChen Biotech Inc.), se añadieron 100 µl por tubo, y luego se puso en baño de hielo durante 45 minutos.

7) A cada tubo se le añadieron 2 mL de PBS NBS al 1%, se centrifugó a 200 g durante 5 minutos dos veces.

8) Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 300 µl de NBS PBS al 1%, detectado por citometría de flujo.

9) Se usó el software de análisis de datos de citómetro de flujo WinMDI 2.9 para analizar los datos.

5 Los resultados de la citometría de flujo mostraron que el anticuerpo de cadena simple scFv-125 no solo puede unirse a las células 293T que expresaban de manera estable CLD18A1 sino también a las células 293T que expresaban de manera estable CLD18A2 (FIG. 5), lo que indica que este anticuerpo de cadena simple carece de especificidad de unión por CLD18A2. Afortunadamente, los anticuerpos de cadena simple scFv-163 y scFv-175 pueden reconocer específicamente el 293T que expresa establemente CLD18A2, no se unen a las células 293T que expresan establemente CLD18A1, lo que indica que estos dos anticuerpos de cadena simple pueden reconocer específicamente CLD18A2. Además, estos dos anticuerpos de cadena simple también pueden reconocer específicamente las líneas celulares BGC-823 o NCI-N87 transfectadas de manera estable con CLD18A2, pero no se unen a las células BGC-823 o NCI-n87 no transfectadas con CLD18A2.

Ejemplo 3: Construcción de plásmidos lentivirales que expresan proteínas receptoras de antígeno quimérico codificadas por los ácidos nucleicos de la presente invención, y empaquetamiento de virus

15 La Tabla 1 explica la secuencia de conexión de los ejemplos de receptores de antígeno quimérico de la presente invención, la conexión también se puede ver en la FIG. 2.

Receptor de antígeno quimérico	Región de unión extracelular – región transmembrana – región de señal intracelular 1 – región de señal intracelular 2, etc.
CLD18A2-δZ	scFv(CLD18A2)-CD8-CD3δzeta (control negativo)
CLD18A2-163-Z	scFv(CLD18A2-163)-CD8-CD3 zeta
CLD18A2-175-Z	scFv(CLD 18A2-175)-CD8-CD3 zeta
C L D18A2-163-28BBZ	scFv(CLD18A2-163)-CD28a-CD28b-CD137 (es decir, 4-1BB)-CD3 zeta
CLD18A2-175-28BBZ	scFv(CLD 18A2-163)-CD28a-CD28b-CD137-CD3 zeta

1. Amplificación de fragmentos de ácido nucleico

(1) Amplificación de secuencias scFv (CLD18A2-163, CLD18A2-175)

20 Usando el plásmido v5-scFv-163-fc como plantilla, en el par de cebadores, el cebador directo (SEQ ID NO: 7) comprende parte de la secuencia 2A y el cebador inverso (SEQ ID NO: 8) comprende parte de la secuencia de bisagra CD8. Se obtuvo ScFv (CLD18A2-163) por amplificación por PCR. Del mismo modo, usando el plásmido v5-scFv-175-Fc como plantilla, se obtuvo scFv (CLD18A2-175) por amplificación por PCR, usando un par de cebadores en el que el cebador directo comprende parte de la secuencia 2A (SEQ ID NO: 9) y el cebador inverso (SEQ ID NO: 25 10) comprende parte de la secuencia de bisagra CD8.

(2) La secuencia de ácido nucleico de otras partes del receptor de antígeno quimérico

Otra parte de la proteína del receptor de antígeno quimérico anti-CLD18A2 excepto scFv (CLD18A2-163, CLD18A2-175) se obtuvo por PCR usando las secuencias SEQ ID NOs: 18 y 21 descritas en el documento CN 201310164725.X.

30 En donde la secuencia eGFP-F2A se obtuvo mediante amplificación por PCR usando el plásmido de la SEQ ID NO: 18 descrito en la solicitud de patente número 201310164725.X como plantilla y las SEQ ID NO: 11 y 12 como par de cebadores.

35 Obtención de CD8-CD3ζ (Z) y CD28a-CD28b-CD137-CD3ζ (28BBZ): los fragmentos CD8-CD3ζ(Z) y CD28a-CD28b-CD137-CD3ζ(28BBZ) se obtuvieron respectivamente mediante amplificación por PCR usando scFv(GPC3)-CD8-CD3ζ (SEQ ID NO: 18 en la solicitud de patente 201310164725.X) y scFv(GPC3)-CD28a-CD28b-CD137-CD3ζ (SEQ ID NO: 21 en la solicitud de patente 201310164725.X) como plantillas y SEQ ID NOs : 13 y 14 como par de cebadores.

La SEQ ID NO: 18 en 201310164725. X corresponde a la SEQ ID NO: 23 en la presente invención.

La SEQ ID NO: 21 en 201310164725. X corresponde a la SEQ ID NO: 24 en la presente invención.

2. Empalme de fragmentos de ácido nucleico

El fragmento de ácido nucleico eGFP-F2A obtenido como se mencionó anteriormente, los fragmentos de ácido nucleico scFv (CLD18A2-163) o scFv (CLD18A2-175) de igual peso molar, y los fragmentos de ácido nucleico CD8-CD3ζ (Z) o CD28a-CD28b-CD137-CD3ζ (BBZ) de igual peso molar se sometieron a un empalme de tres fragmentos como se muestra en la Fig. 2 y PCR. Las condiciones de empalme fueron las siguientes: predesnaturalización a 94°C durante 4 min; desnaturalización a 94°C durante 40 s; recocido a 60°C durante 40 s; que se extiende a 68°C durante 140 s, 5 ciclos, y luego extensión total a 68°C durante 10 min. Después de agregar el ADN polimerasa y el cebador directo (SEQ ID NO: 11) y el cebador inverso (SEQ ID NO: 14), la amplificación por PCR se realizó durante 30 ciclos, y las condiciones de amplificación fueron: desnaturalización previa a 94°C durante 4 min; desnaturalización a 94°C durante 40 s; recocido a 60°C durante 40 s; extensión a 68°C durante 140 s, durante 30 ciclos; y luego extensión total a 68°C durante 10 min. Los fragmentos obtenidos después de la amplificación son los siguientes (Tabla 2):

- eGFP-scFv(CLD18A2)-163-Z (SEQ ID NO: 15, 19),
- eGFP-scFv(CLD18A2)-163-BBZ (SEQ ID NO: 16, 20),
- eGFP-scFv(CLD18A2)-175-Z (SEQ ID NO: 17, 21),
- eGFP-scFv(CLD18A2)-175-BBZ (SEQ ID NO: 18, 22).

La identificación de resultados se mostró en la FIG. 6.

TABLA 2. Las secuencias en la presente invención (SEQ ID NO. 4, 6, 15 a 18 y 19 a 22

Secuencia	Descripción
SEQ ID NO: 1	Secuencia de ácidos nucleicos que codifica anticuerpo monocatenario 125 CLD18A2
SEQ ID NO: 2	Secuencia de ácidos nucleicos de anticuerpo monocatenario 125 CLD18A2
SEQ ID NO: 3	Secuencia de ácidos nucleicos que codifica anticuerpo monocatenario 165 CLD18A2
SEQ ID NO: 4	Secuencia de ácidos nucleicos de anticuerpo monocatenario 163 CLD18A2
SEQ ID NO: 5	Secuencia de ácidos nucleicos que codifica anticuerpo monocatenario 175 CLD18A2
SEQ ID NO: 6	Secuencia de ácidos nucleicos de anticuerpo monocatenario 175 CLD18A2
SEQ ID NO: 7~14	Secuencias de cebadores
SEQ ID NO: 15	Secuencia de ácidos nucleicos que codifica la proteína receptora de antígeno quimérico CLD18A2-163-Z
SEQ ID NO: 16	Secuencia de ácidos nucleicos que codifica la proteína receptora de antígeno quimérico CLD18A2-163-28BBZ
SEQ ID NO: 17	Secuencia de ácidos nucleicos que codifica la proteína receptora de antígeno quimérico CLD18A2-175-Z
SEQ ID NO: 18	Secuencia de ácidos nucleicos que codifica la proteína receptora de antígeno quimérico CLD18A2-175-28BBZ
SEQ ID NO: 19	Secuencia de ácidos nucleicos que codifica la proteína receptora de antígeno quimérico CLD18A2-163-Z
SEQ ID NO: 20	Secuencia de ácidos nucleicos de proteína receptora de antígeno quimérico CLD18A2-163-28BBZ
SEQ ID NO: 21	Secuencia de ácidos nucleicos de proteína receptora de antígeno quimérico CLD18A2-175-Z
SEQ ID NO: 22	Secuencia de ácidos nucleicos de proteína receptora de antígeno quimérico CLD18A2-175-28BBZ
SEQ ID NO: 23	scFv(GPC3)-CD8-CD3ζ (SEQ ID NO: 18 in 201310164725.X)
SEQ ID NO: 24	scFv(GPC3)-CD28a-CD28b-CD137-CD3ζ (SEQ ID NO:21 en 201310164725.X)

3. Método de construcción del vector plasmídico lentiviral

Como ejemplo, el sistema de vector utilizado para construir el vector de plásmido lentiviral de la presente invención pertenece a un sistema de vector de lentivirus autoinactivador de tercera generación, que comprende tres plásmidos, a saber, psPAX2 que codifica la proteína Gag/Pol y la proteína Rev (comprada de addgene); plásmido de envoltura PMD2.G que codifica la proteína VSV-G (adquirido de addgene); y vector de expresión recombinante que codifica el gen diana CAR, que se basa en el vector vacío PWPT-eGFP (adquirido de addgene).

En el vector vacío pWPT-eGFP, el promotor del factor de elongación -1 alfa (EF-1 α) regula la proteína fluorescente verde mejorada (eGFP), mientras que en el vector de expresión recombinante que codifica el gen diana CAR, la coexpresión de eGFP y CAR se realiza a través de la secuencia de omisión de ribosomas 2A (abreviada como "F2A") del virus de la fiebre aftosa (FMDV). F2A es una secuencia central del FMDV 2A (o denominado "polipéptido de autoempalme 2A"), que tiene la función de "autoempalme" de 2A, y puede realizar la coexpresión de genes en sentido tanto ascendente como descendente. Debido a la alta eficacia del empalme, la expresión altamente equilibrada de genes corriente arriba y corriente abajo y la secuencia corta de sí mismo, 2A proporcionó una estrategia efectiva y factible para construir el vector policistrónico para la terapia génica. En particular, esta secuencia se usa a menudo en la terapia inmunológica basada en linfocitos T modificados con el gen del receptor de antígeno quimérico, para realizar la coexpresión del gen diana y GFP o eGFP, por lo tanto, la expresión de CAR puede detectarse indirectamente detectando GFP o eGFP.

Según el presente ejemplo, se construyó un vector de expresión de lentivirus que coexpresa eGFP y un CAR específico unido por F2A, colectivamente, denominado pWPT-eGFP-F2A-CAR (FIG. 1). El gen diana eGFP-F2ACAR obtenido en la etapa 2 (ver 1(2) en el Ejemplo 3, y el elemento que sigue a F2A se llama como CAR para abreviar) fue digerido por las endonucleasas de restricción MluI y Sall, unidas en un vector pWPT digerido de modo de construir un vector lentiviral que exprese cada receptor de antígeno quimérico. Después de que el vector construido con éxito fue confirmado por la identificación y secuenciación digestiva de MluI y Sall, puede ser sometido a un paquete de lentivirus. Como se mencionó anteriormente, el eGFP-F2A-CAR se transcribió en un ARNm, pero finalmente en dos cadenas de péptidos como eGFP y receptor de antígeno quimérico anti-CLD18A2. En la guía del péptido señal CD8a, el receptor de antígeno quimérico anti-CLD18A2 se ubicaría en la membrana celular.

Los vectores obtenidos que comprenden CAR diana son los siguientes:

pWPT-eGFP-F2A-scFv(CLD18A2)-163-Z;

pWPT-eGFP-F2A-scFv(CLD18A2)-163-BBZ;

30 pWPT-eGFP-F2A-scFv(CLD18A2)-175-Z;

pWPT-eGFP-F2A-scFv(CLD 18A2)-175-BBZ.

4. Empaquetamiento de lentivirus por transfección de plásmidos de 293T

Las células HEK-293T (ATCC: CRL-11268) cultivadas hasta 6-10 generaciones se inocularon a una densidad de 6×10^6 en una placa de Petri de 10 cm, se incubaron a 37°C, por debajo del 5% de CO₂ durante la noche, preparándose para la transfección. El medio de cultivo fue DMEM (adquirido de la empresa PAA) con suero de ternera fetal al 10% (adquirido de la empresa PAA). Al día siguiente, el medio de cultivo se reemplazó con DMEM sin suero aproximadamente 2 horas antes de la transfección.

Las etapas de transfección fueron las siguientes:

4.1 20 g de plásmidos vacíos pWPT-eGFP (simulacro de control) o 20 μ g de plásmido del gen diana individual pWPT-eGFP-F2A-CAR, junto con 15 μ g de plásmido de empaquetamiento PAX2 y 6 μ g de plásmido de envoltura pMD2.G se disolvieron en 500 μ L de agua MillQ, y se mezclaron de modo uniforme.

4.2 Se agregaron gota a gota 62 μ L de CaCl₂ 2,5 M (comprado a la empresa Sigma) y se mezcló de manera homogénea a 1200 rpm/min de vórtice.

4.3 Finalmente, 500 mL de 2 x HeBS (NaCl 80 mM, KCl 10 mM, Na₂HPO₄·2H₂O 1,5 mM, glucosa 12 mM, Hepes 50 mM (adquirido de Sigma), pH 7,05, esterilización con un filtro de 0,22 μ m) se agregaron gota a gota y se mezclaron de modo homogéneo a 1200 rpm/min durante 10 s.

4.4 Inmediatamente se añadió a la placa de Petri gota a gota, se agitó ligeramente, se incubó a 37°C y 5% de CO₂. Se cultivó durante 4-6 h, el medio de cultivo se reemplazó con DMEM que contenía suero de ternera fetal al 10%.

La eficacia de transfección (es decir, la proporción de células con fluorescencia verde) se observó al día siguiente de la transfección, y una eficacia de transfección positiva de ~80% indicó un experimento de transfección exitoso. Después de 48 h o 72 h de transfección, se usó un filtro de película de 0,45 μ m (comprado en Millipore Company) para filtrar y recolectar el virus, y se centrifugó por ultracentrifuga Beckman Optima L-100 XP a 28.000 rpm, 4°C durante 2 horas, y el sobrenadante centrifugado se descartó. El precipitado obtenido por centrifugación se

resuspendió con solución de cultivo Quantum 007 (comprada en la empresa PAA) en un volumen de solución madre de 1/10-1/50, se empaquetó en 100 µL/tubo y se congeló a -80°C, esperando la titulación del virus o infección de los linfocitos T.

5. Determinación del título del lentivirus empaquetado con simulacro o eGFP-F2A-CAR

- 5 El día 1, 293 células T se inocularon en una placa de cultivo de 96 pocillos a 1×10^5 /ml, con 100 µL/pocillo, se incubaron a 37°C y 5% de CO₂. El medio de cultivo es medio DMEM que contenía 10% de suero de ternera fetal. El día 2, 50 µL/pocillo de sobrenadante de cultivo se descartaron, y 50 µL/pocillo de medio de cultivo fresco se añadieron, que contenía polibreno a una concentración final de 6 µg/ml, y se incubó a 37°C, 5% de CO₂ durante 30 min. Se añadieron 10 µL/pocillo de solución madre de virus o 1 µL/pocillo de solución de virus concentrada, se diluyó 5 veces, con 4 gradientes, por duplicado. Se incubó a 37°C, 5% de CO₂. Después de 48 horas de infección, la citometría de flujo se usó para detectar eGFP preferiblemente con una tasa positiva al 5-20% del número de células, calculado como título (U/ml) = eficacia positiva x veces de dilución $\times 100 \times 10^4$. Los títulos de los virus mencionados anteriormente empaquetados por el método de transfección con fosfato de calcio, que comprenden MOCK (es decir, el control de vector vacío) y cada eGFP-F2A-CAR estaban a aproximadamente $0,5-2 \times 10^6$ U/mL. El título del virus medido después de la concentración fue de aproximadamente 2×10^7 U/mL.

Ejemplo 4: Infección por lentivirus recombinante de células CTL

Las células mononucleares de sangre periférica humana (proporcionadas por el Shanghai Blood Center) se obtuvieron de sangre periférica humana sana mediante el método de centrifugación en gradiente de densidad. Las células CTL se obtuvieron a partir de células mononucleares de sangre periférica mediante un método de clasificación negativa con perlas magnéticas de células CTL (adquiridas de Stem Cell Technologies), y las células CTL clasificadas se sometieron a citometría de flujo para determinar la pureza de las células CTL. La tasa positiva de CTL $\geq 95\%$ fue preferida para la siguiente operación. Se añadió medio de cultivo de linfocitos Quantum 007 (adquirido de la empresa PAA) a una densidad de aproximadamente 1×10^6 /ml para el cultivo, y se añadió perlas magnéticas (empresa Invitrogen) recubiertas con anticuerpos antiCD3 y CD28, en una relación 1:1 de células:perlas magnéticas, e IL-2 humana recombinante con una concentración final de 100 U/ml (comprada en Shanghai Huaxin High Biotechnology Inc.) para estimular y cultivar durante 24 h. Luego, los lentivirus recombinantes anteriores se usaron para infectar las células CTL a $MOI \approx 5$. Las células infectadas se sometieron a un pasaje a una densidad de 5×10^5 /ml cada dos días, mientras que la IL-2 humana recombinante con una concentración final de 100 U/ml se suplementó con el medio de cultivo de linfocitos.

30 En el octavo día de cultivo, cada expresión de receptor de antígeno quimérico diferente en células CTL infectadas se probó por citometría de flujo. Debido a que eGFP y CAR se coexpresaron, las células detectadas como positivas para eGFP fueron las células positivas que expresaban receptores de antígeno quimérico. Los linfocitos T no infectados se tomaron como control negativo, y la tasa positiva del virus que expresa diferentes receptores de antígeno quimérico que infectan las células CTL se mostró en la tabla 3. Los resultados de la tasa positiva mostraron que el método de infección con lentivirus puede obtener células CAR⁺ CTL con cierta tasa positiva.

TABLA 3

Células CTL transfectadas con el siguiente CAR	Tasa positiva de eGFP de células CTL
Símil (control de vector vacío)	56%
CLD18A2-Z, fusionada y que expresa anticuerpo monocatenario 163	51%
CLD18A2-28BBZ, fusionada y que expresa anticuerpo monocatenario 163	54%
CLD18A2-Z, fusionada y que expresa anticuerpo monocatenario 175	52%
CLD18A2-28BBZ, fusionada y que expresa anticuerpo monocatenario 175	55%

Después de infectar y empaquetar respectivamente con diferentes receptores de antígeno quimérico, las células CTL se pasaron a una densidad celular de 5×10^5 /ml y se contaron, y se añadió IL-2 (concentración final de 100 U/ml) a la solución de cultivo de células de paso. A los 11 días de cultivo, hay una amplificación de aproximadamente 20-40 veces, lo que indica que las células CTL que expresan diferentes receptores de antígeno quimérico tienen la capacidad de amplificarse in vitro, lo que garantiza posteriores pruebas de toxicidad in vitro y experimentos in vivo.

Ejemplo 5: ensayo de efecto de toxicidad in vitro para las células que expresan el receptor de antígeno quimérico

Los materiales utilizados en el experimento de toxicidad in vitro son los siguientes:

Las líneas celulares 293T y de cáncer gástrico como se muestra en la tabla 4 se usaron como células diana. Las células efectoras eran CTL que se cultivaron in vitro durante 12 días como se verificó en el ejemplo 4, y FACS confirmó que eran positivas para la expresión del receptor de antígeno quimérico (notado como CAR⁺, receptor de antígeno quimérico positivo). Las relaciones de efecto:diana, en diferentes condiciones, fueron 3:1, 1:1 y 1:3, el número de células diana fue de 10000/pocillo. Según una relación diferente de efecto:diana, cada grupo estableció cinco pocillos repetidos, y se tomó en cuenta el valor promedio en 5 pocillos repetidos. El tiempo de detección fue la hora 18.

Cada grupo de experimento y cada grupo de control fueron los siguientes:

10 Cada grupo de experimento: cada célula diana + CTL que expresa diferentes receptores de antígeno quimérico,

Grupo de control 1: célula diana con liberación máxima de LDH

Grupo de control 2: célula diana con liberación espontánea de LDH

Grupo de control 3: células efectoras con liberación espontánea de LDH.

15 Método de detección: Realizado con el kit de ensayo de citotoxicidad no radioactiva CytoTox 96 (empresa Promega). El método era un método de detección basado en el método colorimétrico, y puede reemplazar el ensayo de liberación de ⁵¹Cr. El ensayo CytoTox 96® determina cuantitativamente el lactato deshidrogenasa (LDH). La LDH es una enzima citoplasmática estable, se libera durante la lisis celular, cuyo perfil de liberación es sustancialmente el mismo que el perfil de liberación de ⁵¹Cr en el análisis de radiactividad. La LDH liberada estaría en el sobrenadante del cultivo y puede detectarse mediante una reacción enzimática acoplada de 30 minutos. En la reacción enzimática, la LDH puede transferir una sal de tetrazol (INT) en formazano rojo. El producto rojo es directamente proporcional al número de células lisadas. Remitirse a las instrucciones del kit de ensayo de citotoxicidad no radioactiva CytoTox 96 para obtener más detalles.

La fórmula de cálculo de citotoxicidad es la siguiente:

$$\% \text{ de citotoxicidad} = \frac{\text{grupo experimental} - \text{grupo de control 2} - \text{grupo de control 3}}{\text{grupo de control 1} - \text{grupo de control 2}} \times 100\%$$

25 Como se muestra específicamente en la tabla 4 y la tabla 5, los CTL actuales que expresan el receptor de antígeno quimérico (anticuerpo monocatenario 163 o 175 que expresa fusión) CLD18A2-Z CAR⁺ y CLD18A2-28BBZ CAR⁺ tienen un efecto destructor significativo en las células 293T con alta expresión de CLD18A2, pero no en las células 293T que expresan CLD18A1, lo que indica que pueden matar selectivamente las células con CLD18A2. Además, los CTL actuales que expresan el receptor de antígeno quimérico CLD18A2-Z CAR⁺ y CLD18A2-28BBZ CAR⁺ también tienen un efecto destructor significativo en dos líneas celulares de cáncer gástrico BGC823 y NCI-N87 con alta expresión de CLD18A2 (ver tabla 4 y tabla 5), y mostró una dependencia de la relación efecto:diana, es decir, cuanto mayor es la relación de efecto:diana, mayor es la citotoxicidad. Sin embargo, no hubo citotoxicidad para BGC-823 y NCI-N87 que no expresan CLD18A2.

35 Los datos de la dependencia de efecto-diana indicaron, además, que el CTL presente del receptor de antígeno quimérico anti-CLD18A2 mostró citotoxicidad específica para las células de cáncer gástrico con alta expresión de CLD18A2.

40 Comparativamente, el CTL transfectado por el plásmido MOCK (vector plasmídico vacío pWPT-eGFP que no porta CLD18A2-CAR) mostró una citotoxicidad bastante baja en las 3 líneas celulares anteriores con una alta expresión de CLD18A2. Los datos de citotoxicidad para líneas celulares con alta expresión de CLD18A2 exhiben una diferencia significativa entre los CTL transfectados por el plásmido MOCK y los CTL que expresan el presente receptor de antígeno quimérico anti-CLD18A2.

45 Los resultados anteriores mostraron que el receptor de antígeno quimérico construido al elegir el anticuerpo de cadena simple contra CLD18A2 puede matar selectivamente las células diana con alta expresión de CLD18A2. Además, a partir de los datos de citotoxicidad, CAR T de CLD18A2-28BBZ tiene una citotoxicidad más fuerte para las células que expresan CLD18A2 que CART de CLD18A2-Z.

TABLA 4. Citotoxicidad de las células T CAR que expresan el anticuerpo monocatenario 163

CITOTOXICIDAD (%)	CLD18A2-28BBZ			CLD18A2-Z			MOCK		
	diferente relación de efecto:diana			diferente relación de efecto:diana			diferente relación de efecto:diana		
	3:1	1:1	1:3	3:1	1:1	1:3	3:1	1:1	1:3
293T-CLD18A1	8,9	7,3	6,2	5,2	4,8	4,3	3,1	2,3	2,6
293T-CLD18A2	50	38,9	16,7	30,4	20,8	13,6	5,4	4,4	4,5
BGC-823-CLD18A2	62,7	44,7	16,1	38,9	25,8	10,5	5,7	4,8	4,3
BGC-823	5,8	5,5	4,8	5,2	4,6	5,5	2,8	3,5	3,8
NCI-N87-CLD18A2	61,3	52,5	13,6	42,8	26,3	7,7	6,1	5,2	4,7
NCI-N87	4,6	5,1	5,9	3,6	3,5	4,5	3,9	4,2	3,1

TABLA 5. Citotoxicidad de células CART que expresan el anticuerpo monocatenario 175

Citotoxicidad (%)	CLD18A2-28BBZ			CLD18A2-Z			MOCK		
	diferente relación de efecto:diana			diferente relación de efecto:diana			diferente relación de efecto:diana		
	3:1	1:1	1:3	3:1	1:1	1:3	3:1	1:1	1:3
293T-CLD18A1	8,6	7,3	6	5,4	4,8	2,7	2,4	1,5	1,4
293T-CLD18A2	57,5	41	15	35,2	25,7	13,2	5,6	2,3	1,6
BGC-823-CLD18A2	69,4	45,4	17,2	43,5	24,6	8,7	9,2	6,9	3,4
BGC-823	4,5	4,8	5,2	3,8	3,9	4,5	2,5	3,5	2,8
NCI-N87-CLD18A2	68,2	44,2	16,3	41,5	28,2	10,2	10,1	8,2	3,3
NCI-N87	5,2	2,9	3,9	4,2	3,3	4,5	2,5	3,2	4,3

5 Análisis

En la actualidad, las células T CAR se han convertido en un medio terapéutico potencial. Sin embargo, muchos tumores, como el cáncer gástrico, no tienen informes sobre la terapia con células T CAR. Hay investigaciones que demuestran que CLD18A2 puede ser un marcador específico de tejido estomacal, por lo tanto, también puede ser un objetivo terapéutico para tumores como el cáncer de estómago. Sin embargo, en la actualidad, solo el anticuerpo monoclonal se ha considerado como el fármaco candidato con CLD18A2 como el objetivo terapéutico, y aún no se sabe si puede usarse con éxito para el tratamiento tumoral correspondiente o no. Por lo tanto, es necesario encontrar nuevos medios de tratamiento. Considerando la especificidad tisular de CLD18A2, la presente invención contempla que si la terapia dirigida se puede realizar con células CART, se puede esperar una nueva formulación antitumoral. Sin embargo, se sabe que el antígeno CLD18A2 es una proteína estrechamente conectada, no se sabe si puede entrar en contacto con las células T CAR e inducir la muerte de las células diana correspondientes. Además, dado que la conformación espacial de la proteína es muy crucial para toda la proteína, muchos anticuerpos monoclonales pierden su actividad o especificidad de unión al antígeno cuando evolucionan a anticuerpos de cadena simple. Afortunadamente, los inventores encontraron que dos anticuerpos de cadena simple (163 y 175) retuvieron la especificidad de unión al antígeno del anticuerpo monoclonal. Investigaciones posteriores muestran que las células T CAR compuestas de estos dos anticuerpos de cadena simple retuvieron el efecto selectivo de destrucción en las células positivas para CLD18A2. Los resultados de la invención mostraron que CLD18A2 realmente puede ser un objetivo de terapia con células T CAR; la célula T CAR contra CLD18A2 es un nuevo medio candidato para el tratamiento del tumor candidato.

LISTADO DE SECUENCIAS

25 <110> CARSGEN THERAPEUTICS LTD.

ES 2 746 555 T3

<120> CÉLULA EFECTORA INMUNOLÓGICA DE CLD18A2 DIRIGIDO, SU MÉTODO DE PREPARACIÓN Y SU USO

<130> 145023PCWO

<160> 24

5 <170> Versión de patente 3.3

<210> 1

<211> 727

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<221> características_misceláneas

<223> Secuencia de ácidos nucleicos que codifica el anticuerpo monocatenario 125 CLD18A2

<400> 1

```

gctagcacag gttcagctgc agcagctctgg agctgagctg gcgaggcccg gggcttcagt      60
gaagctgtcc tgcaaggctt ctggctacac cttcactgac tactatataa actgggtgaa      120
gcagaggact ggacagggcc ttgagtggat tggagagatt taccctggaa gtggaataac      180
ttactacaat gagaagttca agggcaagge cacactgact gcagacaaat cctccagcac      240
agcctacatg cagctcagca gcctgacatc tgaggactct gcagtctatt tctgtgcaag      300
atcgtatggt gcctttgact actggggcca aggcaccact ctcacagtct cctcaggtgg      360
aggcggttca ggcggaggtg gctctggcgg tggcggatcg gacattgtga tgaccagtc      420
tcaaaaattc atgtccacat cagtaggaga cagggtcagc atcacctgca aggccagtca      480
gaatgttcgt actgctgtag cctgggtatca acagaaacca gggcagtctc ctaaagcact      540
gatttacttg gcatccaacc ggcacactgg agtccctgat cgcttcacag gcagtggatc      600
tgggacagat ttactctca ccattagcaa tgtgcaatct gaagacctgg cagattatct      660
ctgtctgcaa cattggaatt atcctctgac gttcgggtgga ggcaccaagc tggaaatcaa      720
aggatcc                                           727
    
```

15 <210> 2

<211> 238

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <221> CARACTERÍSTICAS_MISCELÁNEAS

<223> Secuencia de aminoácidos que codifica el anticuerpo monocatenario 125 CLD18A2

<400> 2

ES 2 746 555 T3

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala
 1 5 10 15

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

Tyr Ile Asn Trp Val Lys Gln Arg Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Glu Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95

Ala Arg Ser Tyr Gly Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu
 100 105 110

Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 115 120 125

Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser Thr
 130 135 140

Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val
 145 150 155 160

Arg Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys
 165 170 175

Ala Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg
 180 185 190

Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn
 195 200 205

Val Gln Ser Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Leu Gln His Trp Asn
 210 215 220

Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 225 230 235

<210> 3

<211> 751

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> características_misceláneas

ES 2 746 555 T3

<223> Secuencia de ácidos nucleicos que codifica el anticuerpo monocatenario 165 CLD18A2

<400> 3

```
gctagcacag atccagttgg tgcagtctgg acctgagctg aagaagcctg gagagacagt      60
caagatctcc tgcaaggctt ctgggtatac cttcacaac tatggaatga actgggtgaa      120
gcaggctcca ggaaagggtt taaagtggat gggctggata aacaccaaca ctggagagcc      180
aacctatgct gaagagttca agggacggtt tgccttctct ttggaaacct ctgccagcac      240
tgcctatttg cagatcaaca acctcaaaaa tgaggacacg gctacatatt tctgtgcaag      300
actgggtttt ggtaatgcta tggactactg gggccaagga acctcagtca ccgctcctc      360
agggtggaggc ggttcaggcg gaggtggctc tggcgggtggc ggatcggaca ttgtgatgac      420
acagtctcca tcctccctga ctgtgacagc aggagagaag gtcactatga gctgcaagtc      480
cagtcagagt ctgttaaaca gtggaaatca aaagaactac ttgacctggt accagcagaa      540
accagggcag cctcctaaac tgttgatcta ctgggcatcc actaggggat ctgggggtccc      600
tgatcgcttc acaggcagtg gatctggaac agatttcact ctcaccatca gcagtgtgca      660
ggctgaagac ctggcagttt attactgtca gaatgattat agttatccgc tcacgttcgg      720
tgctgggacc aagctggagc tgaaagaatt c                                          751
```

<210> 4

5 <211> 246

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> CARACTERÍSTICAS_MISCELÁNEAS

10 <223> Secuencia de aminoácidos que codifica el anticuerpo monocatenario 163 CLD18A2

<400> 4

ES 2 746 555 T3

Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Glu Glu Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg Leu Gly Phe Gly Asn Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
115 120 125

Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu
130 135 140

Thr Val Thr Ala Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln
145 150 155 160

Ser Leu Leu Asn Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln
165 170 175

Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr
180 185 190

Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr
195 200 205

Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val
210 215 220

Tyr Tyr Cys Gln Asn Asp Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly
225 230 235 240

Thr Lys Leu Glu Leu Lys
245

ES 2 746 555 T3

<210> 5

<211> 751

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<221> características_miscláneas

<223> Secuencia de ácidos nucleicos que codifica el anticuerpo monocatenario 175 CLD18A2

<400> 5

```

gctagcacag gtccaactgc agcagcctgg ggctgagctg gtgaggcctg gggcttcagt      60
gaagctgtcc tgcaaggctt ctggctacac cttcaccagc tactggataa actgggtgaa      120

gcagagggcct ggacaaggcc ttgagtggat cggaaatatt tacccttctg atagttatac      180
taactacaat caaaagttca aggacaaggc cacattgact gtagacaaat cctccagcac      240
agcctacatg cagctcagca gcccgacatc tgaggactct gcggtctatt actgtacaag      300
atcgtggagg ggtaactcct ttgactactg gggccaaggc accactctca cagtctcctc      360
aggtggaggc ggttcaggcg gaggtggctc tggcgggtggc ggatcggaca ttgtgatgac      420
acagtctcca tcctccctga ctgtgacagc aggagagaag gtcactatga gctgcaagtc      480
cagtcagagt ctgttaaaca gtggaaatca aaagaactac ttgacctggt accagcagaa      540
accagggcag cctcctaaac tgttgatcta ctgggcatcc actagggaat ctgggggtccc      600
tgatcgcttc acaggcagtg gatctggaac agatttcact ctcacatca gcagtgtgca      660
ggctgaagac ctggcagttt attactgtca gaatgattat agttatccat tcacgttcgg      720
ctcggggaca aagttggaaa taaaagaatt c      751
    
```

10 <210> 6

<211> 246

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <221> CARACTERÍSTICAS_MISCELÁNEAS

<223> Secuencia de aminoácidos que codifica el anticuerpo monocatenario 175 CLD18A2

<400> 6

ES 2 746 555 T3

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
 1 5 10 15

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

Trp Ile Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Asn Ile Tyr Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Pro Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Thr Arg Ser Trp Arg Gly Asn Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 115 120 125

Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu
 130 135 140

Thr Val Thr Ala Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln
 145 150 155 160

Ser Leu Leu Asn Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln
 165 170 175

Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr
 180 185 190

Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr
 195 200 205

Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val
 210 215 220

Tyr Tyr Cys Gln Asn Asp Tyr Ser Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly
 225 230 235 240

Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 245

<210> 7
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <221> características_misceláneas
 <223> Cebador
 <400> 7
 tgctccacgc cgccaggccg cagatccagt tgggcagtc tg 42
 10 <210> 8
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <221> características_misceláneas
 <223> Cebador
 <400> 8
 cgcggcgctg gcgtcgtggt ttcagctcc agcttggtcc ca 42
 <210> 9
 20 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> características_misceláneas
 25 <223> Cebador
 <400> 9
 tgctccacgc cgccaggccg caggccaac tgcagcagcc 40
 <210> 10
 <211> 43
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> características_misceláneas
 <223> Cebador
 35 <400> 10
 cgcggcgctg gcgtcgtggt tttatttcc aactttgtcc ccg 43

<210> 11
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <221> características_misceláneas
 <223> Cebador
 <400> 11
 gcaggggaaa gaatagtaga ca 22
 10 <210> 12
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <221> características_misceláneas
 <223> Cebador
 <400> 12
 cggcctggcg gcgtaggagca 20
 <210> 13
 20 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> características_misceláneas
 25 <223> Cebador
 <400> 13
 accacgacgc cagcgccgcg 20
 <210> 14
 <211> 22
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> características_misceláneas
 <223> Cebador
 35 <400> 14

ES 2 746 555 T3

tagcgtaaaa ggagcaacat ag 22

<210> 15

<211> 2183

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> características_misceláneas

<223> Secuencia de ácidos nucleicos que codifica la proteína receptora de antígeno quimérico CLD18A2-163-Z

<400> 15

aagcttacgc	gtcctagcgc	taccggtcgc	caccatggtg	agcaagggcg	aggagctggt	60
caccggggtg	gtgcccattc	tggtcgagct	ggacggcgac	gtaaaccggcc	acaagttag	120
cgtgtccggc	gagggcgagg	gcatgccac	ctacggcaag	ctgaccctga	agttcatctg	180
caccaccggc	aagctgcccg	tgccctggcc	caccctcgtg	accaccctga	cctacggcgt	240
gcagtgtctc	agccgtacc	ccgaccacat	gaagcagcac	gacttcttca	agtccgcat	300
gcccgaggc	tacgtccagg	agcgcaccat	cttcttcaag	gacgacggca	actacaagac	360
ccgcgccgag	gtgaagttag	agggcgacac	cctggtgaac	cgcatcgagc	tgaagggcat	420
cgacttcaag	gaggacggca	acatcctggg	gcacaagctg	gagtacaact	acaacagcca	480
caacgtctat	atcatggccg	acaagcagaa	gaacggcatc	aaggtgaact	tcaagatccg	540
ccacaacatc	gaggacggca	gcgtgcagct	cgccgaccac	taccagcaga	acacccccat	600
cggcgacggc	cccgtgctgc	tgcccgacaa	ccactacctg	agcaccagc	ccgccctgag	660
caaagacccc	aacgagaagc	gcatcacat	ggtcctgctg	gagttcgtga	ccgccgccgg	720
gatcactctc	ggcatggacg	agctgtacaa	gtccggagtg	aaacagactt	tgaattttga	780
ccttctgaag	ttggcaggag	acgttgagtc	caaccctggg	cccatggcct	taccagtgtg	840
cgccttgctc	ctgccgctgg	ccttgctgct	ccacgccgcc	aggccgcaga	tccagttggt	900

10

ES 2 746 555 T3

gcagtctgga cctgagctga agaagcctgg agagacagtc aagatctcct gcaaggcttc 960
 tgggtatacc ttcacaaact atggaatgaa ctgggtgaag caggctccag gaaagggttt 1020
 aaagtggatg ggctggataa acaccaacac tggagagcca acctatgctg aagagttcaa 1080
 gggacggttt gccttctctt tggaaacctc tgccagcact gcctatttgc agatcaacaa 1140
 cctcaaaaat gaggacacgg ctacatattt ctgtgcaaga ctgggttttg gtaatgctat 1200
 ggactactgg ggtcaaggaa cctcagtcac cgtctcctca ggtggaggcg gttcaggcgg 1260
 agtggtctct ggcggtggcg gatcggacat tgtgatgaca cagtctccat cctccctgac 1320
 tgtgacagca ggagagaagg tcaactatgag ctgcaagtcc agtcagagtc tgttaaacag 1380
 tggaaatcaa aagaactact tgacctggtc ccagcagaaa ccagggcagc ctcttaaact 1440
 gttgatctac tgggcatcca ctagggaatc tggggtcctt gatcgcttca caggcagtgg 1500
 atctggaaca gatttcactc tcaccatcag cagtgtgcag gctgaagacc tggcagttta 1560
 ttactgtcag aatgattata gttatccgct cacgttcggt gctgggacca agctggagct 1620
 gaaaaccacg acgccagcgc cgcgaccacc aacaccggcg cccaccatcg cgtcgcagcc 1680
 cctgtccctg cgcccagagg cgtgccggcc agcggcgggg ggcgcagtc acacgagggg 1740
 gctggacttc gcctgtgata tctacatctg ggcgcccttg gccgggactt gtggggctct 1800
 tctcctgtca ctggttatca ccagagtga gttcagcagg agcgcagacg cccccgcgta 1860
 ccagcagggc cagaaccagc tctataacga gctcaatcta ggacgaagag aggagtacga 1920
 tgttttggac aagagacgtg gccgggaccc tgagatgggg ggaaagccgc agagaaggaa 1980
 gaaccctcag gaaggcctgt acaatgaact gcagaaagat aagatggcgg aggcctacag 2040
 tgagattggg atgaaaggcg agcgcgggag gggcaagggg cacgatggcc tttaccaggg 2100
 tctcagtaca gccaccaagg acacctacga cgccttcac atgcaggccc tgccccctcg 2160
 ctaggtcgac ctcgagggaa ttc 2183

<210> 16

<211> 2450

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> características_misceláneas

<223> Secuencia de ácidos nucleicos que codifica la proteína receptora de antígeno quimérico CLD18A2-163-28BBZ

10 <400> 16

ES 2 746 555 T3

aagcttacgc gtcctagcgc taccggtcgc caccatggtg agcaagggcg aggagctgtt 60
caccggggtg gtgcccatcc tggtcgagct ggacggcgac gtaaaccggcc acaagttcag 120
cgtgtccggc gagggcgagg gcgatgccac ctacggcaag ctgaccctga agttcatctg 180

ES 2 746 555 T3

caccaccggc aagctgcccg tgccctggcc caccctcgtg accaccctga cctacggcgt 240
 gcagtgttc agccgctacc ccgaccacat gaagcagcac gacttcttca agtccgccat 300
 gcccgaaagg tacgtccagg agcgcacat cttcttcaag gacgacggca actacaagac 360
 ccgcgccgag gtgaagtctg agggcgacac cctggtgaac cgcatcgagc tgaagggcat 420
 cgacttcaag gaggacggca acatcctggg gcacaagctg gagtacaact acaacagcca 480
 caacgtctat atcatggccg acaagcagaa gaacggcatc aaggtgaact tcaagatccg 540
 ccacaacatc gaggacggca gcgtgcagct cgcggaccac taccagcaga acacccccat 600
 cggcgacggc cccgtgctgc tgcccgacaa ccactacctg agcaccctagt ccgccctgag 660
 caaagacccc aacgagaagc gcgatcacat ggtcctgctg gatttcgtga ccgccgccgg 720
 gatcactctc ggcatggacg agctgtacaa gtccggagtg aacagactt tgaattttga 780
 cttctgaag ttggcaggag acgttgagtc caaccctggg cccatggcct taccagtgc 840
 cgccttgctc ctgccgctgg cettgctgct ccacgccgcc aggccgcaga tccagttggt 900
 gcagtctgga cctgagctga agaagcctgg agagacagtc aagatctcct gcaaggcttc 960
 tgggtatacc ttcacaaact atggaatgaa ctgggtgaag caggctccag gaaagggttt 1020
 aaagtggatg ggctggataa acaccaacac tggagagcca acctatgctg aagagttcaa 1080
 gggacggttt gccttctctt tggaaacctc tgccagcact gcctatttgc agatcaacaa 1140
 cctcaaaaat gaggacacgg ctacatattt ctgtgcaaga ctgggttttg gtaatgctat 1200
 ggactactgg ggtcaaggaa cctcagtcac cgtctcctca ggtggaggcg gttcaggcgg 1260
 aggtggctct gccggtggcg gatcggacat tgtgatgaca cagtctccat cctccctgac 1320
 tgtgacagca ggagagaagg tcactatgag ctgcaagtcc agtcagagtc tgtaaacag 1380
 tggaaatcaa aagaactact tgacctggtg ccagcagaaa ccagggcagc ctctaaact 1440
 gttgatctac tgggcatcca ctagggaatc tggggtccct gatcgcttca caggcagtgg 1500
 atctggaaca gatttctctc tcacatcag cagtgtgcag gctgaagacc tggcagttta 1560
 ttactgtcag aatgattata gttatccgct cacgttcggt gctgggacca agctggagct 1620
 gaaaaccagc acgccagcgc cgcgaccacc aacaccggcg cccaccatcg cgtcgagcc 1680
 cctgtccctg cgcagagg cggtccggcc agcggcgggg ggccagtgac acacgagggg 1740
 gctggacttc gcctgtgatt tttgggtgct ggtggtggtt ggtggagtcc tggcttgcta 1800
 tagcttgcta gtaacagtgg cttttattat tttctgggtg aggagtaaga ggagcaggct 1860
 cctgcacagt gactacatga acatgactcc ccgcccccc ggccaaccc gcaagcatta 1920
 ccagccctat gccccaccac gcgacttcgc agcctatcgc tccaaacggg gcagaaagaa 1980
 actcctgtat atattcaaac aaccatttat gagaccagta caaactactc aagaggaaga 2040

ES 2 746 555 T3

tggctgtagc tgccgatttc cagaagaaga agaaggagga tgtgaactga gagtgaagtt 2100
cagcaggagc gcagacgccc ccgcgtacca gcagggccag aaccagctct ataacgagct 2160
caatctagga cgaagagagg agtacgatgt tttggacaag agacgtggcc gggaccctga 2220
gatgggggga aagccgcaga gaaggaagaa ccctcaggaa ggcctgtaca atgaactgca 2280
gaaagataag atggcggagg cctacagtga gattgggatg aaaggcgagc gccggagggg 2340
caaggggcac gatggccttt accagggctc cagtacagcc accaaggaca cctacgacgc 2400
ccttcacatg caggccctgc cccctcgcta ggtcgacctc gagggaattc 2450

<210> 17

<211> 2183

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> características_misceláneas

<223> Secuencia de ácidos nucleicos que codifica la proteína receptora de antígeno quimérico CLD18A2-175-Z

<400> 17

ES 2 746 555 T3

aagcttacgc gtcctagcgc taccggtcgc caccatggtg agcaagggcg aggagctggt 60
caccggggtg gtgcccatcc tggtcgagct ggacggcgac gtaaaccggcc acaagttcag 120
cgtgtccggc gagggcgagg gcgatgccac ctacggcaag ctgaccctga agttcatctg 180
caccaccggc aagctgcccg tgccctggcc caccctcgtg accaccctga cctacggcgt 240
gcagtgcttc agccgctacc ccgaccacat gaagcagcac gacttcttca agtccgccat 300
gcccgaaaggc tacgtccagg agcgcaccat cttcttcaag gacgacggca actacaagac 360
ccgcgccgag gtgaagtctg agggcgacac cctggtgaac cgcacgagc tgaagggcat 420
cgacttcaag gaggacggca acatcctggg gcacaagctg gagtacaact acaacagcca 480
caacgtctat atcatggccg acaagcagaa gaacggcatc aaggtgaact tcaagatccg 540
ccacaacatc gaggacggca gcgtgcagct cgccgaccac taccagcaga acacccccat 600
cggcgacggc cccgtgctgc tgcccgacaa cctactcctg agcaccagc cgcacctgag 660
caaagacccc aacgagaagc gcgatcacat ggtcctgctg gagttcgtga ccgccgccgg 720
gatcactctc ggcattggacg agctgtacaa gtccggagtg aacagactt tgaattttga 780
ccttctgaag ttggcaggag acgttgagtc caaccctggg cccatggcct taccagtgac 840
cgccttgctc ctgccgctgg ccttgctgct ccacgccgcc aggccgcagg tccaactgca 900
gcagcctggg gctgagctgg tgaggcctgg ggcttcagtg aagctgtcct gcaaggcttc 960
tggctacacc ttcaccagct actggataaa ctgggtgaag cagaggcctg gacaaggcct 1020
tgagtggatc ggaaatattt atccttctga tagttatact aactacaatc aaaagttcaa 1080

ES 2 746 555 T3

ggacaaggcc acattgactg tagacaaatc ctccagcaca gcctacatgc agctcagcag 1140
 cccgacatct gaggactctg cggctctatta ctgtacaaga tctgtggaggg gtaactcctt 1200
 tgactactgg ggccaaggca ccaactctcac agtctcctca ggtggaggcg gttcaggcgg 1260
 aggtggctct ggcggtggcg gatcggacat tgtgatgaca cagtctccat cctccctgac 1320
 tgtgacagca ggagagaagg tcactatgag ctgcaagtcc agtcagagtc tgttaaacag 1380
 tggaaatcaa aagaactact tgacctgcta ccagcagaaa ccagggcagc ctccctaaact 1440
 gttgatctac tgggcatcca ctagggaatc tggggctcct gatcgcttca caggcagtgg 1500
 atctggaaca gatttcactc tcaccatcag cagtgtgcag gctgaagacc tggcagttta 1560
 ttactgtcag aatgattata gttatccatt cacgttcggc tcggggacaa agttggaat 1620
 aaaaaccacg acgccagcgc cgcgaccacc aacaccggcg cccaccatcg cgtcgcagcc 1680
 cctgtccctg cgcccagagg cgtgccggcc agcggcgggg ggccgagtc acacgagggg 1740
 gctggacttc gcctgtgata tctacatctg ggcgcccttg gccgggactt gtggggctcct 1800
 tctcctgtca ctggttatca ccagagtga gttcagcag agcgcagacg cccccgcgta 1860
 ccagcagggc cagaaccagc tctataacga gctcaatcta ggacgaagag aggagtacga 1920
 tgttttggac aagagacgtg gccgggaccc tgagatgggg ggaaagccgc agagaaggaa 1980
 gaaccctcag gaaggcctgt acaatgaact gcagaaagat aagatggcgg aggcctacag 2040
 tgagattggg atgaaaggcg agcgcgggag gggcaagggg cacgatggcc tttaccaggg 2100
 tctcagtaca gccaccaagg acacctacga cgccttcac atgcaggccc tgccccctcg 2160
 ctaggtcagc ctcgagggaa ttc 2183

<210> 18

<211> 2450

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> características_miscláneas

<223> Secuencia de ácidos nucleicos que codifica la proteína receptora de antígeno quimérico CLD18A2-175-28BBZ

10 <400> 18

ES 2 746 555 T3

aagcttacgc gtcctagcgc taccggtcgc caccatggtg agcaagggcg aggagctggt	60
caccgggggtg gtgcccaccc tggtcgagct ggacggcgac gtaaaccggcc acaagttcag	120
cgtgtccggc gagggcgagg gcgatgccac ctacggcaag ctgaccctga agttcatctg	180
caccaccggc aagctgcccg tggcctggcc caccctcgtg accaccctga cctacggcgt	240
gcagtgcttc agccgctacc ccgaccacat gaagcagcac gacttcttca agtccgcat	300
gcccgaaggc tacgtccagg agcgcacat cttcttcaag gacgacggca actacaagac	360

ES 2 746 555 T3

ccgcgccgag gtgaagttcg agggcgacac cctggtgaac cgcacgcgagc tgaagggcat 420
 cgacttcaag gaggacggca acatcctggg gcacaagctg gagtacaact acaacagcca 480
 caacgtctat atcatggccg acaagcagaa gaacggcatc aaggtgaact tcaagatccg 540
 ccacaacatc gaggacggca gcgtgcagct cgccgaccac taccagcaga acacccccat 600
 cggcgacggc cccgtgctgc tgcccgacaa ccactacctg agcaccagc cgcacctgag 660
 caaagacccc aacgagaagc gcgatcacat ggtcctgctg gagttcgtga ccgcccggcg 720
 gatcactctc ggcatggacg agctgtacaa gtccggagtg aacagactt tgaattttga 780
 ctttctgaag ttggcaggag acgttgagtc caaccctggg cccatggcct taccagtgc 840
 cgccttgctc ctgccgctgg ccttgctgct ccacgcggcc aggccgcagg tccaactgca 900
 gcagcctggg gctgagctgg tgaggcctgg ggcttcagtg aagctgtcct gcaaggcttc 960
 tggctacacc ttaccagct actggataaa ctgggtgaag cagaggcctg gacaaggcct 1020
 tgagtggatc ggaaatattt atccttctga tagttatact aactacaatc aaaagttcaa 1080
 ggacaaggcc acattgactg tagacaaatc ctccagcaca gcctacatgc agctcagcag 1140
 cccgacatct gaggactctg cggcttatta ctgtacaaga tcgtggaggg gtaactcctt 1200
 tgactactgg ggccaaggca ccactctcac agtctcctca ggtggaggcg gttcaggcgg 1260
 aggtggctct ggcggtggcg gatcggacat tgtgatgaca cagtctccat cctccctgac 1320
 tgtgacagca ggagagaagg tcactatgag ctgcaagtcc agtcagagtc tgttaaacag 1380
 tggaaatcaa aagaactact tgacctggtg ccagcagaaa ccagggcagc ctccctaaact 1440
 gttgatctac tgggcatcca ctaggaatc tggggtcctt gatcgcttca caggcagtg 1500
 atctggaaca gatttctctc tcaccatcag cagtgtgcag gctgaagacc tggcagttta 1560
 ttactgtcag aatgattata gttatccatt cacgttcggc tcggggacaa agttggaaat 1620
 aaaaaccacg acgccagcgc cgcgaccacc aacaccggcg cccaccatcg cgtcgcagcc 1680
 cctgtccctg cggccagagg cgtgccggcc agcggcgggg ggcgcagtc acacgagggg 1740
 gctggacttc gcctgtgatt tttgggtgct ggtggtggtt ggtggagtcc tggcttgcta 1800
 tagcttgcta gtaacagtgg cctttattat tttctgggtg aggagtaaga ggagcaggct 1860
 cctgcacagt gactacatga acatgactcc ccgcccggcc gggccaacc gcaagcatta 1920
 ccagccctat gccccaccac gcgacttcgc agcctatcgc tccaaacggg gcagaaagaa 1980
 actcctgtat atattcaaac aaccatttat gagaccagta caaactactc aagaggaaga 2040
 tggctgtagc tgccgatttc cagaagaaga agaaggagga tgtgaactga gagtgaagtt 2100
 cagcaggagc gcagacgccc ccgcgtacca gcagggccag aaccagctct ataacgagct 2160
 caatctagga cgaagagagg agtacgatgt tttggacaag agacgtggcc gggaccctga 2220
 gatgggggga aagccgcaga gaaggaagaa ccctcaggaa ggctgtaca atgaactgca 2280

ES 2 746 555 T3

gaaagataag atggcggagg cctacagtga gattgggatg aaaggcgagc gccggagggg 2340
caaggggcac gatggccttt accaggtct cagtacagcc accaaggaca cctacgacgc 2400
ccttcacatg caggccctgc cccctcgcta ggtcgacctc gagggaattc 2450

<210> 19

<211> 709

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> CARACTERÍSTICAS_MISCELÁNEAS

<223> Secuencia de ácidos nucleicos que codifica la proteína receptora de antígeno quimérico CLD18A2-163-Z

<400> 19

ES 2 746 555 T3

Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu
 1 5 10 15

Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly
 20 25 30

Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile
 35 40 45

Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr
 50 55 60

Leu Thr Tyr Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys
 65 70 75 80

Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu
 85 90 95

Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu
 100 105 110

Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly
 115 120 125

Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr
 130 135 140

Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn
 145 150 155 160

Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser
 165 170 175

ES 2 746 555 T3

Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly
 180 185 190

Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu
 195 200 205

Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe
 210 215 220

Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys Ser
 225 230 235 240

Gly Val Lys Gln Thr Leu Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp
 245 250 255

Val Glu Ser Asn Pro Gly Pro Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu
 260 265 270

Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu His Ala Ala Arg Pro Gln Ile Gln Leu
 275 280 285

Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile
 290 295 300

Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly Met Asn Trp
 305 310 315 320

Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met Gly Trp Ile Asn
 325 330 335

Thr Asn Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Glu Glu Phe Lys Gly Arg Phe
 340 345 350

Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Asn
 355 360 365

Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Leu Gly
 370 375 380

Phe Gly Asn Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val
 385 390 395 400

Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 405 410 415

Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val Thr Ala

ES 2 746 555 T3

			420					425					430			
Gly	Glu	Lys	Val	Thr	Met	Ser	Cys	Lys	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Leu	Asn	
		435					440					445				
Ser	Gly	Asn	Gln	Lys	Asn	Tyr	Leu	Thr	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	
	450					455					460					
Gln	Pro	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Trp	Ala	Ser	Thr	Arg	Glu	Ser	Gly	
465					470					475					480	
Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Thr	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	
				485						490				495		
Thr	Ile	Ser	Ser	Val	Gln	Ala	Glu	Asp	Leu	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	
			500					505						510		
Asn	Asp	Tyr	Ser	Tyr	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Ala	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	
		515					520					525				
Leu	Lys	Thr	Thr	Thr	Pro	Ala	Pro	Arg	Pro	Pro	Thr	Pro	Ala	Pro	Thr	
	530					535					540					
Ile	Ala	Ser	Gln	Pro	Leu	Ser	Leu	Arg	Pro	Glu	Ala	Cys	Arg	Pro	Ala	
545					550					555					560	
Ala	Gly	Gly	Ala	Val	His	Thr	Arg	Gly	Leu	Asp	Phe	Ala	Cys	Asp	Ile	
				565					570					575		
Tyr	Ile	Trp	Ala	Pro	Leu	Ala	Gly	Thr	Cys	Gly	Val	Leu	Leu	Leu	Ser	
			580					585					590			
Leu	Val	Ile	Thr	Arg	Val	Lys	Phe	Ser	Arg	Ser	Ala	Asp	Ala	Pro	Ala	
		595					600					605				
Tyr	Gln	Gln	Gly	Gln	Asn	Gln	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Asn	Leu	Gly	Arg	
	610					615					620					
Arg	Glu	Glu	Tyr	Asp	Val	Leu	Asp	Lys	Arg	Arg	Gly	Arg	Asp	Pro	Glu	
625					630						635				640	
Met	Gly	Gly	Lys	Pro	Gln	Arg	Arg	Lys	Asn	Pro	Gln	Glu	Gly	Leu	Tyr	
				645					650					655		
Asn	Glu	Leu	Gln	Lys	Asp	Lys	Met	Ala	Glu	Ala	Tyr	Ser	Glu	Ile	Gly	
			660					665					670			

ES 2 746 555 T3

Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln
675 680 685

Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln
690 695 700

Ala Leu Pro Pro Arg
705

<210> 20

<211> 798

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> CARACTERÍSTICAS_MISCELÁNEAS

<223> Secuencia de aminoácidos que codifica la proteína receptora de antígeno quimérico CLD18A2-163-28BBZ

<400> 20

ES 2 746 555 T3

Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu
 1 5 10 15

Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly
 20 25 30

Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile
 35 40 45

Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr
 50 55 60

Leu Thr Tyr Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys
 65 70 75 80

Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu
 85 90 95

Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu
 100 105 110

Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly
 115 120 125

Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr
 130 135 140

Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn
 145 150 155 160

ES 2 746 555 T3

Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser
 165 170 175

Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly
 180 185 190

Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu
 195 200 205

Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe
 210 215 220

Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys Ser
 225 230 235 240

Gly Val Lys Gln Thr Leu Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp
 245 250 255

Val Glu Ser Asn Pro Gly Pro Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu
 260 265 270

Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu His Ala Ala Arg Pro Gln Ile Gln Leu
 275 280 285

Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile
 290 295 300

Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly Met Asn Trp
 305 310 315 320

Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met Gly Trp Ile Asn
 325 330 335

Thr Asn Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Glu Glu Phe Lys Gly Arg Phe
 340 345 350

Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Asn
 355 360 365

Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Leu Gly
 370 375 380

Phe Gly Asn Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val
 385 390 395 400

Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly

ES 2 746 555 T3

				405					410							415
Ser	Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Thr	Val	Thr	Ala	
			420					425					430			
Gly	Glu	Lys	Val	Thr	Met	Ser	Cys	Lys	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Leu	Asn	
		435					440					445				
Ser	Gly	Asn	Gln	Lys	Asn	Tyr	Leu	Thr	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	
	450					455					460					
Gln	Pro	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Trp	Ala	Ser	Thr	Arg	Glu	Ser	Gly	
465					470					475					480	
Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Thr	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	
				485					490					495		
Thr	Ile	Ser	Ser	Val	Gln	Ala	Glu	Asp	Leu	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	
			500					505					510			
Asn	Asp	Tyr	Ser	Tyr	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Ala	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	
		515					520					525				
Leu	Lys	Thr	Thr	Thr	Pro	Ala	Pro	Arg	Pro	Pro	Thr	Pro	Ala	Pro	Thr	
	530					535					540					
Ile	Ala	Ser	Gln	Pro	Leu	Ser	Leu	Arg	Pro	Glu	Ala	Cys	Arg	Pro	Ala	
545					550					555					560	
Ala	Gly	Gly	Ala	Val	His	Thr	Arg	Gly	Leu	Asp	Phe	Ala	Cys	Asp	Phe	
				565					570					575		
Trp	Val	Leu	Val	Val	Val	Gly	Gly	Val	Leu	Ala	Cys	Tyr	Ser	Leu	Leu	
			580					585					590			
Val	Thr	Val	Ala	Phe	Ile	Ile	Phe	Trp	Val	Arg	Ser	Lys	Arg	Ser	Arg	
		595					600					605				
Leu	Leu	His	Ser	Asp	Tyr	Met	Asn	Met	Thr	Pro	Arg	Arg	Pro	Gly	Pro	
	610					615					620					
Thr	Arg	Lys	His	Tyr	Gln	Pro	Tyr	Ala	Pro	Pro	Arg	Asp	Phe	Ala	Ala	
625					630					635					640	
Tyr	Arg	Ser	Lys	Arg	Gly	Arg	Lys	Lys	Leu	Leu	Tyr	Ile	Phe	Lys	Gln	
				645					650					655		

ES 2 746 555 T3

Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser
 660 665 670

Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys
 675 680 685

Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln
 690 695 700

Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu
 705 710 715 720

Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Gln Arg
 725 730 735

Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys
 740 745 750

Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg
 755 760 765

Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys
 770 775 780

Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 785 790 795

<210> 21

<211> 709

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> CARACTERÍSTICAS_MISCELÁNEAS

<223> Secuencia de aminoácidos que codifica la proteína receptora de antígeno quimérico CLD18A2-175-Z

<400> 21

ES 2 746 555 T3

Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu
1 5 10 15

Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly
20 25 30

Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile
35 40 45

Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr
50 55 60

ES 2 746 555 T3

Leu Thr Tyr Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys
 65 70 75 80

 Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu
 85 90 95

 Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu
 100 105 110

 Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly
 115 120 125

 Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr
 130 135 140

 Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn
 145 150 155 160

 Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser
 165 170 175

 Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly
 180 185 190

 Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu
 195 200 205

 Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe
 210 215 220

 Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys Ser
 225 230 235 240

 Gly Val Lys Gln Thr Leu Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp
 245 250 255

 Val Glu Ser Asn Pro Gly Pro Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu
 260 265 270

 Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu His Ala Ala Arg Pro Gln Val Gln Leu
 275 280 285

 Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu
 290 295 300

 Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Ile Asn Trp
 305 310 315 320

ES 2 746 555 T3

Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Asn Ile Tyr
 325 330 335

Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala
 340 345 350

Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser
 355 360 365

Ser Pro Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Ser Trp
 370 375 380

Arg Gly Asn Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val
 385 390 395 400

Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 405 410 415

Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val Thr Ala
 420 425 430

Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn
 435 440 445

Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
 450 455 460

Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly
 465 470 475 480

Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu
 485 490 495

Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln
 500 505 510

Asn Asp Tyr Ser Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu
 515 520 525

Ile Lys Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr
 530 535 540

Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala
 545 550 555 560

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

ES 2 746 555 T3

				565					570					575		
Tyr	Ile	Trp	Ala	Pro	Leu	Ala	Gly	Thr	Cys	Gly	Val	Leu	Leu	Leu	Ser	
			580					585					590			
Leu	Val	Ile	Thr	Arg	Val	Lys	Phe	Ser	Arg	Ser	Ala	Asp	Ala	Pro	Ala	
		595					600					605				
Tyr	Gln	Gln	Gly	Gln	Asn	Gln	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Asn	Leu	Gly	Arg	
	610					615					620					
Arg	Glu	Glu	Tyr	Asp	Val	Leu	Asp	Lys	Arg	Arg	Gly	Arg	Asp	Pro	Glu	
625					630					635					640	
Met	Gly	Gly	Lys	Pro	Gln	Arg	Arg	Lys	Asn	Pro	Gln	Glu	Gly	Leu	Tyr	
				645					650					655		
Asn	Glu	Leu	Gln	Lys	Asp	Lys	Met	Ala	Glu	Ala	Tyr	Ser	Glu	Ile	Gly	
			660					665					670			
Met	Lys	Gly	Glu	Arg	Arg	Arg	Gly	Lys	Gly	His	Asp	Gly	Leu	Tyr	Gln	
		675					680					685				
Gly	Leu	Ser	Thr	Ala	Thr	Lys	Asp	Thr	Tyr	Asp	Ala	Leu	His	Met	Gln	
	690					695					700					
Ala	Leu	Pro	Pro	Arg												
705																

<210> 22

<211> 798

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> CARACTERÍSTICAS_MISCELÁNEAS

<223> Secuencia de aminoácidos que codifica la proteína receptora de antígeno quimérico CLD18A2-175-28BBZ

<400> 22

ES 2 746 555 T3

Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu
1 5 10 15

Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly
20 25 30

Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile
35 40 45

ES 2 746 555 T3

Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr
 50 55 60

Leu Thr Tyr Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys
 65 70 75 80

Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu
 85 90 95

Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu
 100 105 110

Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly
 115 120 125

Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr
 130 135 140

Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn
 145 150 155 160

Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser
 165 170 175

Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly
 180 185 190

Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu
 195 200 205

Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe
 210 215 220

Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys Ser
 225 230 235 240

Gly Val Lys Gln Thr Leu Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp
 245 250 255

Val Glu Ser Asn Pro Gly Pro Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu
 260 265 270

Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu His Ala Ala Arg Pro Gln Val Gln Leu
 275 280 285

Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu
 290 295 300

ES 2 746 555 T3

Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Ile Asn Trp
 305 310 315 320

Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Asn Ile Tyr
 325 330 335

Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala
 340 345 350

Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser
 355 360 365

Ser Pro Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Ser Trp
 370 375 380

Arg Gly Asn Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val
 385 390 400

Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 405 410 415

Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val Thr Ala
 420 425 430

Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn
 435 440 445

Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
 450 455 460

Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly
 465 470 475 480

Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu
 485 490 495

Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln
 500 505 510

Asn Asp Tyr Ser Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu
 515 520 525

Ile Lys Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr
 530 535 540

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

ES 2 746 555 T3

<210> 23
 <211> 1266
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>

<221> características_miscláneas
 <223> scFv(GPC3)-CD8-CD3 zeta
 <400> 23

```

gatgttgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccctggaga gccggcctcc      60
atctcctgca gatctagtca gagccttgta cacagtaatg ccaacaccta tttacattgg      120
tacctgcaga agccagggca gtctccacag ctctgatct ataaagtttc caaccgattt      180
tctgggggtcc ctgacaggtt cagtggcagt ggatcaggca cagattttac actgaaaatc      240
agcagagtgg aggctgagga tgttgggggtt tattactgct ctcaaatac acatgttcct      300
cctacgtttg gccaggggac caagctggag atcaaactg gtggaggcgg ttcaggcgga      360
ggtggtctctg gcggtggcgg atcgcaggtg cagctggtgc agtctggagc tgaggtgaag      420
aagcctgggg cctcagtgaa ggtctcctgc aaggcttctg gatacacctt caccgactat      480
gaaatgcact ggggtgcgaca ggcccctgga caagggcttg agtggatggg agctcttgat      540
cctaaaactg gtgatactgc ctacagtcag aagttcaagg gcagagtcac gctgaccgcg      600
gacgaatcca cgagcacagc ctacatggag ctgagcagcc tgagatctga ggacacggcc      660
gtgtattact gtacaagatt ctactcctat acttactggg gccagggaac cctggtcacc      720
gtctcctcaa ccacgacgcc agcgcgcga ccaccaacac cggcgcccac catcgcgtcg      780
cagcccctgt ccctgcgccc agaggcgtgc cggccagcgg cggggggcgc agtgcacacg      840
agggggctgg acttcgcctg tgatatctac atctgggcgc ccttggccgg gacttgtggg      900
gtccttctcc tgtcactggt taccaccaga gtgaagttca gcaggagcgc agacgcccc      960
gcgtaccagc agggccagaa ccagctctat aacgagctca atctaggacg aagagaggag     1020
tacgatgttt tggacaagag acgtggccgg gaccctgaga tggggggaaa gccgcagaga     1080
aggaagaacc ctcaggaagg cctgtacaat gaactgcaga aagataagat ggcggaggcc     1140
tacagtgaga ttgggatgaa aggcgagcgc cggaggggca aggggcacga tggcctttac     1200
cagggctctca gtacagccac caaggacacc tacgacgcc ttcacatgca ggccctgccc     1260
cctcgc                                           1266
    
```

10 <210> 24

<211> 1533

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <221> características_misceláneas

<223> scFv(GPC3)-CD28a-CD28b-CD137-CD3 zeta

<400> 24

ES 2 746 555 T3

gatgttgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccctggaga gccggcctcc 60
atctcctgca gatctagtca gagccttgta cacagtaatg ccaacaccta ttacattgg 120
tacctgcaga agccagggca gtctccacag ctctgatct ataaagtttc caaccgattt 180
tctgggggtcc ctgacaggtt cagtggcagt ggatcaggca cagattttac actgaaaatc 240
agcagagtgg aggctgagga tgttgggggtt tattactgct ctcaaatac acatgttcct 300
cctacgtttg gccaggggac caagctggag atcaaactg gtggaggcgg ttcaggcgga 360
ggtggctctg gcggtggcgg atcgcaggtg cagctggtgc agtctggagc tgaggtgaag 420
aagcctgggg cctcagtga ggtctcctgc aaggcttctg gatacacctt caccgactat 480
gaaatgact ggggtgcgaca ggcccctgga caaggcctt agtggatggg agctcttgat 540
cctaaaactg gtgatactgc ctacagtcag aagttcaagg gcagagtcac gctgaccgcg 600
gacgaatcca cgagcacagc ctacatggag ctgagcagcc tgagatctga ggacacggcc 660
gtgtattact gtacaagatt ctactcctat acttactggg gccagggaac cctggtcacc 720
gtctcctcaa ccacgacgcc agcgcgcgca ccaccaacac cggcgcccac catcgcgtcg 780
cagcccctgt ccctgcgccc agaggcgtgc cggccagcgg cggggggcgc agtgcacacg 840
agggggctgg acttcgcctg tgatthttgg gtgctggtgg tggttggtgg agtctggtc 900
tgctatagct tgctagtaac agtggccttt attatthttct gggtgaggag taagaggagc 960
aggctcctgc acagtgacta catgaacatg actccccgcc gccccgggcc aaccgcaag 1020
cattaccagc cctatgcccc accacgcgac ttcgcagcct atcgcctcaa acggggcaga 1080
aagaaactcc tgtatatatt caaacaacca thtatgagac cagtacaaac tactcaagag 1140
gaagatggct gtagctgccg atttccagaa gaagaagaag gaggatgtga actgagagtg 1200
aagttcagca ggagcgcaga ccccccgcg taccagcagg gccagaacca gctctataac 1260
gagctcaatc taggacgaag agaggagtac gatgtthttgg acaagagacg tggccgggac 1320
cctgagatgg ggggaaagcc gcagagaagg aagaaccctc aggaaggcct gtacaatgaa 1380
ctgcagaaag ataagatggc ggaggcctac agtgagattg ggatgaaagg cgagcgcgg 1440
aggggcaagg ggcacgatgg cctttaccag ggtctcagta cagccaccaa ggacacctac 1500
gacgccttc acatgcaggc cctgccccct cgc 1533

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un receptor de antígeno quimérico expresado en la superficie de la célula efectora inmune, que comprende una región de unión extracelular, una región transmembrana y una región de señales intracelulares, en donde la región de unión extracelular comprende una proteína que reconoce específicamente CLD18A2, en donde la región de unión extracelular comprende una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO. 4 y 6, y en donde la secuencia de la región de señales intracelulares se selecciona de CD3ζ, EcePly, CD27, CD28, CD137, CD134, o una combinación de los mismos.
- 10 2. El receptor de antígeno quimérico de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la región transmembrana tiene una secuencia que comprende la secuencia de la región transmembrana y la región bisagra de CD8 o CD28.
3. El receptor de antígeno quimérico de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el receptor de antígeno quimérico comprende una región de unión extracelular, una región transmembrana y una región de señales intracelulares conectadas en la siguiente secuencia:
 Anticuerpo de cadena simple que reconoce específicamente el CLD18A2, CD8 y CD3ζ;
 Anticuerpo de cadena simple que reconoce específicamente CLD18A2, CD8, CD137 y CD3ζ;
- 15 Anticuerpo de cadena simple que reconoce específicamente CLD18A2, región transmembrana de CD28, región de señales intracelulares de molécula CD28 y CD3ζ; o
 Anticuerpo de cadena única que reconoce específicamente CLD18A2, región transmembrana de CD28, región de señales intracelulares de CD28, CD137 y CD3ζ.
- 20 4. El receptor de antígeno quimérico de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el receptor de antígeno quimérico tiene una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 19-22.
5. El receptor de antígeno quimérico de acuerdo con la reivindicación 1, en donde las células efectoras inmunes comprenden: linfocitos T, células NK o células NKT.
- 25 6. El ácido nucleico que codifica el receptor de antígeno quimérico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, por ejemplo, en donde el ácido nucleico tiene la secuencia de nucleótidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 15-18.
7. Un vector de expresión, que comprende cualquiera de los ácidos nucleicos de acuerdo con la reivindicación 6, por ejemplo, en donde el vector de expresión se deriva del plásmido lentivirus PWPT.
8. Un virus, que comprende el vector de acuerdo con la reivindicación 7.
- 30 9. Uso in vitro del receptor de antígeno quimérico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, el ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 6, el vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 7 o el virus de acuerdo con la reivindicación 8, en la preparación de células efectoras inmunes modificadas genéticamente dirigidas a CLD18A2.
- 35 10. Una célula efectora inmune modificada genéticamente, transducida por ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 6, el vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 7 o el virus de acuerdo con la reivindicación 8.
11. Una célula efectora inmune modificada genéticamente con un receptor de antígeno quimérico que se expresa en la superficie del mismo, en donde la secuencia de aminoácidos de dicho receptor de antígeno quimérico se selecciona de cualquiera de las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 19-22.
- 40 12. La célula efectora inmune modificada genéticamente de acuerdo con las reivindicaciones 10 u 11, en donde las células efectoras inmunes comprenden: linfocitos T, células NK o células NKT.
13. Las células efectoras inmunes modificadas genéticamente de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10-12, para su uso en la supresión de tumores, en donde el tumor es un tumor CLD18A2 positivo.

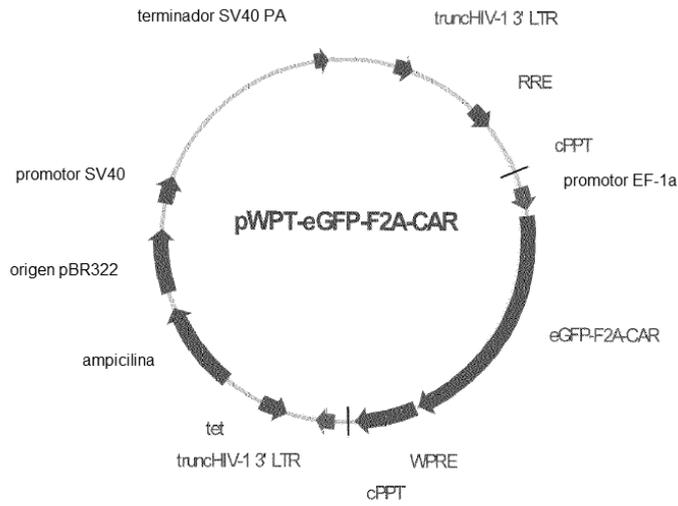


Fig. 1

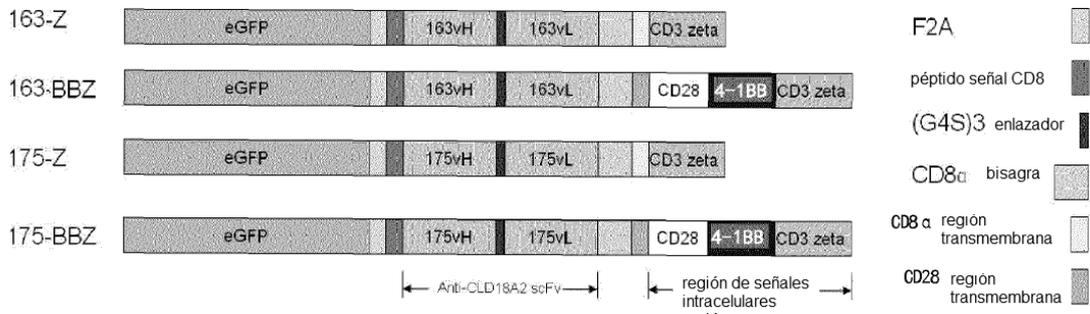


Fig. 2

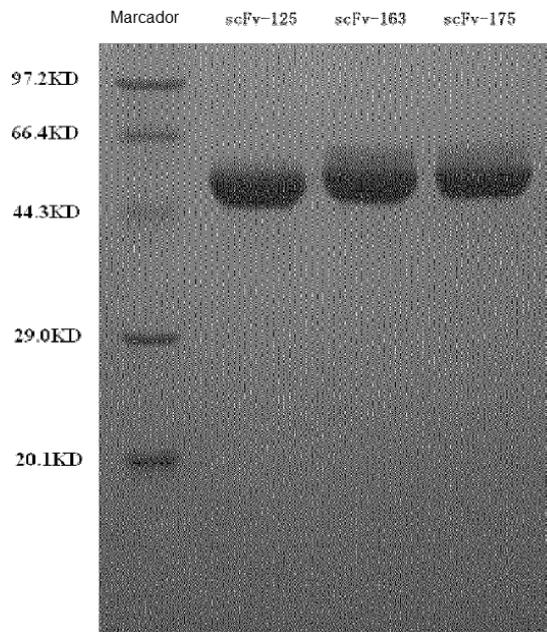


Fig. 3

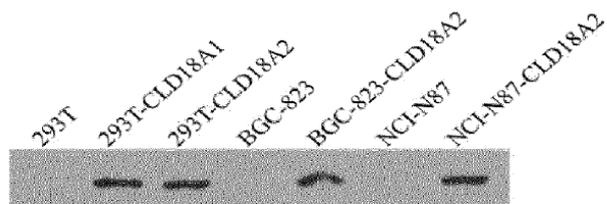


Fig. 4

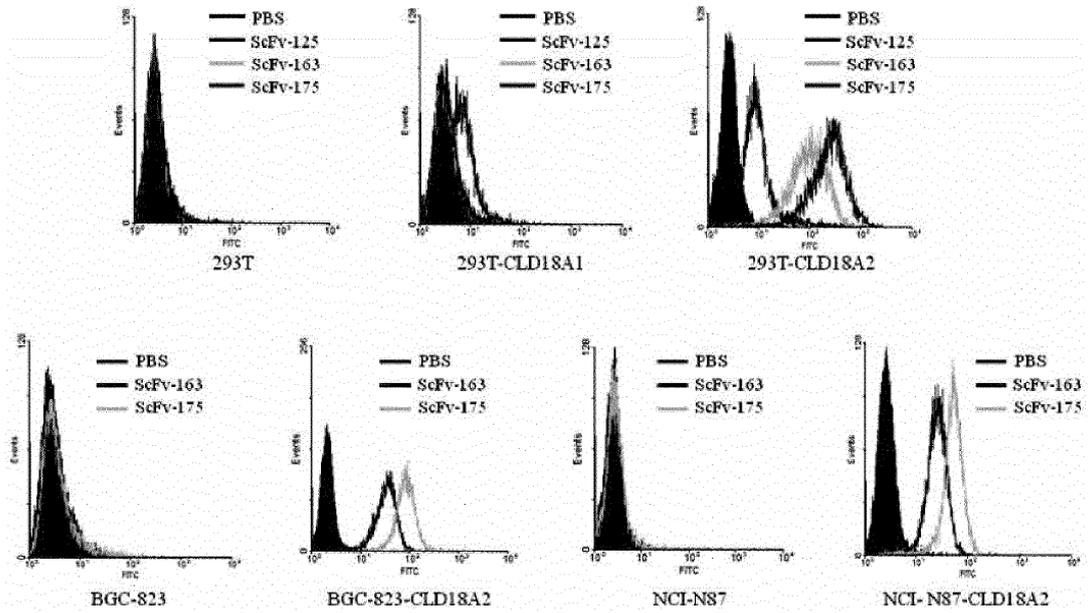


Fig. 5



Fig. 6